

BIOMIMETYCZNY WZROST FOSFORANÓW NA ZMODYFIKOWANEJ POWIERZCHNI BIOKOMPozyTU WĘGLOWEGO

A. STOCH*, A. BROŻEK*, J. STOCH**, W. JASTRZĘBSKI*,
E. DŁUGOŃ*, M. SITKO*

*WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI
AKADEMII GÓRNICZO-HUTNICZEJ W KRAKOWIE

**INSTYTUT KATALIZY I FIZYKOCHEMII POWIERZCHNI
POLSKIEJ AKADEMII NAUK W KRAKOWIE

Streszczenie

Postęp w regeneracji kości jest wymuszany przez opracowanie licznych materiałów zastępczych na podstawie metalu, ceramiki lub polimerów. Bioaktywna ceramika wiąże się z żywą kością poprzez warstwę apatyty podobnego jak w kości, który w otoczeniu biologicznym tworzy się na jej powierzchni, zawierając drobnokrystaliczny, węglanowy hydroksyapatyt o zdeformowanej strukturze. Uważa się, że powstawanie tego apatyty jest nieodzowne dla utworzenia silnych wiązań chemicznych będących „conditio sine qua non” mocnego złącza implantu z kością. Celem pracy było uzyskanie takiej modyfikacji chemicznej implantu, aby *in vivo* na jego powierzchni można było łatwo wywołać zarodkowanie heterogeniczne i wzrost apatyty z naturalnego osocza. Testy laboratoryjne wykonano na handlowych preparatach czystego tytanu oraz kompozytach węgiel-węgiel. Po wstępnej obróbce, próbki pokrywano roztworami sol-gel tytano-krzemowo-wapniowymi, krzemowo-wapniowymi lub krzemowymi, a na koniec wygrzewano. Następnie termostatowano je w warunkach fizjologicznych mocząc w sztucznym (SBF) lub w naturalnym (NBF) osoczu do 30 dni. Występuje zgodność poglądów, że w SBF reakcje które *in vivo* zachodzą w obszarze powierzchni, są równie dobrze przebiegające *in vitro*. W tych warunkach apatyt podobny do kości odkładał się w procesie biomimetycznym, podobnym jak *in vivo* na materiałach bioaktywnych. Kolejne etapy wzrostu apatyty na powierzchni tytanu lub zmodyfikowanego węgla były dokumentowane metodą spektroskopii w podczerwieni. Metodą dyfrakcji rentgenowskiej ustalono skład fazowy osadów fosforanowych a morfologię i skład chemiczny badano stosując SEM-EDEX. Na badanych powierzchniach stwierdzono nukleację i wzrost apatyty zawierającego węglany. Był on wydajniejszy na powierzchniach krzemowo-wapniowych i na tytano-krzemowo-wapniowych niż na krzemowych. Zarodki apatyty zawierającego węglany powstawały i rosły pobierając jony wapniowe i fosforanowe z roztworu SBF. Osadzanie apatyty było wydajniejsze z NBF niż SBF. Ta obserwacja wzmacnia przypuszczenie, że białka również działają jako centra zarodkowania. Uzyskane obrazy powierzchni przypominały kalafior, praktycznie niezależne od użytego powiększenia. To własne podobieństwo mikro i makro kształtów potwierdza fraktalną naturę tej powierzchni, swoją drogą, rodzącej bardzo aktywne obszary powierzchniowe.

BIOMIMETIC GROWTH OF PHOSPHATES ON MODIFIED BIOCARBON SURFACE

23
.....

A. STOCH*, A. BROŻEK*, J. STOCH**, W. JASTRZĘBSKI*,
E. DŁUGOŃ*, E. SITKO*

DEPARTMENT OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS
UNIVERSITY OF MINING AND METALLURGY, CRACOW, POLAND
*INSTITUTE OF CATALYSIS AND SURFACE CHEMISTRY
POLISH ACADEMY OF SCIENCES, CRACOW, POLAND

Abstract

Numerous bone substitutes made of metals, ceramics and polymers have been developed to promote bone regeneration. The bioactive ceramics bonds to bone through a layer of bone-like apatite which is formed on their surfaces in the body and is characterised by a carbonate-containing hydroxyapatite with small crystallites and defected structure. It is believed that formation of this apatite is inevitable to form strong chemical bonds being *conditio sine qua non* of the strong implant-bone joint. The aim of this work was to get such a chemical modification of the implant that *in vivo* conditions on its surface heterogeneous nucleation of apatite from the body fluid could be easily induced and grown. The laboratory experiments were carried on commercial pure titanium or carbon-carbon composite materials. After a preliminary treatment the samples were coated with titania-silica-calcium or silica-calcium or silica from sol-gel solutions and finally heated. Then they were soaked thermostatically under physiological conditions in the simulated body fluid (SBF) or in natural body fluid (NBF) for up to 30 days. It has already been observed that in the SBF reactions that *in vivo* would take place near the implant surface are *in vitro* well reproduced. In such conditions a bone-like apatite was deposited by the biomimetic process, similar to that, formed *in vivo* on bioactive materials. Consecutive steps of the apatite growth on titanium, or carbon-modified surfaces were monitored by infrared spectroscopy. XRD controled a phase state of phosphate precipitates after the soaking course. Morphology and chemical composition of phosphates were studied with SEM-EDEX. It was found that nucleation and growth of carbonate containing apatite took place at the surface. It was more effective on silica-calcium and on titania-silica-calcium than on silica substrates. Apatite nuclei containing carbonates were formed and they grew by uptake of calcium and phosphate ions from the SBF solution. The NBF, comparing with SBF much enhanced the apatite precipitation. This observation supports suggestion that also proteins can act as nucleation centres. The obtained pictures of the surface resembled cauliflower nearly independently of the magnification chosen. This self similarity in macro and micro shapes verifies the fractal nature of the surface which in turn, created very active surface area.

