

Influencia del proceso de esterilización en la mojabilidad del titanio modificado superficialmente

M. PEGUEROLES, E. MENÉNDEZ, C. APARICIO, J.A. PLANELL, F.J. GIL.
CREB. División de Biomateriales y Biomecánica,
Departamento de Ciencias Materiales e Ingeniería Metalúrgica.
Universidad Politécnica de Cataluña.

Resumen

El objetivo de este trabajo es estudiar el cambio en las propiedades energéticas de muestras de titanio comercialmente puro debido a distintos tratamientos superficiales y a distintos métodos de esterilización; con la finalidad de entender cómo afectan estos cambios a los procesos biológicos de los implantes de titanio.

Los distintos tratamientos superficiales utilizados fueron: la formación de rugosidad mediante la proyección de partículas abrasivas, el granallado, y la esterilización mediante autoclave, óxido de etileno o radiación gamma.

Tanto el nivel de rugosidad generada como la naturaleza de las partículas del granallado influyen en el carácter energético de las muestras; incrementando el carácter hidrofóbico con el aumento de la rugosidad y con la utilización de alúmina. Los contaminantes debidos al proceso de autoclave hidrofobizan las superficies; contrariamente a la esterilización por óxido de etileno que disminuye el valor del ángulo de contacto.

La modificación de las superficies tratadas fue examinada con una serie de técnicas analíticas superficiales que incluyen el microscopio electrónico de barrido (SEM), la interferometría óptica y la medición del ángulo de contacto para poder realizar una caracterización topográfica, cualitativa y cuantitativa, y una caracterización energética, respectivamente.

Palabras clave: titanio, granallado, esterilización, mojabilidad, ángulo de contacto.

Abstract

The aim of this work is to study the energetic properties of commercially pure titanium samples due to different surface treatments and different sterilization methods; with the purpose to understand how these changes affect to the biological processes of titanium implants.

The different surface treatments were: roughness obtained by shot blasting, and sterilization by steam autoclaving, ethylene oxide or gamma radiation.

Roughness level and the nature of the abrasive particles of shot blasting influence energetically the samples; increasing the hydrophobic behaviour with the increase of the surface roughness and the alumina use. The contamination due to steam autoclaving hydrophobizes the surface; contrary to sterilization by ethylene oxide, which reduces the contact angle value.

The modification of treated surfaces was examined with a series of surface analytical techniques that include the scanning electron microscopy (SEM), the white light interferometer microscopy and the static contact angle measurement in order to determine a qualitative and quantitative topographic characterization and an energetic characterization.

Key words: titanium, shot blasting, sterilization, wettability, contact angle measurement.

Introducción

El titanio comercialmente puro (Ti c.p.) se utiliza habitualmente como material para implantes dentales gracias a sus buenas propiedades mecánicas y a su excelente biocompatibilidad [1].

La respuesta biológica de estos materiales es una propiedad directamente relacionada con sus características superficiales. Hay diferentes parámetros que caracterizan una superficie: la composición química, la cristalinidad, la heterogeneidad, la rugosidad y la mojabilidad, todos ellos son de mucha importancia para la respuesta biológica [1].

Para la obtención de una respuesta satisfactoria a largo plazo, un parámetro es el aumento de la rugosidad, y por tanto del área de contacto entre el implante y el hueso, [2;3], ya que afecta la adsorción de las proteínas en el material [4].

Las técnicas de esterilización son el paso final y obligado antes de la colocación del implante y modifican las propiedades superficiales pudiendo cambiarlas considerablemente [5].

Stanford et al. [6] concluyeron que las técnicas tradicionales de esterilización como el autoclave, contaminan y aumentan el grosor de la capa de óxido de forma heterogénea a lo largo de la superficie del material. Vezeau et al. [7] afirmaron que el autoclave contamina con partículas de óxidos, carburos o nitruros, debido, en parte, a las impurezas del aire; sin alterar la rugosidad pero sí aumentando el grosor de la capa de óxido superficial. Contrariamente, la radiación gamma no contamina la superficie.

