



Bioaktywne powłoki przeciwdrobnoustrojowe na wyrobach medycznych do implantacji nałożone przez plazmowe utlenianie elektrolityczne

Bioactive antimicrobial coatings for implantable medical devices formed by plasma electrolytic oxidation

Dmitry Dzhurinskiy*

University of Windsor, Department of Physics, 401 Sunset Avenue, Windsor, ON, N9B 3P4, Canada

Informacje o artykule

Zgłoszenie: 24.10.2017

Recenzja: 20.11.2017

Akceptacja: 30.03.2018

Streszczenie

W przedstawionej pracy badawczej wytworzono nowatorską powłokę na bazie TiO_2 zawierającą nanocząsteczkowy hydroksyapatyt (n-HA) i cząstki srebra na dostępnych w handlu podłożach stopowych Ti-6Al-4V (Grade 5) i Ti-czysty (Grade 2) za pomocą techniki plazmowego utleniania elektrolitycznego (PEO). Osadzanie powłoki zrealizowano w wodnym roztworze wodorofosforanu disodowego zawierającego zawieszone nanocząsteczki hydroksyapatytowe i wodorotlenek potasu w trybie impulsowym prądu bipolarnego o kontrolowanym cyklu pracy. Włączenie przeciwdrobnoustrojowych cząsteczek srebra było możliwe z wykorzystaniem oddzielnej operacji technologicznej w wodnym roztworze AgNO_3 na zasadzie fotokatalizy na powierzchni TiO_2 w warunkach obróbki w ultrafiolecie. Morfologię powierzchni utworzonych powłok zbadałano za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM), natomiast skład pierwiastkowy powłok został określony metodą analizy dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego (EDS). Obecność nanocząsteczek HA w utworzonych powłokach została określona za pomocą spektroskopii w podczerwieni z transformatą Fouriera (FTIR). Wyniki wskazują, że utworzone powłoki PEO wykazują porowatą strukturę sieciową z osadzonymi cząstkami n-HA i Ag równomiernie rozmieszczonymi na całej powierzchni powłok. Utworzone w technologii PEO warstwy TiO_2 :n-HA:Ag mogą być stosowane jako bioaktywne powłoki biomimetyczne o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych w celu zwiększenia aktywności biologicznej, osteointegracji i stabilności biochemicznej w implantowanych wyrobach medycznych.

Słowa kluczowe: powłoki, nanohydroksyapatyt, srebro, bioaktywne, antybakteryjne, plazmowe utlenianie elektrolityczne, implant, stop tytanu

Article info

Received: 24.10.2017

Reviewed: 20.11.2017

Accepted: 30.03.2017

Abstract

In the present study, a novel TiO_2 -based coating containing nanosized hydroxyapatite (n-HA) and Silver particles has been formed on commercially available Ti-6Al-4V (Grade 5) and Ti-pure (Grade 2) alloy substrates by the Plasma Electrolytic Oxidation (PEO) technique. The coating deposition were provided in an aqueous solution of disodium hydrogen phosphate containing suspended hydroxyapatite nanoparticles and potassium hydroxide under a pulsed bipolar current mode with controlled duty cycle. Inclusion of antimicrobial silver particles were possible from a separate technological operation in AgNO_3 aqueous solution by the principle of photocatalysis at TiO_2 surface under ultraviolet treatment. The surface morphology of the formed coatings has been examined by Scanning Electron Microscopy (SEM), while the element composition of the coatings has been determined by Energy Dispersive X-ray analysis (EDS). The presence of HA nanoparticles within the formed coatings has been analyzed by Fourier

* Autor do korespondencji. Tel.: +1 519 977 74 00; e-mail: dmitry.dzhurinskiy@gmail.com

* Corresponding author. Tel.: +1 519 977 74 00; e-mail: dmitry.dzhurinskiy@gmail.com

Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). The results indicate that the formed PEO coatings exhibit a porous network structure with embedded n-HA and Ag particles uniformly distributed over the entire surface of the coatings. The PEO-formed TiO₂:n-HA:Ag layers can be used as a bioactive biomimetic coating with antimicrobial properties to enhance surface bioactivity, osseointegration and biochemical stability in implantable medical devices.

Keywords: coatings, nano hydroxyapatite, silver, bioactive, antimicrobial, plasma electrolytic oxidation, implant, titanium alloy

1. WSTĘP

Tytan i jego stopy są szeroko stosowane do wytwarzania implantów ortopedycznych i dentystycznych ze względu na dobrą biokompatybilność, wysoką wytrzymałość na rozciąganie, wytrzymałość na pękanie i wytrzymałość zmęczeniową [1, 2]. Jednak stopy tytanu stopniowo podlegają oddziaływaniu płynów ustrojowych, a następnie uwalniają do obiegu jony metaliczne aluminium i wanadu, które mogą powodować niepożądane skutki dla otaczających tkanek. Co więcej, ze względu na ich bioinertność, wymagane jest zastosowanie inżynierii powierzchni, aby poprawić bioaktywność implantów tytanowych i zwiększyć ich integrację z tkanką kostną [3–5]. Aby ograniczyć reakcję korozyjną stopów tytanu, warstwy powierzchniowe TiO₂ są dobrze znane jako powłoki zwiększające ochronę [6]. Powlekanie implantów ze stopów tytanu hydroksyapatytem (HA, Ca₁₀(PO₄)₂(OH)₆), bioaktywnym materiałem ceramicznym ściśle przypominającym mineralną zawartość natywnej kości, znacznie poprawia aktywność biologiczną powierzchni implantów i służy jako dodatkowa bariera, zmniejszając uwalnianie jonów metali z materiału podłoża [7–9]. Uwzględniając powyższe, tworzenie warstwy powierzchniowej TiO₂ z cząstkami HA i Ag wbudowanymi w jego strukturę uważa się za prawidłowe podejście do zmniejszenia korozji i zwiększenia bioaktywności z właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi implantów ze stopu tytanu [10, 11].

Plazmowe utlenianie elektrolityczne (PEO), technika elektrochemicznej obróbki powierzchni, jest uważana za jedną z najbardziej użytecznych metod modyfikacji powierzchni implantów ze stopu tytanu, ponieważ może ona tworzyć porowate i dobrze przylegające warstwy TiO₂ na powierzchni implantu, co nie tylko ogranicza działanie korozyjne, ale także wzmacnia mocowanie

1. INTRODUCTION

Titanium and its alloys are widely used for fabrication of orthopedic and dental implants because of their good biocompatibility, high tensile strength, fracture toughness and fatigue strength [1, 2]. However, titanium alloys are gradually affected by body fluids, with subsequent release of aluminum and vanadium metallic ions into circulation, which might cause adverse effects to the surrounding tissue. Moreover, due to their bioinertness, surface engineering is required to improve the bioactivity of titanium implants and enhance their osseointegration with the bone tissue [3–5]. To improve the corrosion response of titanium alloys, TiO₂ surface layers are well-known to enhance protection [6]. Coating titanium alloy implants with hydroxyapatite (HA, Ca₁₀(PO₄)₂(OH)₆), a bioactive ceramic material closely resembling the mineral content of native bone, considerably enhances surface bioactivity of implants and serves as an additional barrier, reducing the release of metal ions from the base material [7–9]. In consideration of the above, the formation of TiO₂ surface layer with HA and Ag particles embedded within its structure is considered a viable approach to reduce corrosion and increase bioactivity with antimicrobial properties of titanium alloy implants [10, 11].