Liczne organizmy żywe: rośliny, zwierzęta i ludzie, wytwarzają swoje biomineralne szkielety kostne będące ceramicznymi kompozytami zbudowanymi w warunkach naturalnych z łatwo dostępnych pierwiastków zazwyczaj w środowisku wodnym. Prosty przykładem może być muszla perłowa małży, skorupki jaj czy też nasze kości i zęby (zębina i emalia zębowa) [1].

Medycyna często staje przed koniecznością zastąpienia lub wymiany uszkodzonych kości budząc zapotrzebowanie na coraz lepsze materiały i lepsze sposoby ich otrzymywania. Obserwuje się więc ciągle postęp w nauce o materiałach i inżynierii materiałowej a pewna grupa badaczy analizując i podpatrując sposoby wytwarzania przez przyrodę niektórych materiałów podjęła się jej naśladowania (ang. mimic), w wyniku czego powstała nowa, biomimetyczna strategia otrzymywania biomateriałów [2].

Już zwykłe zasady ekonomii sugerują, aby przy otrzymywaniu materiałów kompozytowych naśladować procedury znane w układach biologicznych, co może także pozwolić na uzyskanie odpowiednich właściwości fizycznych, elektrycznych i mechanicznych, niekoniecznie osiągalnych przy użyciu technologii konwencjonalnych. Takie wytwarzanie syntetycznych materiałów nazywa się mimesyzysem, ponieważ naśladuje ono podstawowe schematy procesów biologicznych chociaż technologia ta praktycznie odbywa się bez udziału naturalnego środowiska biologicznego [3, 4].

Wzrasta zainteresowanie biomimetycznym sposobem wytwarzania powłok fosforanowych na implantach [5,6]. Powłoki takie powstają podczas przetrzymywania implantu w syntetycznym osoczu (SBF) w temperaturze 37°C, czyli w warunkach podobnych jak podczas powstawania naturalnego apatytu. Kokubo [7], wykorzystując rozpuszczalność bioaktywnych szkieł, badał biomimetyczne osadzanie powłok fosforanów wapniowych na różnych materiałach w temperaturze pokojowej.

W naszym laboratorium prowadzono biomimetyczne osadzanie apatytu na biomateriałach węglowych z zastosowaniem SBF [8-10]. Mamy nadzieję na wykorzystanie tego sposobu do otrzymywania powłok bioaktywnych na implantach. Dla łatwiejszego wytwarzania powłok fosforanowych podczas termostatowania w SBF, podłoże kompozytu węglowego jest najpierw poddawane modyfikacji poprawiającej jego aktywność biologiczną.

CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

Jako podłoże stosowano kompozyty węglowe 1D i 2D, otrzymane w Katedrze Ceramiki Specjalnej AGH. Próbkę przed zanurzeniem w SBF pokrywano powłoką CaO-SiO_2 (CS) stosując technikę sol-gel [9]. Próbkę zanurzano w roztworze SBF, sporządzonym zgodnie z Kokubo [11] a skład

Many living organisms, plants, animals and human beings produce biomineral skeletons, which are ceramic composites containing readily available elements, usually obtained in aqueous media and at ambient conditions. The plainest examples are nacreous shell formation, eggshells or our bones, dentine and enamel [1].

Medicine often faces the necessity to substitute or exchange defected original bones which induces the search for improved materials and better processing methods. Continual development is observed in the area of materials science and engineering. On analysing the formation of materials in nature a group of scientists suggested that natural processes might be mimicked which gave rise to totally novel biomimetic strategy [2].

The economic rules suggest that the processing strategies used by biological systems should be mimicked to fabricate the composite materials with desired physical, electrical and mechanical properties, currently unavailable by conventional technologies. Such fabrication of synthetic materials is referred to as mimetic because it mimics the basic biological processing schemes, although takes place outside the natural biological context [3, 4].

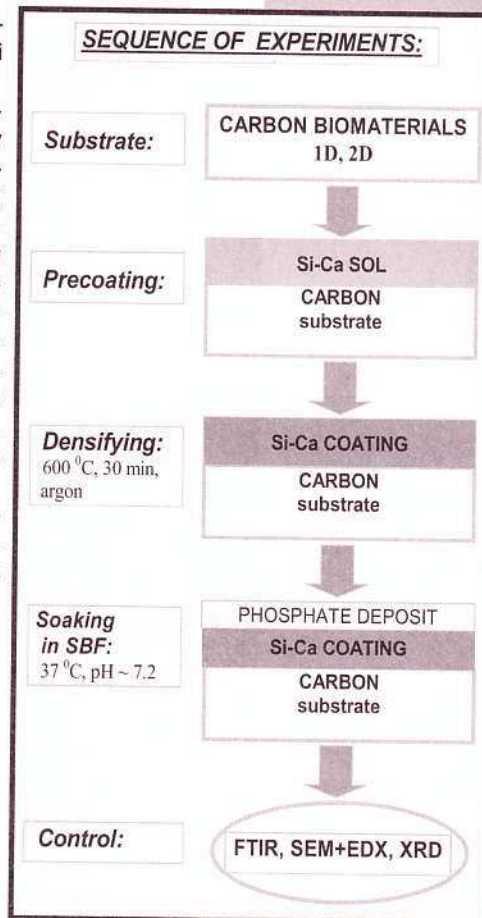
There is an increasing interest in biomimetic preparation of phosphate coatings on implanted materials [5, 6]. Such coatings are produced on implants by immersion in a simulated body fluid (SBF) at the temperature as low as 37°C to mimic the natural process of apatite formation. Kokubo [7] has developed a biomimetic coating of calcium phosphate, which can be applied for any material at room temperature by utilising solubility of bioactive glass in SBF.