Diversos estudios demostraron que la modificación de la composición y de la energía superficial del sólido altera la respuesta de las células óseas in vitro y consecuentemente in vivo [8]. La mojabilidad depende mucho de la energía superficial del sólido y influencia el grado de contacto con el medio fisiológico; una mojabilidad elevada facilita e incrementa la interacción entre la superficie del implante y el medio biológico [9;10].

El objetivo de este trabajo es caracterizar topográficamente y energéticamente, la superficie

del titanio considerando dos aspectos fundamentales: la rugosidad, obtenida mediante el granallado de partículas y la contaminación química superficial, debido a la esterilización y al granallado.

Las superficies fueron examinadas usando el microscopio electrónico de barrido, la interferometría óptica y la medición de ángulos de contacto para determinar las alteraciones en la morfología de la superficie, la rugosidad y la energía superficial antes y después de los tratamientos anteriormente descritos.

Materiales y Métodos

Se emplearon muestras cuadradas de 10´10 mm² cortadas de plancha de Ti comercialmente puro (c.p.) Grado II de 1.2 mm de grosor.

Las muestras se granallaron con partículas abrasivas, de dos naturalezas diferentes y dos tamaños de partículas resultando cuatro series diferentes según el acabado superficial:

SG: Sin granallar.

Al3: Granalladas con partículas de Al₂O₃ de un intervalo de tamaño de 212-300 mm.

Al6: Granalladas con partículas de Al₂O₃ de un intervalo de tamaño de 425-600 mm.

Si6: Granalladas con partículas de SiC de un intervalo de tamaño de 425-600 mm.

Además cada una de las series granalladas se esterilizaron posteriormente con tres métodos distintos: por autoclave, por óxido de etileno y por radiación gamma-g:

SE: Sin esterilizar.

AC: Esterilización por autoclave.

OE: Esterilización por óxido de etileno.

RG: Esterilización por radiación gamma.

Preparación de las muestras

El granallado se realizó en una granalladora de laboratorio a una presión de 0,25 MPa durante el tiempo requerido hasta la completa saturación de la superficie de las muestras. Las partículas abrasivas utilizadas fueron las descritas anteriormente.

Después del granallado, todas las muestras se lavaron en ultrasonidos con jabón durante 10 min. y se secaron al aire forzado.

Procesos de esterilización

Para esterilizar el material, las muestras se empaquetaron para mantener las propiedades durante más tiempo, hasta tres meses, después del proceso.

Correspondencia:

F.J. Gil.

CREB. Dept. C. Materiales e Ing. Metalúrgica,
Universidad Politécnica de Cataluña.

Avda. Diagonal 647, Barcelona, 08028, España

Fax : 934016706

E-mail: francesc.xavier.gil@upc.es

Cinco muestras de cada serie de rugosidades se sometieron a las siguientes esterilizaciones: autoclave a 121°C, durante 30 min a 1bar (Sterilmax PSelecta, España); óxido de etileno a 37°C, durante 5 horas a 760mmbar, 18h de aeración forzada, 24h de aeración natural y radiación gamma-g empleando una dosis de 2'5 Mrad. Finalmente se realizó una serie sin esterilizar como control.

Caracterización superficial

Rugosidad superficial - La rugosidad superficial de las muestras se obtuvo mediante interferometría óptica (Optical Profiling System, Wyko NT1100, Veeco, USA).

Se analizaron tres muestras de cada una de las diferentes series de granallado y esterilizaciones y por cada muestra se realizaron tres lecturas de rugosidad. Los valores fueron comparados entre ellos mediante un test ANOVA; un p-valor<0,05 se consideró estadísticamente significativo.

Microscopio electrónico de barrido (SEM) - La observación se realizó en un SEM (JSM-6400 Scanning Microscope, Japan) utilizando un voltaje de aceleración de 8keV.

Medidas de ángulo de contacto - Los estudios de mojabilidad se realizaron con un sistema de video de ángulo de contacto (Contact Angle System OCA15plus, Dataphysics, Alemania) mediante el método de la Sessile Drop.