Plasma electrolytic oxidation (PEO), an electrochemical surface treatment technique, is considered one of the most useful methods for surface modification of titanium alloy implants because it can produce porous and well-adhered TiO₂ films on the implant surface, which not only improves corrosion behavior, but also enhances implant fixation to the bone [12]. The PEO process has several advantages, such as a possibility to control thickness and morphology

implantów w kościach [12]. Proces PEO ma kilka zalet takich, jak możliwość kontrolowania grubości i morfologii warstwy powierzchniowej, zdolność do tworzenia powłok na złożonych kształtach i wyższe tempo wzrostu w porównaniu do konwencjonalnego anodowania. Ponadto materiały bioaktywne i przeciwdrobnoustrojowe można włączyć do warstwy powlekającej podczas lub po procesie PEO, dostosowując skład roztworu elektrolitu i proces obróbki końcowej [13, 14]. Dlatego metoda inżynierii powierzchni oparta na PEO jest atrakcyjna dla tworzenia bioaktywnych powłok o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych na podłożach tytanowych.

W pracy wykorzystano technikę PEO do utworzenia powłok TiO_2 : n-HA: Ag na podłożach ze stopu Ti-6Al-4V (Grade 5) i Ti-czysty (Grade 2), w celu zrozumienia topologii powierzchni i porównania z dostępną w handlu obróbką powierzchniową TiUnite firmy Noble-biocare.

2. MATERIAŁY I METODY

Próbki w kształcie tarcz (o średnicy 15 mm i grubości 5 mm) wycinano z dostępnych w handlu prętów Ti-6Al-4V (Grade 5) i Ti-czysty (Grade 2) i stosowano jako materiał podłoża. Przed obróbką PEO, główne powierzchnie próbek były stopniowo szlifowane przy użyciu papieru ściernego o ziarnistości #240 do #800 i oczyszczane za pomocą alkoholu etylowego i wody destylowanej. Nanoproszek HA, nanoXIM-HAp303, został pozyskany od Fluidinova (Moreira da Maia, Portugalia) w postaci pasty na bazie wody o zawartości części stałych 30% wag. Kompozycja nanoproszków spełnia wymagania specyfikacji dla hydroksyapatytu stosowanego w wyrobach chirurgicznych (ISO13779 i ASTM F1185). AgNO_3 zakupiono od Sigma Aldrich w postaci proszku. Próbki poddano obróbce PEO przez 10 minut w roztworze elektrolitycznym zawierającym 6 g/l wodorofosforanu disodowego (Na_2HPO_4 , Fisher Scientific), 10 g/l nanoXIM-HAp303 i 20 g/l KOH w temperaturze otoczenia. Zastosowano dwustopniowe parametry prądowe, gdzie w pierwszym etapie zastosowano potencjostatyczną polaryzację $U(+) = 220 \text{ V}$, aby umożliwić utworzenie jednorodnej pierwotnej

of the surface layer, ability to form coatings on complex shapes, and a higher growth rate compared to conventional anodising. Furthermore, bioactive and antimicrobial materials can be incorporated into the coating layer during or after the PEO process by tailoring the composition of the electrolyte solution and post treatment process [13, 14]. Therefore, the PEO-based surface engineering method is attractive for the formation of bioactive coatings with antimicrobial properties on titanium substrates.

In this work, the PEO technique has been employed to form TiO_2 :n-HA:Ag hybrid coatings on Ti-6Al-4V (Grade 5) and Ti-pure (Grade 2) alloy substrates with the aim of understanding surface topology and comparison to commercially available TiUnite surface treatment from Noble-biocare.

2. MATERIALS AND METHODS

Disk samples (15 mm in diameter and 5 mm thick) were cut from commercially available Ti-6Al-4V (Grade5) and Ti-pure (Grade2) rods and used as the substrate material. Prior to PEO treatment, the main sample surfaces were gradually ground using #240 to #800 abrasive paper and cleaned with ethyl alcohol and distilled water. The HA nanopowder, nanoXIM-HAp303 was acquired from Fluidinova (Moreira da Maia, Portugal) in the form of a water-based paste with solids content of 30 wt.%. The nanopowder composition complies with the specification requirements to hydroxyapatite used in surgical devices (ISO13779 and ASTM F1185). AgNO_3 was purchased from Sigma Aldrich in a powder form. The samples were PEO-treated for 10 minutes in an electrolytic solution containing 6g/L disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4 , Fisher Scientific), 10g/L of nanoXIM-HAp303 and 20g/L of KOH at ambient temperature. A two-stage current regime was employed, wherein at the first stage, a potentiostatic polarization of $U(+) = 220\text{V}$ was applied to allow the uniform primary oxide film to be formed; this was followed

warstwy tlenkowej; następnie zastosowano polaryzację galwanostatyczną o impulsowym trybie prądu bipolarnego o gęstości prądu $i(+) = 35 \text{ mA/cm}^2$ oraz $i(-) = 17,5 \text{ mA/cm}^2$. Cząstki Ag zostały osadzone przez wyeksponowanie próbek wykonane techniką PEO w wodnym roztworze AgNO_3 pod wpływem promieniowania ultrafioletowego, w określonym czasie w celu uzyskania zakładanego stężenia środka przeciwdrobnoustrojowego na powierzchni bioaktywnej powłoki.

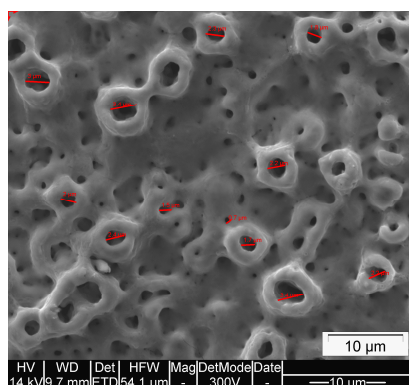
Charakterystykę mikrostruktury powłok przeprowadzono za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM) FEI model Quanta 200F SEM z przystawką EDAX zgodnie z ASTM E1588.