In our laboratory we investigate the biomimetic coating of apatite on carbon biomaterials with the use of SBF [8-10]. We expect to apply this technique in the manufacturing of bioactive coatings on implants. Prior to preparation of these phosphate coatings, the substrates have to be pre-treated to improve their originally not high enough bioactivity for easy induction of the apatite deposition from SBF.

EXPERIMENTAL

The substrate biomaterials were two forms of carbon denoted as 1D and 2D, made in the Department of Special Ceramics of AGH. The samples prior to soaking were coated with the $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ sol-gel layer [9]. The soaking procedure was performed in the SBF solution prepared according to Kokubo [11] with the ion concentrations almost equal to those of human blood plasma. The fluid was buffered at pH 7.2 with the mixture of 50 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane and 45 mM HCl.

The carbon samples were pre-coated in a calcium-silica (CS) sol solutions using dipping-withdrawing technique and subsequently they were baked for 30 min at 600°C in argon. Then the samples were soaked thermostatically under physiological conditions in SBF for up to 30 days, at



RYS. 1. Kolejność czynności eksperymentalnych.

FIG. 1. Sequence of experiments.

Pasma Bands	1D				2D			
	a) świeża as received		b) pokryta treated		1. świeża as received		2. pokryta treated	
	BE*eV	zawartość content	BE*eV	zawartość content	BE*eV	zawartość content	BE*eV	zawartość content
C1s	284.8	0.846	284.8	0.273	284.8	0.866	284.8	0.626
Ca2p	348.3	0.005	347.7	0.019	348.2	0.008	347.4	0.054
Si2p	103.8	0.002	103.9	0.172	102.4	0.014	103.1	0.063
O1s	532.7	0.146	533.4	0.536	532.7	0.112	532.5	0.257
Atomic ratios:								
Ca/Si	2		0.11		0.57		0.86	
(Ca+Si)/C	0.008		0.70		0.025		0.19	
O/C	0.17		2.0		0.13		0.41	
E/C	0.18		2.7		0.15		0.60	

* Energia wiązania najmocniejszego, głównego pików.

* Binding energy of the most distinct, prominent peak.

TABELA 1.
TABLE 1.

chemiczny osocza był bardzo zbliżony do składu osocza ludzkiego. Odczyn osocza wynosił pH = 7.2 utrzymywany przez bufor TRIS z dodatkiem kwasu solnego.

Próbki węgla pokrywano powłoką CS stosując technikę wynurzania a następnie wygrzewano je w 600°C przez 0.5 h w atmosferze argonu. Następnie próbki termostutowano w SBF w warunkach fizjologicznych w różnych odstępach czasowych (do 30 dni). Podczas termostutowania roztwór SBF wymieniano na świeży co 3-5 dni.

Do analizy chemicznego składu powierzchni podłoża jak również powłoki CS zastosowano metodę XPS. Widma otrzymywano na spektrometrze fotoelektronowym VG Scientific ESCA-3 z anodą Al będącą źródłem promieniowania pobudzającego ($h\nu = 1486.6\text{eV}$) oraz z linią referencyjną C1s przy 284.8 eV.

Analizę fazową wydzielen fosforanowych otrzymywanych podczas termostutowania w SBF wykonano z zastosowaniem Fourierowskiej Spektroskopii w Podczerwieni (FTIR). Widma transmisyjne FTIR rejestrowano w zakresie 400-4000 cm^{-1} na spektrometrze Bio-Rad FTS-60V. Morfologię wydzielen badano w mikroskopie skaningowym (SEM) Phillips XL 30, wyposażonym w dyspersyjny analizator promieniowania (Link ISIS-EDX).

Na RYS. 1 przedstawiono schemat przebiegu eksperymentów laboratoryjnych.

WYNIKI I DYSKUSJA

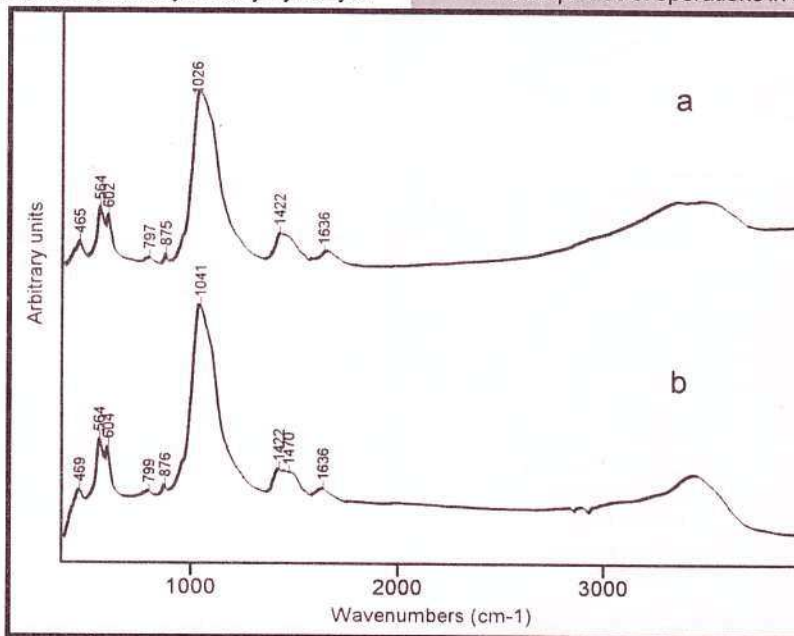
Biokompozyty węglowe są wysoko zwęglonymi produktami

various daily intervals; SBF was renewed every 3-5 days.