Las medidas se obtuvieron a temperatura ambiente (T=25°C) dentro de una cámara medioambiental previamente saturada con el líquido de estudio. Las gotas, de 3mL, se generaron mediante una jeringuilla micrométrica y se depositaron en la superficie del sustrato. Los ángulos de contacto (ACA) se determinaron semimanualmente a partir de la imagen de la gota con una precisión de $\pm 1^\circ$.

Se analizaron tres muestras de cada una de las diferentes series según rugosidades y según tipos

de esterilización. Por cada muestra se realizaron tres deposiciones de gota y la imagen se analizó mediante el software SCA20 (Dataphysics, Alemania). Los estudios estadísticos se realizan mediante test ANOVA considerando un p-valor menor de 0,05 estadísticamente significativo.

Los líquidos utilizados han sido agua destilada ultrapura (MilliQ, Millipore, Alemania) y medio de cultivo consistente en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con un 10% de suero bovino (FCS). Para la obtención de la tensión superficial del medio de cultivo, se ha empleado el método de la Pendant Drop.

Resultados y Discusión

Rugosidad superficial y caracterización topográfica

Los resultados de rugosidad media, Ra, de las diferentes muestras obtenidas mediante interferometría óptica se muestran en las Figura 1 y Figura 2.

Se define Ra como la media aritmética de la desviación vertical desde la línea media, es el parámetro que cuantifica de forma general la rugosidad de una superficie.

Estudios anteriores [11], indican que el aumento de rugosidad de muestras de titanio autoclavadas es de unos 3nm y que, mediante análisis químicos, la superficie está contaminada con diferentes iones; sugiriendo que por este motivo el autoclave provoca una disminución de la energía superficial y un aumento del ángulo de contacto, desfavoreciendo la adhesión celular.

De los resultados estadísticos obtenidos, se deduce que no son significativamente diferentes las rugosidades antes y después de las esterilizaciones en ninguna de las cuatro series analizadas (*figura 2*). Aunque, evidentemente, el proceso de granallado provoca un aumento de la rugosidad a medida que aumenta el tamaño de las partículas abrasivas.

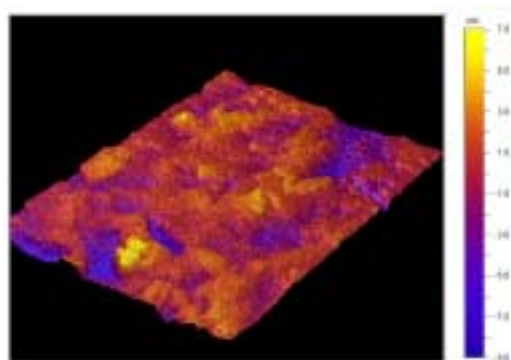


Figura 1. Imagen 3D obtenida por interferometría óptica de la muestra A13 sin esterilizar.