Widma FTIR rejestrowano w zakresie długości fal 400 do 1400 cm^{-1} , przy użyciu spektrometru Bruker ALPHA-T FTIR wyposażonego w pojedynczy moduł do próbkowania osłabionego całkowitego odbicia ATR. Rozdzielczość pomiaru wynosiła 4 cm^{-1} i przeprowadzone zostały 32 skany w badanym zakresie długości fal.

3. WYNIKI I OMÓWIENIE

3.1. Mikrostruktura

Rys. 1 przedstawia mikroobrazy SEM podstawowej referencyjnej morfologii powierzchni implantu TiUnite (Noble Biocare) z wielkością por od 0,5 do $3,5 \mu\text{m}$ i średnią grubością warstwy powłoki bioaktywnej $6,8 \mu\text{m}$ na podłożu Ti-czysty (Grade 2).



a)

by galvanostatic polarization in the pulsed bipolar current mode with current densities of $i(+) = 35 \text{ mA/cm}^2$ and $i(-) = 17.5 \text{ mA/cm}^2$. Ag particles were embedded by exposing the PEO-treated samples in aqua solution of AgNO_3 under ultraviolet for a certain period of time to obtain designed concentration of antimicrobial agent at the surface of bioactive coating.

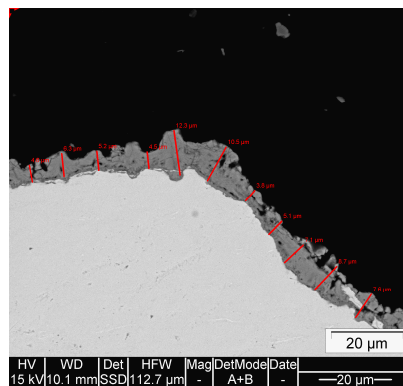
Microstructure characterization of coatings was performed using a Scanning Electron Microscope (SEM) FEI Quanta model 200F SEM with an EDAX attachment in accordance with ASTM E1588.

The FTIR spectra were recorded in the wavelength range 400 to 1400 cm^{-1} , using a Bruker ALPHA-T FTIR spectrometer equipped with a single reflection ATR sampling module. The measuring resolution was 4 cm^{-1} and 32 scans have been performed in the investigated wavelength range.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Microstructure

Fig. 1 shows typical SEM microphotographs of the referenced surface morphology of TiUnite implant from Noble Biocare with the pore size from $0.5 \mu\text{m}$ to up to $3.5 \mu\text{m}$ and the mean layer thickness of the bioactive coating at $6.8 \mu\text{m}$ on Ti-pure (Grade2) substrate material.

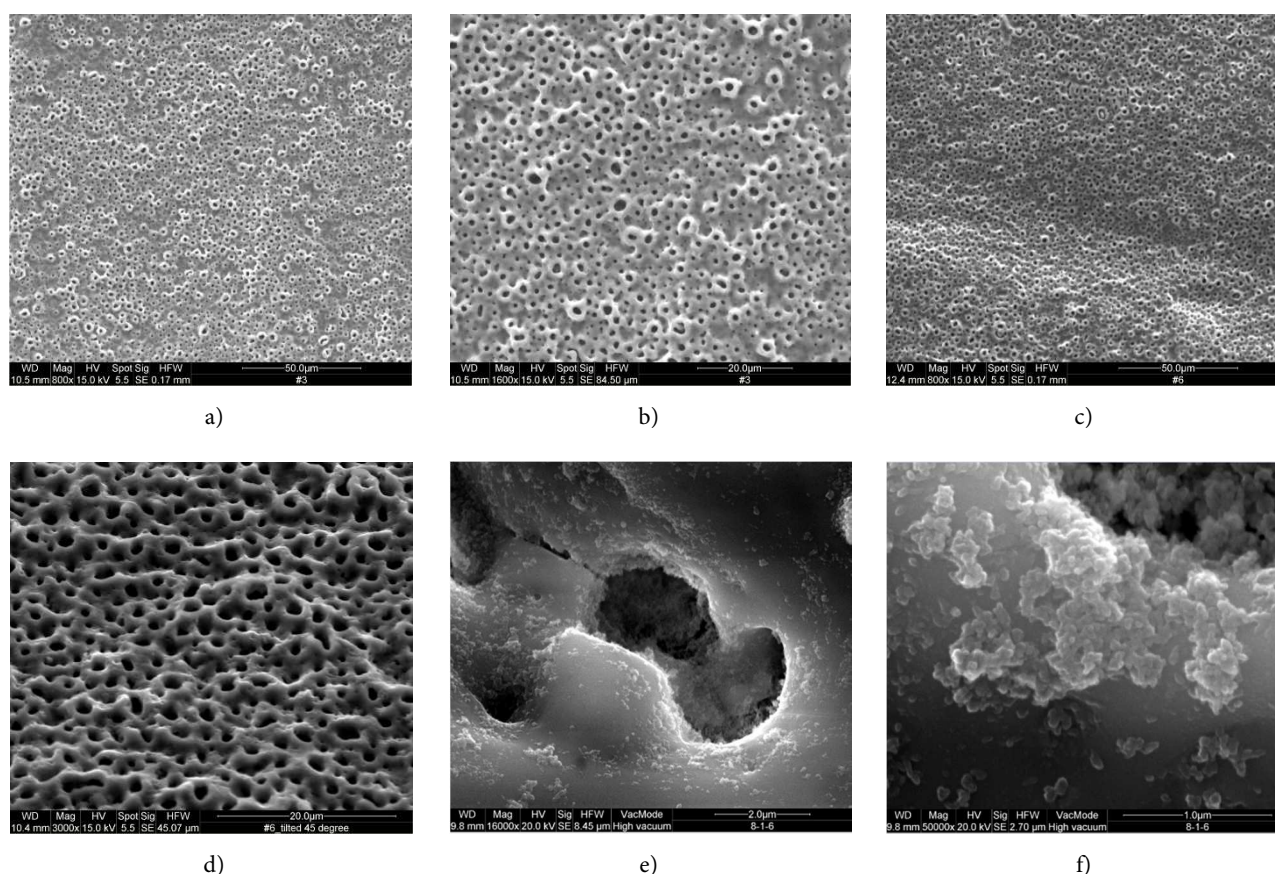


b)

Rys. 1. Mikroobrazy SEM powierzchni komercyjnie dostępnych TiUnite – Noble Biocare (a) i przekrój powłoki Tiunite (b)
Fig. 1. SEM micrographs the commercially available TiUnite surface from Noble Biocare (a), and cross section of the Tiunite coating (b)

Rys. 2 przedstawia wyniki oceny mikroobrazów SEM morfologii powierzchni próbek wykonanych techniką PEO. Na powierzchni próbki zaobserwowano silnie porowatą warstwę, którą przyjęto za fazę TiO_2 o średniej wielkości porów w zakresie od $0,5 \mu\text{m}$ do $4 \mu\text{m}$. Taka równomiernie rozproszona porowata struktura o stosunkowo jednorodnej strukturze w pobliżu porów jest charakterystyczna dla warstw tlenkowych uzyskanych w procesach PEO z wykorzystaniem jednobiegowego trybu elektrycznego [15]. Pory powierzchniowe wywołane są wyładowaniem plazmy, których intensywność zależy od parametrów obróbki PEO. Kształt porów był w większości okrągły. Wielkość porów i chropowatość powłoki wzrastają przy większych gęstościach prądu, przyłożonym potencjale i stężeniu elektrolitu [16]. Jednak eksperymenty wykazały, że potrzebna morfologia powierzchni może nie zostać zachowana, jak pokazano na rys. 2, przy większym poziomie gęstości prądu i/lub czasu obróbki.