XPS was used for the analysis of chemical composition of substrate surfaces and intermediate calcium-silica pre-coatings. The spectra were obtained with a VG Scientific ESCA-3 photoelectron spectrometer with Al anode X-ray source (1486.6eV) and referenced to the C1s line at 284.8 eV.

Phase analysis of the phosphate precipitates produced upon soaking was performed with Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). The FTIR spectra were recorded in the transmission spectral mood in the 400-4000 cm^{-1} range using Bio-Rad FTS-60V spectrometer. The morphology of deposits was monitored using scanning electron microscope (SEM) Phillips XL 30, equipped with an energy dispersive X-Ray analyser (Link ISIS-EDX).

The sequence of operations in our laboratory experiments is shown in FIG.1.



RYS. 2. Widma transmisyjne w podczerwieni wydzielen fosforanowych na kompozytach węglowych 1D (a) i 2D (b), pokrytych uprzednio powłoką CS, po 3 dniach termostutowania w SBF.

FIG. 2. FTIR transmission spectra of phosphate deposits on carbon composites 1D (a) and 2D (b) precoated with CS, after 3 days of incubation in SBF.

RESULTS AND DISCUSSION

Carbon biocomposites were highly carbonised products obtained from carbon fibres and polymers with very small amount of mineral additives. Surface composition of 1D and 2D samples was examined with XPS at different stages: a) as received (denoted 1D₀ and 2D₀) and b) after the treatment with calcium-silica (CS) sol and subsequent annealing at 600°C for 0.5h in argon (1D₁ and 2D₁ samples).

All binding energies were referenced to the main C1s peak at 284.8 eV. Relative content of elements was obtained

uzyskanymi na bazie włókien węglowych i polimerów. Skład chemiczny powierzchni próbek 1D i 2D badano metodą XPS w formie a) wyjściowej oraz b) po nałożeniu powłoki CS i wygrzaniu jej przez 0.5 h w atmosferze argonu.

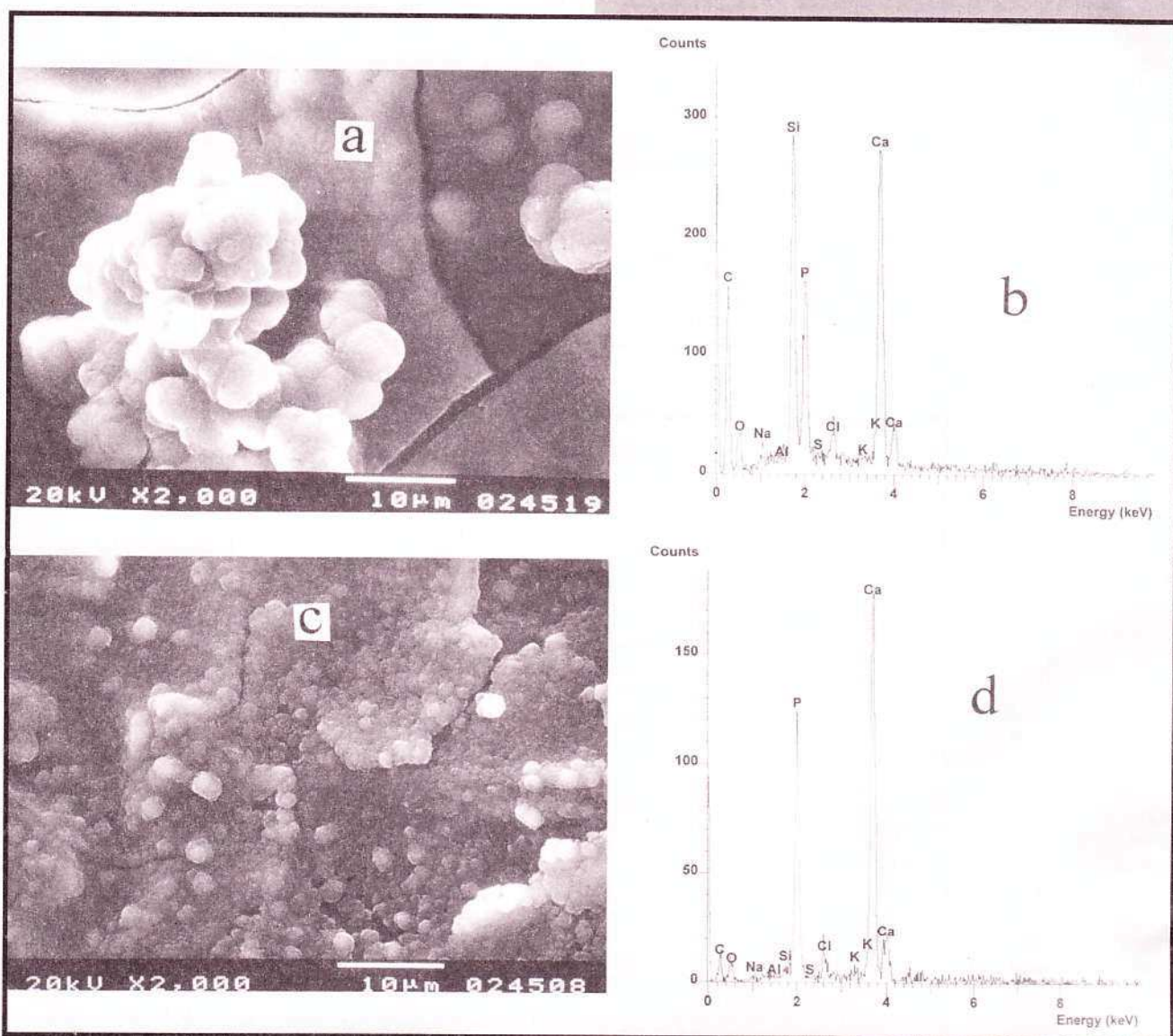
Wszystkie energie wiązania odniesiono do głównego piksu C1s przy 284.8 eV. Względną zawartość pierwiastków na powierzchni liczone przez całkowanie powierzchni pod pikiem XPS. Przy obliczeniach stosowano przekroje czynne Scofield'a (C,O) oraz eksperymentalnie wyznaczone współczynniki czułości (Ca, Si). Wyniki zestawiono w TABELI 1.