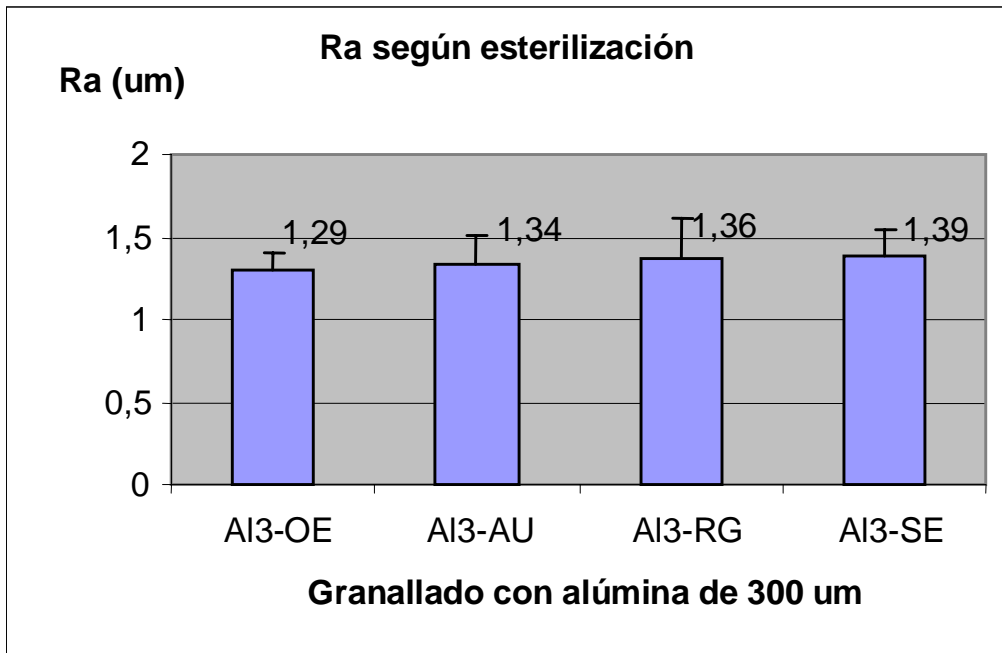


Figura 2. Estudio estadístico del valor de la rugosidad según el método de esterilización de muestras granalladas con alúmina de 300mm. La barra indica que las diferencias no son estadísticamente significativas.

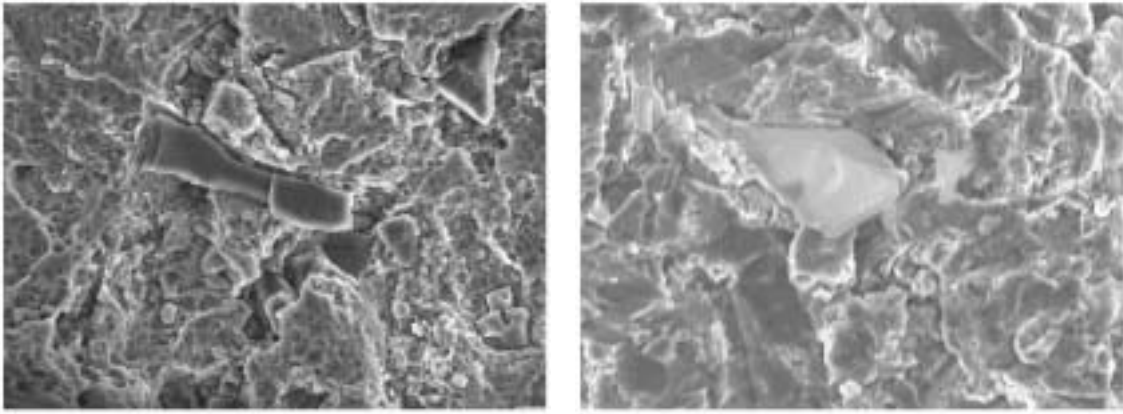


Figura 3 y Figura 4. Comparación de imágenes obtenidas por SEM para una muestra de Si6 y Al6 respectivamente [$\times 1000$].

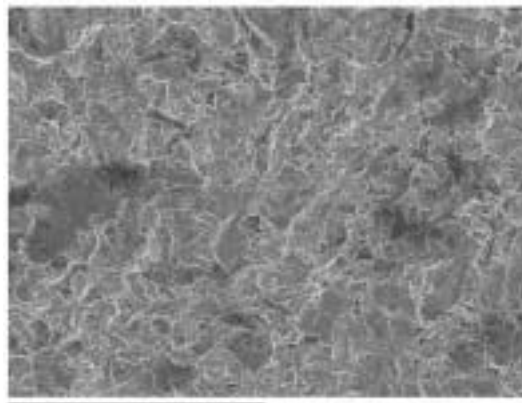


Figura 5. Imágen obtenida por SEM del resultado del granallado con alúmina correspondiente a la serie Al6 [$\times 200$]

Los resultados por SEM están representados en las Figura 3 y Figura 4 donde se observa partículas de óxido de silicio y de alúmina incrustadas por el proceso de granallado, lo que demuestra la contaminación que genera este método. La Figura 5 muestra una visión general de la superficie granallada con alúmina Al₆.

Caracterización energética

El ángulo de contacto puede obtenerse fácilmente estableciendo la tangente del ángulo de una gota líquida con la superficie de un sólido como base, método de la Sessile Drop. El ángulo de contacto es una medida común para determinar el carácter hidrofílico/hidrofóbico de una superficie. Este dato nos puede dar información sobre las propiedades energéticas de la superficie, heterogeneidad y rugosidad [12;13].