Fig. 2 shows results of SEM microphotographs evaluation of the surface morphology of PEO treated specimens. A highly porous layer, presumed to be a TiO_2 phase, with an average pore size ranging from $0.5 \mu\text{m}$ to $4 \mu\text{m}$ was observed on the specimen surface. Such a uniformly distributed porous structure with a relatively smooth surrounding area near the pores is characteristic of the oxide layers grown by PEO processes utilizing a unipolar electrical mode [15]. The surface pores are caused by the plasma discharge, the intensity, of which depends on the PEO treatment parameters. The pore shape was mostly round. The diameter of the pores and the coating roughness increase with greater current densities, applied potential and electrolyte concentration [16]. However, experiments had shown that the needed surface morphology might not be retained as shown of Fig. 2 with a greater level of current densities and/or treatment time.



Rys. 2. Mikroobrazy SEM próbek po obróbce PEO: ogólny widok powierzchni przy różnym powiększeniu dla materiałów podłoża Grade 2 (a, b) i Grade 5 (c, d); porowata struktura przy dużym powiększeniu dla powłoki TiO_2 : n-HA na podłożu Grade 5, Ti-6Al-4V (e, f)

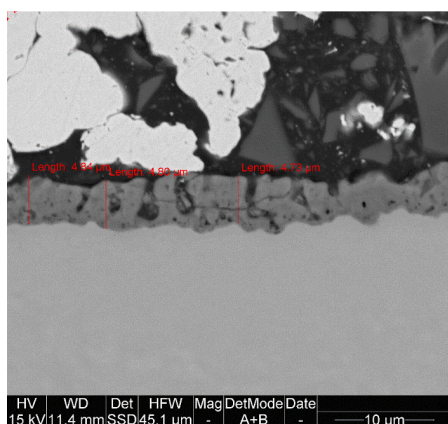
Fig. 2. SEM micrographs of the samples after the PEO treatment: general view of the surface at different magnification for Grade 2 (a, b), and Grade 5 (c, d) substrate materials. Porous structure at high magnification for TiO_2 :n-HA coating on Grade 5, Ti-6Al-4V substrate (e, f)

Aglomeraty nanocząstek HA były równomiernie rozmieszczone wewnątrz oraz wokół porów (rys. 2e, 2f) i nie ulegały podstawowym przemianom morfologicznym podczas obróbki PEO, która została celowo przeprowadzona w cyklu roboczym o niskim natężeniu w celu zmniejszenia naprężeń termicznych na powierzchni. Uformowana struktura powierzchni zawierająca nanocząsteczki HA i pozwalająca na kontrolę wielkości porów może być atrakcyjna dla zastosowań implantologicznych, ponieważ porowate powłoki zawierające nanocząsteczki HA sprzyjają adhezji osteoblastów [17].

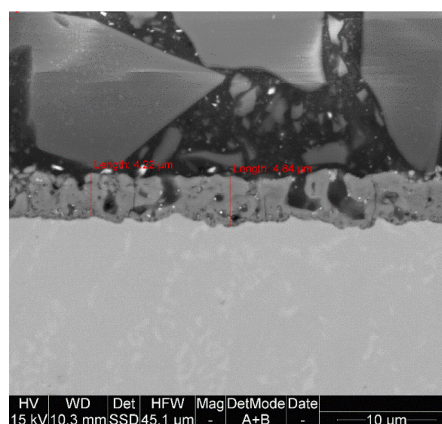
Typowy obraz przekrojowy utworzonej hybrydowej powłoki $\text{TiO}_2:n\text{-HA:Ag}$ pokazano na rys. 3. Można zauważyć, że powłoka ma grubość około 5 mikronów i ma bardzo porowatą strukturę.

The HA nanoparticle agglomerates were uniformly distributed within and around the pores (Fig. 2e, 2f) and did not undergo substantial morphological transformations during the PEO treatment which was intentionally performed at a low duty cycle to reduce the thermal load on the surface. The formed surface structure incorporating HA nanoparticles and allowing control of the pore size can be attractive for implant applications, since porous coatings containing HA nanoparticles favor adhesion of osteoblasts [17].

A typical cross-sectional image of the formed hybrid $\text{TiO}_2:n\text{-HA:Ag}$ coating is shown in Fig. 3. It can be seen that the coating is about 5 microns thick and has a highly porous structure.



a)



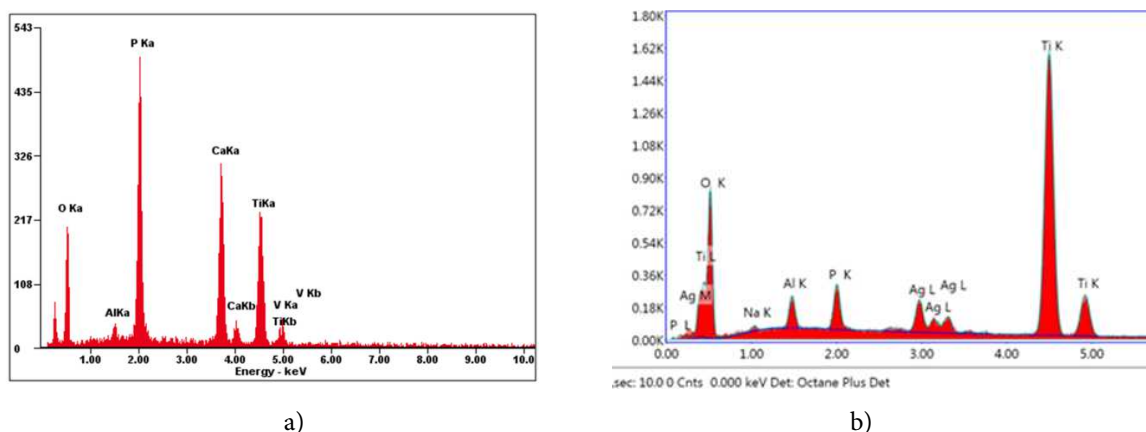
b)