Powierzchnia próbki 1D i 2D w stanie wyjściowym składała się z elementarnego węgla lub z węgla w hybrydacji sp^3 . Te wyjściowe powierzchnie były częściowo utlenione (15-11%). Niższy poziom utlenienia w próbce 2D można wiązać z jej wyższą powierzchnią właściwą a obydwa te czynniki mogą być przyczyną niższego pokrycia powierzchni kompozytu węglowego zolem CS. Ten ostatni efekt nie świadczy więc o pełnej masie depozytu. Obydwa substraty zawierały początkowo również niewielkie ilości (5-8%) wapnia i krzemu. Ich łączna ilość (2.5-krotnie wyższa w 2D) wydaje się nie odgrywać pozytywnej roli w powstawaniu powłoki, jak się wydaje do 4,5 razy (por. E/C) mniej efektywnie.

from the integrated XPS peak areas. In the calculations, Scofield cross-sections (C,O) and experimental sensitivity factors (Ca, Si) were used. Results are given in TABLE 1.

The surface of 1D and 2D substrates in the as-received state was composed of elemental carbon, or carbon in the sp^3 hybridisation. These initial surfaces were partly (15-11%) oxidised. In the case of 2D substrate the initially lower oxidation degree can be connected with the greater specific surface. Both these factors could cause much less covering of the bare carbon surface with an oxide coat from the sol. Therefore this last effect does not inform on total volume of the deposit. Both substrates originally contained small amount (5-8%) of silicon and calcium atoms. Their joint content (by 2.5 higher in 2D) seemingly did not reveal any positive influence on the coat formation, which appeared (see E/C) by 4.5 times less effective.

The less porous and cleaner the 1D substrate accepted 40% coverage with the oxide coat containing about 90% silica. The BE Si2p at 103.9 eV and BE O1s at 533.4 eV correspond to its unreacted form. In contrast, under the same conditions the surface of the 2D substrate collected a significantly smaller deposit (16% coverage) composed of almost equal quantities of calcium and silicon, mostly in a



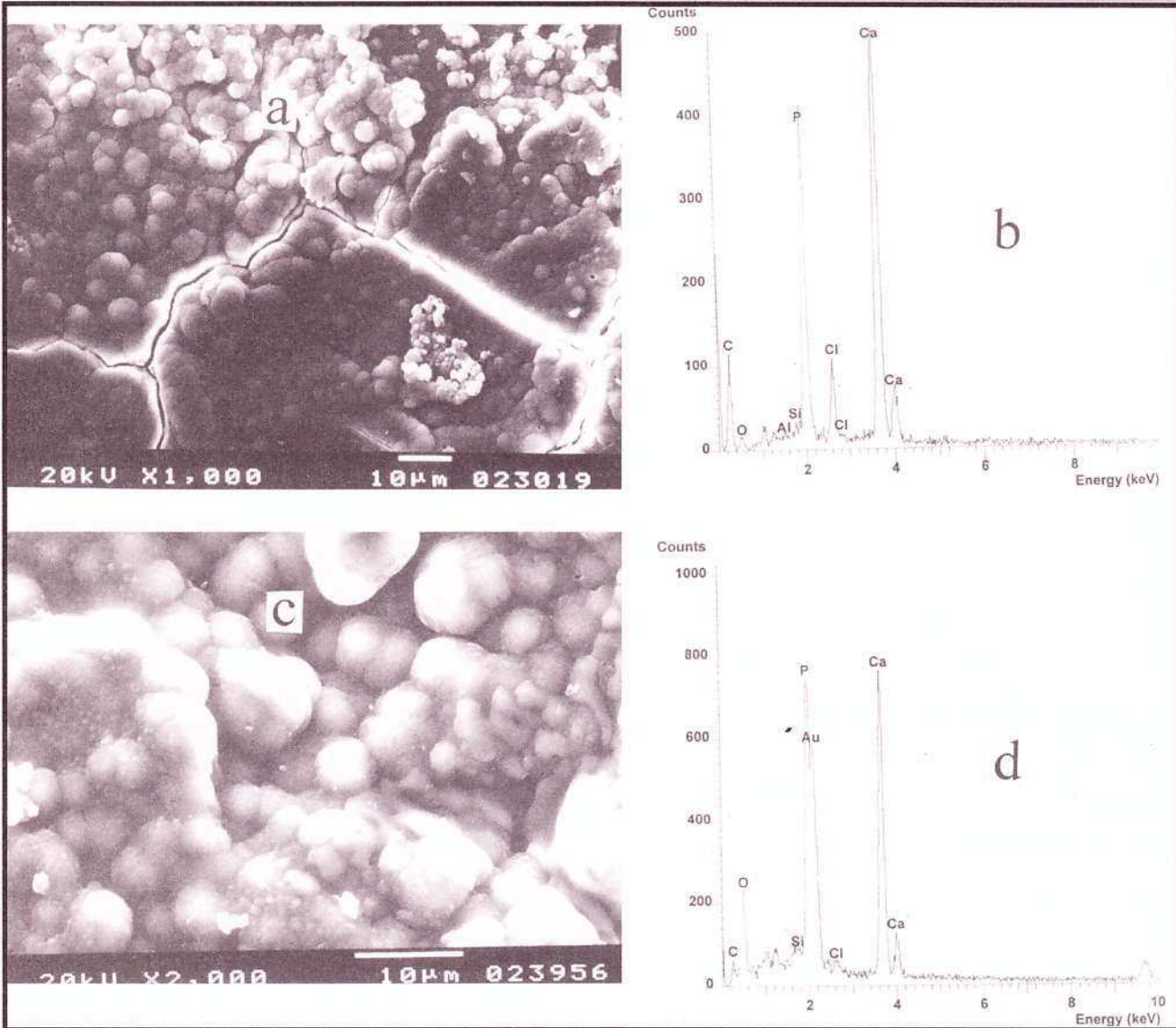
RYS. 3. Obraz SEM i mikroanaliza rentgenowska fosforanowych wydzielin na kompozytach węglowych 1D (a, b) i 2D (c, d), pokrytych uprzednio podpowłoką CS po 3 dniach termostatowania w SBF.