En las muestras no esterilizadas, el ángulo de contacto aumenta ligeramente a medida que también incrementa la rugosidad lo que significa que aumenta la hidrofobicidad y que, por lo tanto, la adhesión celular será menor a corto plazo (*figura 6*). Lo que podría parecer un problema en un principio, depende de la finalidad del implante: para un stent cardiovascular, la hidrofobicidad es aconsejada para evitar la obstrucción de la zona operada. Para implantes dentales u óseos lo recomendable sería una superficie hidrofílica para favorecer el anclaje y crecimiento de las células óseas a corto plazo.

En superficies pulidas, inicialmente, el titanio tiene un ángulo de 77.6° y después de un tratamiento de autoclave el material es más hidrofóbico (*figura 7*), fenómeno que puede ser debido a la contaminación. Después de la esterilización por radiación el metal mantiene su carácter energético

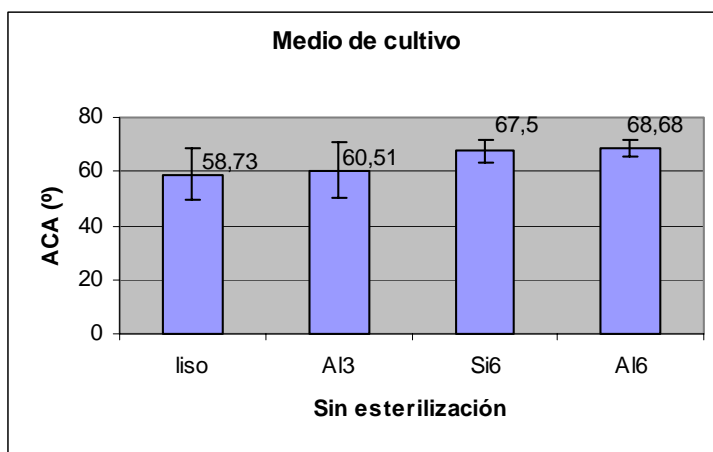


Figura 6. Evolución del ángulo de contacto con medio de cultivo en muestras sin esterilizar, teniendo como único factor la rugosidad.

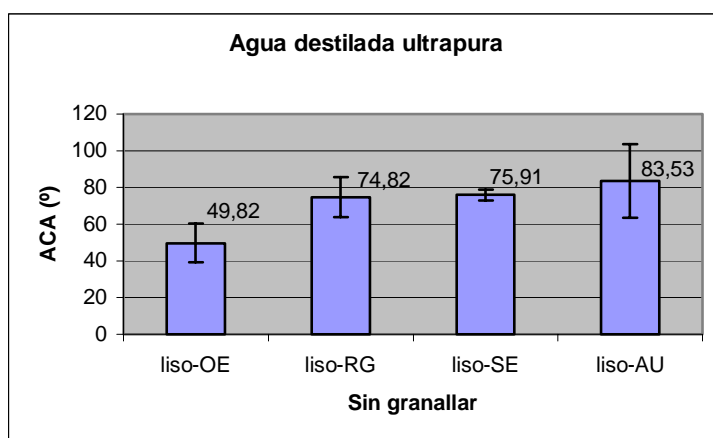


Figura 7. Evolución del ángulo de contacto con agua ultrapura en muestras lisas, teniendo como único factor la esterilización.

parecido al tratamiento sin esterilizar. El hecho que la esterilización gamma no deposite contaminantes en la superficie del material, explica que se comporte de forma parecida a la serie sin esterilizar y que su evolución con respecto a la rugosidad sea muy similar a las muestras no esterilizadas, ya que la radiación gamma no afecta al sustrato. Contrariamente, la esterilización por óxido de etileno disminuye el ángulo de contacto de las muestras debido a los contaminantes polares (figura 7).