Rys. 3. Obraz przekrojowy SEM powłoki na Ti-6Al-4V w trybie BSE, bez cząstek Ag (a) oraz wewnątrz osadzonego Ag, białe kropki (b)

Fig. 3. Cross-sectional SEM image of the coating on Ti-6Al-4V in BSE mode, without Ag particles (a), and within embedded Ag, white dots (b)

Podczas, gdy pory są równomiernie rozmieszczone w warstwie zewnętrznej, nie są tworzone w uformowanej powłoce i występuje cienka gęsta warstwa TiO_2 mocno związana z podłożem. Obecność gęstej warstwy obserwowano również w innych badaniach, co wskazuje, że granica między warstwą tlenkową a podłożem tytanowym nie ma nieciągłości [15–18]. Uważa się, że warstwa tlenkowa przyczynia się do zwiększenia odporności na korozję zmodyfikowanych próbek w porównaniu z niezmodyfikowanymi, co stanowi pogląd wsparty opisanymi poniżej badaniami elektrochemicznymi.

While the pores are homogeneously distributed over the coating layer, they do not penetrate the formed coating completely and there is a thin dense TiO_2 layer integrated firmly with the substrate. The presence of the dense layer was also reported in other studies, which indicates that the interface between the oxide layer and the titanium substrate does not have any discontinuity [15–18]. The oxide layer is considered to contribute to the enhancement of corrosion resistance of the coated samples compared to the bare ones, a viewpoint which is supported by the electrochemical tests described below.



Rys. 4. Widma EDS powłoki (a) TiO_2 : n-HA i (b) powłoki TiO_2 : n-Ag na podłożu Ti-6Al-4V
 Fig. 4. EDS spectra of (a) TiO_2 :n-HA coating, and (b) TiO_2 :n-Ag coating on Ti-6Al-4V substrate

Skład pierwiastkowy powłoki PEO analizowano za pomocą metody EDS. Ilościowe wyniki EDS uzyskane z nominalnej powierzchni 1 mm^2 pokazano na rys.4. Ważne jest, aby uwzględnić, że składniki elektrolitów mogą zostać włączone do utworzonych powłok, a ich zawartość zmienia się w zależności od czasu utleniania, stężenia elektrolitu i innych parametrów [19]. Dlatego wyniki analizy EDS należy traktować wyłącznie jako szacunkowe.

Jak można zauważyć na podstawie tab. 1, względna ilość Ca w warstwie powłoki TiO_2 :n-HA wynosi około 11% at., a zawartość fosforu wynosi około 15% at.

The elemental composition of the PEO coating was analyzed using EDS. Quantitative EDS results obtained from the nominal surface area of 1 mm^2 are shown in Fig.4. It is important to note that the electrolyte components can get incorporated into the formed coatings, with their contents changing depending on oxidation time, electrolyte concentration, and other parameters [19]. Therefore, the results of EDS analysis should be considered as estimations only.

As can be seen from the Tab. 1, the relative amount of Ca within the TiO_2 :n-HA coating layer is about 11 at.% and the phosphorus content is around 15 at%.

Tab. 1. Skład pierwiastkowy powłoki (EDX) TiO_2 :n-HA, TiO_2 i nanoproszek HA (odniesienie) o nominalnej powierzchni 1 mm^2
 Tab. 1. EDX elemental composition of TiO_2 :n-HA, TiO_2 coatings and HA nanopowder (reference) with nominal surface area of 1 mm^2

Pierwiastek Element	TiO_2 :n-HA		TiO_2		Nanoproszek HA / HA nanopowder	
	% wag. / Wt%	% at. / At%	% wag. / Wt%	% at. / At%	% wag. / Wt%	% at. / At%
O	39.0	60.4	38.9	62.5	36.4	57.2
Al	0.5	0.3	0.2	3.0	—	—
P	19.9	15.9	11.9	9.9	21.4	16.5
Ca	17.9	11.1	—	—	42.3	26.3
Ti	20.5	10.6	44.2	23.7	—	—
V	0.2	0.6	0.8	0.9	—	—
Ca/P	0.9	0.7			2.0	1.6
Ca/P skorygowany Ca/P corrected	2.2	1.8	—	—	—	—

Pozwala to na uzyskanie stosunku Ca/P około 0,7. Jednakże, jak wspomniano powyżej, zastosowany elektrolit może również wprowadzić dodatkowy fosfor, który zwiększyłby jego zawartość w powłoce, jak wskazano w danych EDS.

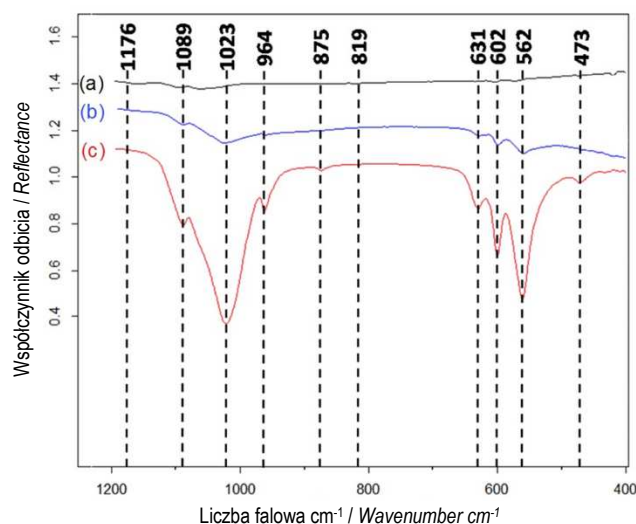
That gives a Ca/P ratio of about 0.7. However, as mentioned above, the electrolyte used can also provide additional phosphorus, which would increase its content in the coating as indicated in the EDS data. The EDS spectrum of

Widmo EDS powłoki utworzonej w elektrolicie bez dodatku n-HA pokazuje, że ilość fosforu wynosi około 10% at. Dlatego można założyć, że około 6% fosforu w powłoce TiO_2 :n-HA przypisuje się fazie n-HA. Daje to stosunek Ca/P około 1,8, który jest zbliżony do stosunku stechiometrycznego w HA, co sugeruje obecność krystalicznego HA w powłoce TiO_2 :n-HA. Rys. 3b przedstawiono dokładnie widoczną obecność środka przeciwdrobnoustrojowego Ag, który sugeruje mechanizm redukcji srebra z powodu działania fotokatalizy na powierzchni warstwy TiO_2 [20] i został potwierdzony analizą EDX. Rys. 4b obrazuje zawartość Ag określoną na poziomie 4,59% wag. (1,18 at. %).