FIG. 3. SEM micrograph of phosphate precipitates on carbon composites 1D (a, b) and 2D (c, d), precoated with CS, after 3 days of incubation in SBF.

Mniej porowate i bardziej czyste podłoże 1D w 40% zostało pokryte przez powłokę tlenkową CS zawierającą ok. 90% krzemionki. Wartości BE Si2p 103,9 eV i BE O1s 533,4 eV wskazują na jej nie przereagowaną postać. Przeciwnie, w tych samych warunkach na powierzchni 2D utworzyła się znacznie mniejsza powłoka (16% pokrycia) zawierająca niemal takie same ilości, wapnia przeważnie związanego z krzemem. Wniosek taki nasuwają wartości BE pasm Si2p (103,1 eV) i O1s (532,5 eV), obie obniżone, typowe dla krzemianów (102,6 eV w krzemianie wapnia [12] i 532,3 eV).

reacted form. This conclusion follows from the BE values of Si2p (103.1 eV) and O1s (532.5 eV) bands, both lowered toward the values characteristic of silicates (102.6 eV and 532.3 eV in calcium silicate [12]).

The XPS results suggest some importance of initial surface oxidation of the carbon substrates in obtaining deposits with different phase structure and chemical composition. As follows from our other earlier studies, nucleation and growth of a phosphate phase on silica is more difficult comparing with calcium-containing phases.



RYS. 4. Obraz SEM i mikroanaliza rentgenowska wydzielań fosforanowych na kompozytach węglowych 1D (a, b) i 2D (c, d), pokrytych uprzednio podpowłoką CS, po 7 dniach termostatowania.

FIG. 4. SEM micrograph and X-Ray microanalysis of phosphate deposits on carbon composites 1D (a, b) and 2D (c, d), precoated with CS, after 7 days of soaking.

Wyniki XPS wskazują na pewne znaczenie początkowego utlenienia powierzchni substratu węglowego dającego depozyty różniące się strukturą fazową i składem chemicznym. Jak wynika ze wstępnych badań, zarodkowanie i wzrost fazy fosforanowej było na krzemionce trudniejsze niż na fazach wapniowych.

Powstawanie osadu fosforanowego i jego późniejsze przemiany śledzono przy pomocy FTIR. Hydroksyapatyt (HAP), główny składnik biologiczny kości ma widmo absorpcyjne IR związane z wibracjami grup fosforanowych i hydroksylowych [6]. Grupy fosforanowe charakteryzują się silnym, złożonym pasmem w zakresie 1000-1150 cm^{-1} , średniej intensywności pasmem na 960 cm^{-1} i pasmami w za-

Formation of the phosphate deposits and their later transformations were monitored with FTIR. Hydroxyapatite (HAP), the main mineral component of a biological bone, shows IR absorption due to vibrational modes from the phosphate and hydroxyl groups [6]. The phosphate groups are characteristic by strong, complex band in the 1000-1150 cm^{-1} range, medium intensity band at about 960 cm^{-1} and bands located at 560-610 cm^{-1} range. Crystalline HAP generates two characteristic hydroxyl (O-H) bands at about 630 cm^{-1} and 3570 cm^{-1} . In biological apatites, some of the orthophosphate (PO_4^{3-}) ions are substituted by carbonate ions. IR spectrum is very sensitive to this carbonate substitution, so even a very small amount of carbonate can be detected.

krucie 560-610 cm^{-1} . Krystaliczny HAP generuje dwa charakterystyczne pasma hydroksylowe (O-H) około 630 i 3570 cm^{-1} . W biologicznych apatytach niektóre jony ortofosforanowe (PO_4^{3-}) są podstawione przez jony węglanowe. Widmo IR jest bardzo czułe na takie podstawienie, tak, że mogą być wykryte nawet bardzo małe ilości węglanów. Węglanowy HAP dostarcza wibracji C-O w zakresie wysokich energii pomiędzy 1410-1470 cm^{-1} i w obszarze niskich energii pomiędzy 850-890 cm^{-1} , położenie pików węglanowego zależy od tego, czy węglan w sieci podstawia grupy hydroksylowe (OH) czy orto-fosforanowe (PO_4^{3-}).