La combinación, al mismo tiempo, de los parámetros de rugosidad y esterilización da los resultados más extremos y generalizados. Las superficies más hidrofóbicas se obtienen con muestras rugosas, independientemente del nivel de rugosidad, y esterilizadas con autoclave (figura 8). Las superficies más hidrofílicas se obtienen con muestras lisas y esterilizadas con óxido de etileno.

La naturaleza de las partículas abrasivas del granallado afectan a las propiedades energéticas debido a la contaminación generada. Las superficies granalladas con carburo de silicio obtienen un valor de ángulo de contacto inferior a las obtenidas mediante alúmina. A partir de una cierta rugosidad, la mojabilidad de la superficie no se ve afectada si se trabaja con la misma naturaleza de partículas abrasivas (figura 9).

Pero la mayoría de las superficies muestran dos valores estables. Cuando se alcanza el equilibrio, la gota muestra el ángulo de avance (θ_a) y si se retira

líquido de la gota, el ángulo disminuye hasta el ángulo de retroceso (θ_r) antes que la gota se contraiga [14]. Esta diferencia entre θ_a y θ_r se define como histéresis (Dq). La histéresis se atribuye a la rugosidad superficial, heterogeneidades, cambios moleculares, difusión interna, adsorción y deformación superficial. Los valores de histéresis obtenidos demuestran que depende de la rugosidad superficial ya que, según la Figura 10, el $\Delta\theta$ aumenta con el aumento de rugosidad. En el caso de las muestras sin esterilizar, la diferencia no es tan importante debido a que la rugosidad no es un factor determinante de cara la mojabilidad.

El grado de adhesión entre dos fases se puede evaluar mediante el trabajo de adhesión (W_a) indicado en la ecuación.

$$W_a = \gamma_l v (1 + \cos q) \quad (\text{eq. 1})$$

$\gamma_l v$ es la tensión superficial del líquido y q es el ángulo de contacto medido [15]. Los resultados obtenidos demuestran que un valor hidrofílico de ángulo de contacto implica un trabajo de adhesión elevado y a la inversa, esto es debido a la relación anteriormente descrita.

La medición de ángulo de contacto nos da información acerca de la mojabilidad de las superficies, pero en muestras altamente rugosas, como las trabajadas en este estudio, la morfología de la superficie puede alterar algunos de los resultados obtenidos.

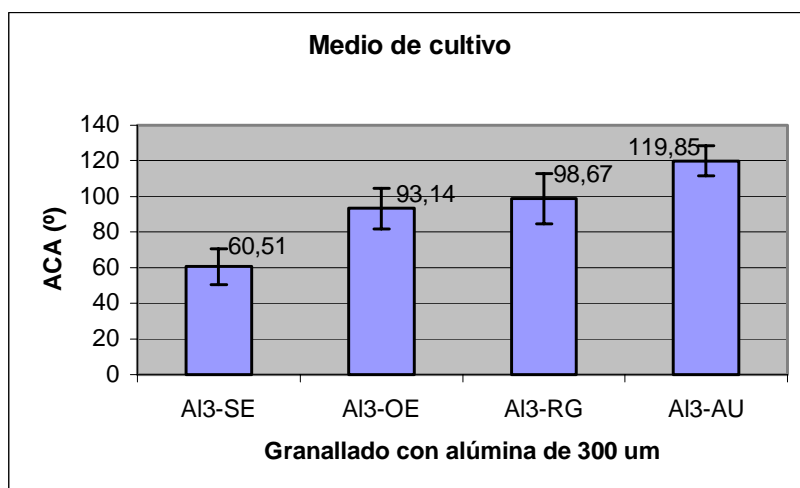


Figura 8. Evolución del ángulo de contacto con medio de cultivo en muestras granalladas con alúmina de 300mm.