Obecność nanoproszku HA w wytworzonych techniką PEO powłokach TiO_2 :n-HA zweryfikowano za pomocą spektroskopii w podczerwieni z transformatą Fouriera (FTIR). Rys. 5 pokazuje skany widma IR dla czystego nanoproszku HA, utworzonej techniką PEO powłoki TiO_2 :n-HA i niemodyfikowanego podłoża stopu tytanu Ti-6Al-4V. Można zauważyć, że widma FTIR nanoproszku HA i powłoki TiO_2 :n-HA mają podobne piki przy 1089, 1023, 964, 602, 562 i 473 cm^{-1} , podczas gdy podłoże Ti-6Al-4V nie wykazuje żadnych zauważalnych pików w tym samym zakresie długości fal.

the coating formed in the electrolyte without n-HA addition shows that the amount of phosphorus is about 10 at.%. Therefore, it can be assumed that about 6 at.% of phosphorus in the TiO_2 :n-HA coating is attributed to the n-HA phase. This results in the Ca/P ratio around 1.8, which is close to the stoichiometric ratio in HA, suggesting the presence of crystalline HA in the TiO_2 :n-HA coating. Fig. 3b presents clearly visible trace of Ag antimicrobial agent which suggests silver reduction mechanism due to photocatalysis action on the surface of TiO_2 layer [20] and confirmed by EDX analysis Fig. 4b, where Ag content were found at 4.59 wt.% (1.18 at.%).

The presence of HA nanopowder in the PEO-formed TiO_2 :n-HA coatings was verified using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). Figure 5 shows the wide scan IR spectra for the pure HA nanopowder, PEO-formed TiO_2 :n-HA coating and non-coated Ti-6Al-4V titanium alloy substrate. It can be seen that that FTIR spectra of HA nanopowder and TiO_2 :n-HA coating have similar bands at 1089, 1023, 964, 602, 562 and 473 cm^{-1} , while the Ti-6Al-4V substrate did not exhibit any noticeable peaks in the same wavelength range.



Rys. 5. Widma FTIR (a) podłoża ze stopu tytanu Ti-6Al-4V, (b) powłoki TiO_2 :n-HA utworzonej techniką PEO i (c) nanoproszek HA (nanoXIM-HAp303)

Fig. 5. FTIR spectra of (a) Ti-6Al-4V titanium alloy substrate, (b) PEO-formed TiO_2 :n-HA coating, and (c) HA nanopowder (nanoXIM-HAp303)

Cztery wzorce wzbudzenia odpowiadające pozycjom pików grupy fosforanowej PO_4^{3-} w teorii to odpowiednio:

- pik przy około 960 cm^{-1} (symetryczny tryb rozciągania P-O);
- pik w obszarze około $470\text{--}440\text{ cm}^{-1}$;
- pik w obszarze $1190\text{ do }976\text{ cm}^{-1}$ (tryb rozciągania antysymetrycznego P-O);
- pik w obszarze $600\text{ do }560\text{ cm}^{-1}$ (tryb zginania antysymetrycznego P-O) [21–23].

Zaobserwowano, że dla próbek zawierających HA charakterystyczne prążki związane z wibracjami PO_4^{3-} pojawiają się przy 1089 , 1023 , 602 , 563 i 475 cm^{-1} [24, 25]. Zgodnie z eksperymentalnie obserwowanymi częstotliwościami pasmowymi i dużym podobieństwem widm FTIR badanych powłok TiO_2 :n-HA utworzonych techniką PEO i nanoproszku HA, można potwierdzić wbudowanie nanocząstek HA w osnowę powłoki TiO_2 , uwzględniając wcześniejsze obserwacje morfologii powierzchni podczas analizy SEM (rys. 1e, 1f). Zauważalna różnica w intensywności pików między nanoproszkiem HA i powłoką TiO_2 :n-HA może wynikać, że stosunkowo niskiego stężenia nanocząstek osadzonych w powłoce.

4. WNIOSKI

W niniejszym artykule zaproponowano nowy sposób bezpośredniego włączenia dobrze wykrywalnych nanocząstek HA i nanocząstek Ag do warstwy TiO_2 utworzonej na podłożach materiałów implantów Ti (Grade 2) i Ti6Al4V (Grade 5).

Wyniki tego artykułu pokazują, że:

- efektywność obróbki PEO do wytwarzania bioaktywnych warstw powłok TiO_2 zawierających n-HA na powierzchni materiałów na bazie Ti;
- zgodnie z badaniem, powłoki PEO mają porowatą strukturę sieciową z osadzonymi nanocząstkami hydroksyapatytu równomiernie rozmieszczonymi na całej powierzchni powłoki; ponadto, morfologia powierzchni warstw powłoki TiO_2 : n-HA utworzonej techniką PEO jest podobna do wytworzonej powłoki na powierzchni handlowego TiUnite;

The four vibration patterns corresponding peak positions of the phosphate group PO_4^{3-} in theory respectively are:

- *a peak at around 960 cm^{-1} (symmetric stretching mode of P-O);*
- *a peak in the around $470\text{ to }440\text{ cm}^{-1}$ region;*
- *peak at $1,190\text{ to }976\text{ cm}^{-1}$ region (antisymmetric stretching mode of P-O);*
- *a peak in the $600\text{ to }560\text{ cm}^{-1}$ region (antisymmetric bending mode of P-O) [21–23].*

It has been reported that for the HA containing samples, the characteristic bands associated with PO_4^{3-} vibrations appear at 1089 , 1023 , 602 , 563 and 475 cm^{-1} [24, 25]. Thus, according to the experimentally observed band frequencies and the close similarity between the FTIR spectra of the investigated PEO-formed TiO_2 :n-HA coatings and HA nanopowder, the incorporation of HA nanoparticles in the TiO_2 matrix of the coating can be confirmed, supporting earlier observations of surface morphology during SEM analysis (Fig. 1e, 1f). The noticeable difference in peak intensity between the HA nanopowder and the TiO_2 :n-HA coating can be explained assuming a relatively low concentration of the nanoparticles imbedded into the coating.

4. CONCLUSIONS

In this paper, a new method is proposed to directly incorporate well-crystallized nano-HA particles and Ag nanoparticles into the TiO_2 layer formed on Ti (Grade 2) and Ti6Al4V (Grade 5) substrate implant materials.

The results of this paper demonstrate:

- *the effectiveness of PEO treatment for the production of a bioactive n-HA incorporated TiO_2 coating layers on the surface of Ti based materials;*
- *according to the study PEO coatings have a porous network structure with embedded hydroxyapatite nanoparticles uniformly distributed over the entire coating surface; moreover, the surface morphology of PEO-formed TiO_2 :n-HA coating layers is similar to TiUnite commercially available surface;*

- przeciwdrobnoustrojowe właściwości kontrolowanej wielkości porów bioaktywnej powłoki PEO można zapewnić przez osadzanie cząstek Ag, pod wpływem fotokatalizy na powierzchni warstwy powłoki TiO₂: n-HA.