Z RYS. 2a, b widać, że drgania zginające fosforanów (PO_4^{3-}) z maksimum przy 550-600 cm^{-1} są wyraźne, ale widmo jest zdominowane przez pasmo w obszarze 1000-1150 cm^{-1} . Pasma to jest nałożeniem drgań rozciągających Si-O w tetraedrach SiO_4 i drgań rozciągających w tetraedrach PO_4 . Znaczący to, że podłoże po trzech dniach inkubacji pozwoli rozpuszcza się lecz nadal istnieje na powierzchni węgla (zob. także pasma Si-O przy 462-465 cm^{-1} i przy 796). Rozpuszczenie podłoża przyspiesza wytrącanie osadów fosforanu wapnia. Pasma z maksimum przy 1412-1470 cm^{-1} pojawiają się wraz ze słabo określonym pasmem przy ok. 876-881 cm^{-1} znanym jako właściwe dla apatytu węglanowego. Pasma OH przy 630 cm^{-1} i około 3570 cm^{-1} były nieobecne wskazując na niską strukturę krystaliczną apatytu.

Postęp morfologiczny przy wzroście osadu fosforanu podczas termostatowania próbek węglowych 1D i 2D po 3 dniach inkubacji (RYS. 3a,c) pokazuje, że osady na powierzchni węgla 2D powstawały w postaci drobnych ziaren pokrywających całą powierzchnię substratu (RYS. 3c). Fosforany osadzone na powierzchni węgla 1D (RYS. 3a) tworzyły aglomeraty. Analiza mikrorentgenowska w punkcie X (RYS. 3b) mówi, że taki aglomerat zawierał wapń i fosfor. Po 7 dniach termostatowania powierzchnia próbek węgla 1D i 2D (RYS. 4a,c) była jednolicie pokryta ziarnami fosforanów wapnia, jak to wykazała analiza mikrorentgenowska na RYS. 4b,d. Dla porównania, te same eksperymenty z termostatowaniem wykonano na pozbawionych podwarstwy CS próbkach węgla 1D i 2D. Po 3 lub 5 dniach termostatowania w SBF próbki te nie zawierały ani fosforanu ani węgla. To zjawisko wskazuje, że ich powierzchnie były nieaktywne dla zarodkowania apatytu. Dopiero po długim czasie termostatowania w SBF, wynoszącym około 30 dni, mała ilość apatytu została zaobserwowana na tych próbkach węgla bez podwarstwy CS.

Rozważając powyższe wyniki można stwierdzić, że podłoże wapniowo-krzemionkowe (CS) przyspieszało wytrącanie się osadów fosforanowo-węglanowych. Zjawisko było silniejsze dla kompozytu węgla 2D; w tym samym czasie termostatowania osad fosforanowo-węglanowy na powierzchni węgla 2D był rozleglejszy niż na powierzchni węgla 1D. Może to wynikać z różnic w składzie chemicznym podkładów. Chociaż próbki 2D miały powierzchnie do podkładów mniejsze (16%) w porównaniu z 1D (40%) ale osad zawierał znacznie więcej wapnia w stosunku do krzemu, podobnie jak w CaO-SiO_2 . Powstawanie podobnego związku wynika z danych XPS (TAB.1) otwierając pole dla spekulacji o dodatniej roli krzemianu wapnia w procesie zarodkowania fosforanu.

Z drugiej strony morfologia obszaru powierzchniowego może mieć także duże znaczenie. Obie formy węgla różniły się porowatością: otwarta porowatość kompozytu węgla 1D była 4,0-4,5% oraz 2D około 10%. Oznacza to że podczas tworzenia podkładu CS infiltracja solu wapniowo-krzemionkowego do bardziej porowatego obszaru kompozytu 2D była bardziej intensywna niż w przypadku mniej porowatego kompozytu 1D. Skoro podkład CS przyspiesza osadzanie, to przypuszczamy, że podczas termostatowania SBF reagował z krzemionką tworząc grupy silanolowe SiOH, które indukowały zarodkowanie apatytu [6]. Z drugiej stro-

Carbonated HAP yields C-O vibrations in the high-energy region between 1410-1470 cm^{-1} and in the low energy region between 850-890 cm^{-1} . The position of carbonate peak depends upon whether the carbonate substitutes for hydroxyl (OH) or orthophosphate (PO_4^{3-}) groups in the lattice.

In FIG. 2a, b it can be seen that the phosphate (PO_4^{3-}) bending vibrations at 550-600 cm^{-1} are distinct but IR spectrum is dominated by the band in the 1000-1150 cm^{-1} range. That band is a superposition of stretching vibrations of Si-O in SiO_4 tetrahedra and P-O stretching vibrations in PO_4 tetrahedra, which means that calcium-silica precoating after three days of incubation is partly dissolved but still present on the carbon surface (see also Si-O bands at 462-465 cm^{-1} and at 796 cm^{-1}). Dissolution of the precoating accelerates the precipitation of calcium phosphate deposits. The band with maximum at 1412-1470 cm^{-1} appeared along with a weakly defined band at about 876-881 cm^{-1} known to be specific for the carbonated apatite. The OH bands at about 630 cm^{-1} and at about 3570 cm^{-1} are absent, pointing out poor crystallised apatite structure.

Morphological examination of the phosphate deposits grown on the 1D and 2D carbon samples after 3 days of incubation (FIG. 3a, c) shows that precipitates on the latter are fine-grained and cover all the surface (FIG. 3c). Phosphates deposited on the 1D carbon sample (FIG. 3a) form agglomerates. X-Ray microanalysis made at point X (FIG. 3b) indicates that the agglomerate contains calcium and phosphorus. After 7 days of soaking the surface of 1D and 2D carbon samples (FIG.4a,c) was uniformly covered by grains of calcium phosphates, as indicated by X-Ray microanalysis in FIG.4 b,d. For comparison the same soaking experiments were performed with non-precoated 1D and 2D carbon samples. After 3 or 5 days of soaking in SBF such samples contained neither phosphate nor carbonate. This effect indicates that their surface was inactive towards the apatite nucleation. Only after a long time of soaking in SBF, lasting about 30 days, small amount of phosphate precipitates was observed on the non-precoated carbon samples.