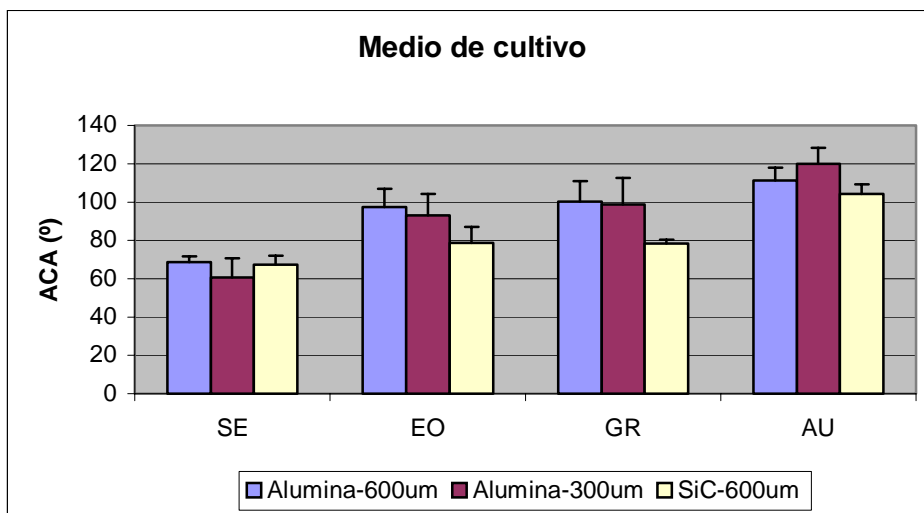


Figura 9. Evolución del ángulo de contacto con medio de cultivo según el proceso de esterilización y proceso de granallado.

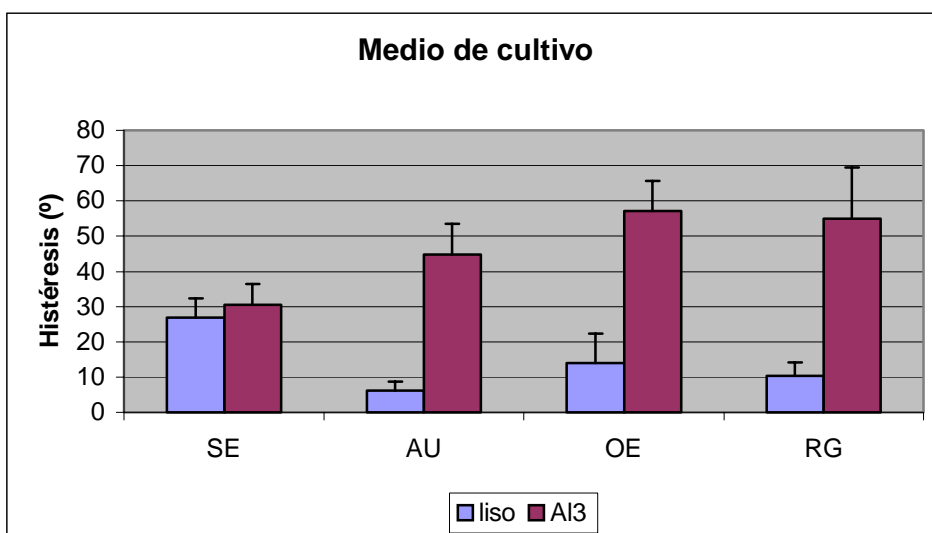


Figura 10. Evolución de la histéresis con medio de cultivo según la rugosidad y método de esterilización.

Conclusiones

La biocompatibilidad de cualquier biomaterial está relacionada con la interacción entre el cuerpo y el implante y para implantes metálicos, está directamente relacionada con la naturaleza de la superficie al inicio y durante la implantación [16]. La naturaleza química, la rugosidad, y la energía superficial son parámetros que definirán la biocompatibilidad del implante.

Respecto a la esterilización, el autoclave contamina la superficie y acentúa la hidrofobicidad del titanio; contrariamente, el óxido de etileno disminuye la mojabilidad de las superficies. La rugosidad también disminuye la facilidad de adhesión de las proteínas al sustrato; pero,

dependiendo del tipo de partículas granalladas y, por lo tanto, del tipo de contaminantes incrustados, la hidrofobicidad puede ser más o menos acentuada. Pero la combinación de ambos parámetros, rugosidad y esterilización, agudizan estos comportamientos obteniendo los valores más elevados de ángulo de contacto en muestras rugosas y esterilizadas en autoclaves y los valores más pequeños en muestras lisas y esterilizadas con óxido de etileno, en ambos líquidos estudiados.