Konieczne są jednak dalsze badania, aby odpowiedzieć na pytania dotyczące biokompatybilności i osteointegracji oraz zrozumienia antybakteryjnych właściwości warstw tworzone techniką PEO takie, jak badania komórkowe *in vitro* i *in vivo*.

PODZIĘKOWANIA

Autor dziękuje za wsparcie Ministerstwu Badań i Innowacji prowincji Ontario w Kanadzie oraz Uniwersytetowi w Windsorze.

LITERATURA

- [1] Niinomi M., M. Nakai, J. Hieda. 2012. „Development of new metallic alloys for biomedical applications”. *Acta. Biomater.* 8: 3888–3903.
- [2] Niinomi M. 2008. „Biologically and Mechanically Biocompatible Titanium Alloys”. *Mater. Trans.* 10: 2170–2178.
- [3] Fadl-allah S., M. Quahtany, N. El-Shenaw. 2013. „Surface Modification of Titanium Plate with Anodic Oxidation and Its Application in Bone Growth”. *J. Biomater. Nanobiotech.* 4: 74–83.
- [4] Song W.H., H.S. Ryu, S.H. Hong. 2005. „Apatite induction on Ca-containing titania formed by micro-arc oxidation”. *J. Am. Ceram. Soc.* 88: 2642–2644.
- [5] Li L.H., Y.M. Kong, H.W. Kim. 2004. „Improved biological performance of Ti implants due to surface modification by micro-arc oxidation”. *Biomaterials* 25: 2867–2875.
- [6] Dearnley P.A., K.L. Dahm, H. Çimenoglu. 2004. „The corrosion–wear behaviour of thermally oxidised CP-Ti and Ti–6Al–4V”. *Wear* 256: 469–479.
- [7] Kuroda K., M. Okido. 2012. „Hydroxyapatite coating of titanium implants using hydroprocessing and evaluation of their osteoconductivity”. *Bionorg. Chem. Appl.* 2012: 1–7.
- [8] Lee S.H., H.W. Kim, E.J. Lee, H.E. Kim. 2006. „Hydroxyapatite-TiO₂ hybrid coating on Ti implants”. *J. Biomater. Appl.* 20 (3): 195–208.
- [9] Mavis B., A. Cuneyt Tas. 2000. „Dip Coating of calcium hydroxyapatite on Ti–6Al–4V substrates”. *J. Am. Ceram. Soc.* 83: 989–991.

- the antimicrobial properties of controlled pore size of PEO bioactive coating might be ensured by deposition of Ag particles due to the effect of photo catalysis at the surface of TiO₂:n-HA coating layer.

However, further studies are needed to answer the questions of biocompatibility and osseointegration, and understanding of antimicrobial properties of PEO-formed layers such as *in vitro* cell tests, and *in vivo* tests.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author acknowledges support of Ontario Ministry of Research and Innovation and University of Windsor.

REFERENCES

- [1] Niinomi M., M. Nakai, J. Hieda. 2012. „Development of new metallic alloys for biomedical applications”. *Acta. Biomater.* 8: 3888–3903.
- [2] Niinomi M. 2008. „Biologically and Mechanically Biocompatible Titanium Alloys”. *Mater. Trans.* 10: 2170–2178.
- [3] Fadl-allah S., M. Quahtany, N. El-Shenaw. 2013. „Surface Modification of Titanium Plate with Anodic Oxidation and Its Application in Bone Growth”. *J. Biomater. Nanobiotech.* 4: 74–83.
- [4] Song W.H., H.S. Ryu, S.H. Hong. 2005. „Apatite induction on Ca-containing titania formed by micro-arc oxidation”. *J. Am. Ceram. Soc.* 88: 2642–2644.
- [5] Li L.H., Y.M. Kong, H.W. Kim. 2004. „Improved biological performance of Ti implants due to surface modification by micro-arc oxidation”. *Biomaterials* 25: 2867–2875.
- [6] Dearnley P.A., K.L. Dahm, H. Çimenoglu. 2004. „The corrosion–wear behaviour of thermally oxidised CP-Ti and Ti–6Al–4V”. *Wear* 256: 469–479.
- [7] Kuroda K., M. Okido. 2012. „Hydroxyapatite coating of titanium implants using hydroprocessing and evaluation of their osteoconductivity”. *Bionorg. Chem. Appl.* 2012: 1–7.
- [8] Lee S.H., H.W. Kim, E.J. Lee, H.E. Kim. 2006. „Hydroxyapatite-TiO₂ hybrid coating on Ti implants”. *J. Biomater. Appl.* 20 (3): 195–208.
- [9] Mavis B., A. Cuneyt Tas. 2000. „Dip Coating of calcium hydroxyapatite on Ti–6Al–4V substrates”. *J. Am. Ceram. Soc.* 83: 989–991.