On the basis of results presented above it may be concluded that calcium-silica precoatings accelerate the phosphate-carbonate precipitation. The effect was stronger for the 2D carbon composite. After the same time of soaking, the phosphate-carbonate precipitate on the 2D carbon surface was much more pronounced than that on the 1D carbon surface. This may result from different chemical composition of the precoating deposits. Though in the case 2D sample the area under the precoating was smaller (16%) compared with the 1D (40%), the deposit contained much more calcium, with the Ca:Si ratio 1:1, as in CaO-SiO_2 . Formation of a similar compound deduced from the XPS data (TAB. 1) opens the door for speculation on the positive role of calcium silicate in the phosphate nucleation.

On the other hand the morphology of the surface region can be also of great importance. Both carbon samples differed in porosity: the open porosity of the 1D carbon composite was 4.0-4.5% and that of the 2D one was about 10%. It means that during the precoating stage, infiltration of calcium-silica sol to the more porous surface of the 2D composite was much more intensive than to the less porous 1D composite. Since the precoating accelerated deposition, we suppose that upon soaking the SBF reacted with silica forming silanol SiOH groups that induced the apatite nucleation [6]. On the other hand, the calcium ions released from the silica-calcium precoating by overcoming the solubility product with respect to apatite, also accelerated the phosphate-carbonate nucleation.

The discussed processes are of significant importance in the bone remodelling and mineralization at the bone-implant interface and so they become the fundamental ele-

ny, jony wapnia uwolnione z podkładu wapniowo-krzemionkowego, przekraczając iloczyn rozpuszczalności względem apatytu, także przyspieszały zarodkowanie fosforanu węglanowego.

Procesy te posiadają wielkie znaczenie dla przebudowy i mineralizacji w obszarze złącza kość-implant i przez to stają się podstawowymi elementami dobrego umocowania implantu. Dlatego sukces przy wbudowaniu protezy zależy od obecności i aktywności wolnych jonów wapniowych i fosforanowych w złączu, sprawiającymi, że implant stanie się zdolny do chemicznego oddziaływania z otoczeniem biologicznym.

WNIOSKI

Podkład wapniowo-krzemionkowy znajdujący się na powierzchni bio-węgla działa jako skuteczne złącze z podwyższoną zdolnością do wytrącania apatytu węglanowego. Podkłady mogą poprawiać proces mineralizacji na powierzchni bio-węgla.

Biomimetyczne powstawanie biologicznie równoważnego apatytu z SBF na materiałach o niskiej aktywności biologicznej może być tanim sposobem wytwarzania biologicznie czynnych powierzchni implantów.

ments of good implant fixation. Therefore the success of the prosthesis incorporation depends on the presence and activity of free calcium and phosphate ions in the interface because they enable interaction of the implant with the surrounding bone.

CONCLUSIONS

Silica - calcium precoating applied on the biocarbon surface acts as an effective interface with increased ability to precipitate the carbonate apatite. The precoatings can improve the process of mineralization on the biocarbon surface.

Biomimetic formation of the biologically equivalent apatite from SBF on the materials with low biological activity can be a low-cost way in the production of biologically active implant surfaces.

Piśmiennictwo

- [1] G. K. Hunter, "Interfacial Aspects of Biomineralisation", *Current Opinion of Solid States and Materials Sci.*, 1, No3, (1996) 430
- [2] R. Pampuch, "Nauka i technologia ceramiczna wobec zmian paradygmatu: punkt widzenia", *Inżynieria Materiałowa* Nr 6 (101), listopad-grudzień (1997) 208
- [3] R. Pampuch, "Towards new paradigms of science or back to perennial ones?" *International Conference on Biomaterials, Kraków* '99, 30.05.-02.06.1999
- [4] J. A. Aksay, D. M. Dabbs, J. T. Stanley, M. Sarikaya, "Bioinspired processing of ceramic-matrix composites", *third Euro-Ceramics*, V.1 (1993) 405
- [5] M. Calixto de Andrade, M.R.T. Filgueiras, T. Ogasawara, "Nucleation and growth of hydroxyapatite on titanium pretreated in NaOH solution: experiments and thermodynamic explanation", *J. Biomed. Mat. Res.* 46 (1999) 441
- [6] A. Stoch, A. Brożek, W. Jastrzębski, A. Bolek, U. Sasiadek, "Formation of phosphate coatings on metal implants from natural and synthetic body fluid", *Polish Ceramic Bull., Ceramics* 43 (1993) 5

References

- [7] T. Kokubo, "Novel bioactive materials derived from glasses", *Proc. International Congress on Glass (Madrid)* 7 (1992) 119
- [8] A. Stoch, A. Brożek, M. Błażewicz, B. Trybalska, M. Cichocińska, W. Jastrzębski, "Termostatowanie chemicznie modyfikowanych powierzchni kompozytów węglowych w syntetycznym płynie fizjologicznym", 8 Konferencja Naukowa "Biomateriały w medycynie i weterynarii", Zembrzyce 1997
- [9] A. Stoch, W. Jastrzębski, A. Brożek, B. Trybalska, M. Cichocińska, E. Szarawara, "FTIR monitoring of the growth of the carbonate-containing apatite layers from simulated and natural body fluids", *J. Mol. Structure*, 511-512 (1999) 287
- [10] A. Stoch "Surface modification as a route in engineered biomaterials", *The International Conference "The World of new Technologies"*, 15-18 May, 1996, Kraków
- [11] L. Kokubo, *Biomaterials* 12 (1991) 155.
- [12] B.A. Sexton, T. D. Smith and J. V. Sanders, *J. Electron. Spectrosc. Relat. Phenom.*, 35 (1985) 27