Para rugosidades elevadas el comportamiento energético no se ve afectado, pero la naturaleza de las partículas abrasivas influyen de forma que el granallado con carburo de silicio genera una superficie más hidrofílica que el granallado con alúmina.

Tanto la naturaleza y tamaño de las partículas de granallado como los métodos de esterilización afectan a las propiedades energéticas del Ti comercialmente puro.

Agradecimientos

Los autores querrían agradecer a la CICYT la financiación para la realización de este estudio a través del Proyecto de Investigación Científica MAT2003-08165 y a Materias Primas Abrasivas S.L. (MPA) por la ayuda técnica ofrecida durante el proceso de granallado del material.

Bibliografía

1. **Shabalovskaya SA.** Surface, corrosion and biocompatibility aspects of Nitinol as an implant material. *Bio-Medical Materials and Engineering* 2002; 12: 69-109.
2. **Darvell BW, Samman N, Luk WK, Clark RKF, Tideman H.** Contamination of titanium castings by aluminium oxide blasting. *Journal of Dentistry* 1995; 23: 319-322.
3. **Aparicio C, Gil FJ, Fonseca C, Barbosa M, Planell JA.** Corrosion behaviour of commercially pure titanium shot blasted with different materials and sizes of shot particles for dental implant applications. *Biomaterials* 2003; 24: 263-273.
4. **Rupp F, Scheideler L, Rehbein D, Axmann D, Gels-Gerstorfer J.** Roughness induced dynamic changes of wettability of acid etched titanium implant modifications. *Biomaterials* 2004; 25: 1429-1438.
5. **Thierry B, Tabrizian M, Savadogo O, Yahia LH.** Effects of sterilization processes on NiTi alloy: Surface characterization. *Journal of Biomedical Materials Research* 2000; 49: 88-98.
6. **Stanford CM, Keller JC, Solorsh M.** Bone Cell Expression on Titanium Surfaces Is Altered by Sterilization Treatments. *Journal of Dental Research* 1994; 73: 1061-1071.
7. **Vezeau PJ, Koorbusch GF, Draughn RA, Keller JC.** Effects of multiple sterilization on surface characteristics and in vitro biologic responses to titanium. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 1996; 54: 738-746.
8. **Kilpadi DV, Raikar GN, Liu J, Lemons JE, Vohra Y, Gregory JC.** Effect of surface treatment on unalloyed titanium implants: Spectroscopic analyses. *Journal of Biomedical Materials Research* 1998; 40: 646-659.
9. **Kilpadi DV, Raikar GN, Liu J, Lemons JE, Vohra Y, Gregory JC.** Effect of surface treatment on unalloyed titanium implants: Spectroscopic analyses. *Journal of Biomedical Materials Research* 1998; 40: 646-659.
10. **Stanford CM, Keller JC, Solorsh M.** Bone Cell Expression on Titanium Surfaces Is Altered by Sterilization Treatments. *Journal of Dental Research* 1994; 73: 1061-1071.
11. **Stanford CM, Keller JC, Solorsh M.** Bone Cell Expression on Titanium Surfaces Is Altered by Sterilization Treatments. *Journal of Dental Research* 1994; 73: 1061-1071.
12. **Lam CN, Lu J, Neumann W.** Measuring Contact Angle. In: Krister Holmberg (ed.), *Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry*. 2004: 251-279.
13. **Kwok DY, Neumann AW.** Contact angle interpretation in terms of solid surface tension. *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects* 2000; 161: 31-48.
14. **Extrand C.W.** Hysteresis in contact angle measurements. In: Marcel Dekker (ed.), *Encyclopedia of Surface and Colloid Science*. 2002: 2414-2428.
15. **Zhenghe X, Masliyah J.** Contact angle measurements on oxide and related surfaces. In *Encyclopedia of surface and colloid science*. 2002: 1228-1240.
16. **Thierry B, Tabrizian M, Savadogo O, Yahia LH.** Effects of sterilization processes on NiTi alloy: Surface characterization. *Journal of Biomedical Materials Research* 2000; 49: 88-98.