- [10] Wei D., Y. Zhou, D. Jia, Y. Wang. 2008. „Chemical treatment of TiO₂-based coatings formed by plasma electrolytic oxidation in electrolyte containing nano-HA, calcium salts and phosphates for biomedical applications”. *Appl. Surf. Sci.* 254: 1775–1782.
- [11] Kim D.-Y., M. Kim, H.-Ee. Kim, Y.-H. Koh, H.-W. Kim. 2009. „Formation of hydroxyapatite within porous TiO₂ layer by micro-arc oxidation coupled with electrophoretic deposition.” *Acta. Biomater.* 5: 2196–2205.
- [12] Wook Y., S. Yong Kwon, D. Hoon Sun, H. Ee Kim. 2009. „Enhanced Cell Integration to Titanium Alloy by Surface Treatment with Microarc Oxidation: A Pilot Study”. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 467 (9): 2251–2258.
- [13] Ms K., R. Jm, S. Ym. 2007. „One-step approach for nano-crystalline hydroxyapatite coating on titanium via micro-arc oxidation”. *Electrochem. Commun.* 9: 1886–1891.
- [14] Jh N., S. Yl, Y. Fy, C. Jz. 2008. „Preparation of hydroxyapatite-containing titania coating on titanium substrate by micro-arc oxidation”. *Mater. Res. Bull.* 43: 45–53.
- [15] Dzhurinskiy D., Y. Gao, E. Strumban, V. Leshchinsky, A. Yerokhin, R. Maev. 2015. „Characterization and corrosion evaluation of TiO₂:n-HA coatings on titanium alloy formed by plasma electrolytic oxidation”. *Surf. Coat. Technol.* 269: 258–265.
- [16] Chiesa R., E. Sandrini, M. Santin, G. Rondelli, A. Cigada. 2003. „Osteointegration of Titanium and Its Alloys by Anodic Spark Deposition and other Electrochemical Techniques: A Review”. *J. Appl. Biomater. Biom.* 1 (2): 91–107.
- [17] Song W.H., Y.K. Jun, Y. Han. 2004. „Biomimetic apatite coatings on micro-arc oxidized titania”. *Biomaterials* 25: 3341–3349.
- [18] Dicu M.M., M. Abrudeanu, J. Millet, S. Moga, V. Rizea. 2012. „Physico-chemical properties of microarc Oxidation of biocompatible coatings on Titanium: influence of electrochemistry Parameters.” *Sci. Bull.* 74: 193–202.
- [19] Sah S., Y. Aoki, .H. Habazaki. 2010. „Influence of phosphate concentration on plasma electrolytic oxidation of AZ80 magnesium alloy in alkaline aluminate solution.” *Mater. Trans.* 51 (1): 94–102.
- [20] Ohk S., H. Hwang. 2012. Other Applications of Photo Catalyst in Dental Treatments in Diverse Fields. *W Orthodontics – Basic Aspects and Clinical Considerations*. InTech Europe.
- [21] Zhao Y., Y. Huang, J. Zhu, S. Zhu. 2011. „Characteristics of functionalized nanohydroxyapatite and internalization by human epithelial cell.” *Nano. Res. Lett.* 6: 600.
- [22] Mangaly R., A. Bandyopadhyay, S. Bose. 2011. „Induction Plasma Sprayed Nano Hydroxyapatite Coatings on Titanium for Orthopaedic and Dental Implants”. *Surf. Coat. Technol.* 25: 2785–2792.
- [10] Wei D., Y. Zhou, D. Jia, Y. Wang. 2008. „Chemical treatment of TiO₂-based coatings formed by plasma electrolytic oxidation in electrolyte containing nano-HA, calcium salts and phosphates for biomedical applications”. *Appl. Surf. Sci.* 254: 1775–1782.
- [11] Kim D.-Y., M. Kim, H.-Ee. Kim, Y.-H. Koh, H.-W. Kim. 2009. „Formation of hydroxyapatite within porous TiO₂ layer by micro-arc oxidation coupled with electrophoretic deposition.” *Acta. Biomater.* 5: 2196–2205.
- [12] Wook Y., S. Yong Kwon, D. Hoon Sun, H. Ee Kim. 2009. „Enhanced Cell Integration to Titanium Alloy by Surface Treatment with Microarc Oxidation: A Pilot Study”. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 467 (9): 2251–2258.
- [13] Ms K., R. Jm, S. Ym. 2007. „One-step approach for nano-crystalline hydroxyapatite coating on titanium via micro-arc oxidation”. *Electrochem. Commun.* 9: 1886–1891.
- [14] Jh N., S. Yl, Y. Fy, C. Jz. 2008. „Preparation of hydroxyapatite-containing titania coating on titanium substrate by micro-arc oxidation”. *Mater. Res. Bull.* 43: 45–53.
- [15] Dzhurinskiy D., Y. Gao, E. Strumban, V. Leshchinsky, A. Yerokhin, R. Maev. 2015. „Characterization and corrosion evaluation of TiO₂:n-HA coatings on titanium alloy formed by plasma electrolytic oxidation”. *Surf. Coat. Technol.* 269: 258–265.
- [16] Chiesa R., E. Sandrini, M. Santin, G. Rondelli, A. Cigada. 2003. „Osteointegration of Titanium and Its Alloys by Anodic Spark Deposition and other Electrochemical Techniques: A Review”. *J. Appl. Biomater. Biom.* 1 (2): 91–107.
- [17] Song W.H., Y.K. Jun, Y. Han. 2004. „Biomimetic apatite coatings on micro-arc oxidized titania”. *Biomaterials* 25: 3341–3349.
- [18] Dicu M.M., M. Abrudeanu, J. Millet, S. Moga, V. Rizea. 2012. „Physico-chemical properties of microarc Oxidation of biocompatible coatings on Titanium: influence of electrochemistry Parameters.” *Sci. Bull.* 74: 193–202.
- [19] Sah S., Y. Aoki, .H. Habazaki. 2010. „Influence of phosphate concentration on plasma electrolytic oxidation of AZ80 magnesium alloy in alkaline aluminate solution.” *Mater. Trans.* 51 (1): 94–102.
- [20] Ohk S., H. Hwang. 2012. Other Applications of Photo Catalyst in Dental Treatments in Diverse Fields. *In Orthodontics – Basic Aspects and Clinical Considerations*. InTech Europe.
- [21] Zhao Y., Y. Huang, J. Zhu, S. Zhu. 2011. „Characteristics of functionalized nanohydroxyapatite and internalization by human epithelial cell.” *Nano. Res. Lett.* 6: 600.
- [22] Mangaly R., A. Bandyopadhyay, S. Bose. 2011. „Induction Plasma Sprayed Nano Hydroxyapatite Coatings on Titanium for Orthopaedic and Dental Implants”. *Surf. Coat. Technol.* 25: 2785–2792.

- [23] Sallam S.M., K.M. Tohami, A.M. Sallam, L.I. Abo Salem, F.A. Mohamed. 2012. „Synthesis and characterization of hydroxyapatite contain chromium”. *J. Biophys. Chem.* 3 (4): 278–282.
- [24] Mitsionis A., T. Vaimakis, C. Trapalis, N. Todorova, D. Bahnemann, R. Dillert. 2011. „Hydroxyapatite /titanium dioxide nanocomposites for controlled photocatalytic no oxidation”. *Applied Catalysis B: Environmental* 106: 398–404.
- [25] Panda R.N., M.F. Hsieh, R.J. Chung, T.S. Chin. 2003. „FTIR, XRD, SEM and solid state NMR investigations of carbonate-containing hydroxyapatite nano-particles synthesized by hydroxide-gel technique”. *J. Phys. Chem. Solids.* 64: 193–199.
- [23] Sallam S.M., K.M. Tohami, A.M. Sallam, L.I. Abo Salem, F.A. Mohamed. 2012. „Synthesis and characterization of hydroxyapatite contain chromium”. *J. Biophys. Chem.* 3 (4): 278–282.
- [24] Mitsionis A., T. Vaimakis, C. Trapalis, N. Todorova, D. Bahnemann, R. Dillert. 2011. „Hydroxyapatite /titanium dioxide nanocomposites for controlled photocatalytic no oxidation”. *Applied Catalysis B: Environmental* 106: 398–404.
- [25] Panda R.N., M.F. Hsieh, R.J. Chung, T.S. Chin. 2003. „FTIR, XRD, SEM and solid state NMR investigations of carbonate-containing hydroxyapatite nano-particles synthesized by hydroxide-gel technique”. *J. Phys. Chem. Solids.* 64: 193–199.