

Oxidación superficial de aleaciones de NiTi para la mejora de la biocompatibilidad

A. MICHIARDI, E. ENGEL, J.A. PLANELL, F.J. GIL.
CREB. Departamento de Ciencias Materiales e Ingeniería Metalúrgica.
E.T.S.E.I.B. Universidad Politécnica de Cataluña.

Resumen

Se han estudiado diferentes tratamientos superficiales con el fin de obtener una capa de TiO₂ con una mínima concentración de Ni en la superficie de aleaciones de NiTi 50/50 con memoria de forma: pulido espejo, autoclave, electropulido, oxidación en un baño de agua hirviendo y oxidación térmica en atmósfera controlada de aire. Se analizaron las superficies de las muestras mediante XPS. El tratamiento de oxidación térmica es el que da el ratio Ti/Ni más alto, la menor cantidad de Ni en superficie y también el mayor espesor de óxido. Se comprobó mediante un experimento de liberación de iones que el óxido formado por este proceso de oxidación hace disminuir la liberación de iones Ni al medio fisiológico respecto a la superficie no tratada. Se hicieron estudios de cultivos celulares de osteoblastos de línea MG63 sobre superficies no tratadas y tratadas térmicamente de NiTi. Los resultados de proliferación muestran que, para los días 3, 6 y 9 no existen diferencias estadísticamente significativas entre los materiales. Sin embargo, después de 48h de estimulación para la diferenciación, las células cultivadas sobre las superficies tratadas térmicamente demuestran una mayor actividad de la fosfatasa alcalina y mayores niveles de osteocalcina.

Palabras clave: aleaciones de NiTi, tratamientos de superficie, XPS, MG63, fosfatasa alcalina, osteocalcina.

Abstract

Various surface treatments have been studied in order to find the most appropriate in forming a TiO₂ with a low Ni content on the surface of equiatomic NiTi alloys. Sample surfaces have been analyzed by XPS. Thermal oxidation treatment in an air-controlled atmosphere leads to the highest Ti/Ni ratio, to the lowest Ni surface concentration and to the thickest oxide layer. It has been shown by the results of ion release experiment that the oxide formed by this oxidation process allows to decrease Ni release into exterior medium comparing with non-treated surfaces. Cell cultures of MG63 osteoblast-like cells have been carried out. The proliferation study shows that from day 3 to day 9 there is no statistically significant differences between negative control, non-treated and thermally oxidized surfaces. After 48h of stimulation for differentiation, MG63 cells on thermally oxidized surfaces show higher phosphatase alkaline activity and osteocalcin level.

Key words: NiTi alloys, surface treatments, XPS, MG63, phosphatase alkaline activity, osteocalcin.

Introducción

La aleación equiatómica NiTi es una aleación que posee propiedades de memoria de forma. El efecto memoria de forma es debido a la transformación martensítica termoelástica entre una fase de alta temperatura llamada austenita (temperaturas de transformación As y Af) y una fase de baja

temperatura, llamada martensita (temperaturas de transformación Ms y Mf). Las dos consecuencias principales de esta transformación son el efecto memoria de forma y la superelasticidad. El efecto memoria de forma es la capacidad del material de "recordar" su forma original después de haber sufrido una determinada deformación, es decir, que el material recupera completamente su forma por un

simple calentamiento por encima de Af cuando ha sido deformado en fase martensítica. La superelasticidad es la capacidad del material de deformar elásticamente mucho más que los materiales metálicos convencionales (8-10%) cuando se deforma en estado austenítico (inducción de martensita por tensión).

Estas propiedades, además de su buen comportamiento a corrosión [1, 2] y de su buena biocompatibilidad y citotoxicidad [3, 4, 5, 6, 7], hacen del NiTi un excelente candidato para aplicaciones biomédicas.

Sin embargo, al tener alrededor de un 50% atómico de Ni, la implantación de este material en el cuerpo exige tomar precauciones a causa de la liberación de iones níquel que pueden provocar reacciones alérgicas y/o tóxicas [5, 8, 9]. Estas reacciones dependen de la cantidad de iones que se liberan al medio (más particularmente de los iones Ni²⁺) [10], la cual es directamente proporcional a la cantidad de níquel que hay en la superficie del material [11]. Por esta razón, la preparación superficial del NiTi es primordial, sobre todo para su aplicación como material implantable.

Varios estudios en la bibliografía demostraron que los buenos resultados de corrosión y biocompatibilidad obtenidos son consecuencias de la formación de una capa de óxido de titanio (TiO₂) en la superficie que actúa como una barrera contra la difusión de los iones [1, 5, 11, 7, 12].

Sin embargo, la eficiencia de esta capa de óxido de titanio depende del modo de oxidación, de la composición, de la estructura y de la rugosidad del material [13]. Además, antes de formarse esta capa en la superficie, ocurre una primera disolución preferencial de iones Ni [5, 12], que obviamente hay que evitar por las razones indicadas anteriormente.

El objetivo de este trabajo es la obtención, por medio de distintos tratamientos de superficie, de una capa de óxido de titanio superficial con una insignificante concentración en níquel, con el fin de limitar la liberación de iones Ni al medio, y evitar posibles reacciones adversas. Además, se estudia el efecto de esta capa de óxido sobre la respuesta biológica *in vitro* de osteoblastos.

También, la capa de óxido obtenida servirá de

base para la aplicación de otros tratamientos térmicos o/y químicos, a determinar en futuros estudios, para conseguir una superficie bioactiva que pueda inducir la nucleación y el crecimiento de hidroxiapatita, y así mejorar la osteointegración del implante a corto plazo. Esto podría ser un factor determinante en implantología dental por ejemplo, porque permitiría poder cargar mecánicamente el implante casi inmediatamente después de la operación quirúrgica. De esta manera, el paciente no tendría que esperar meses antes de poder comer de manera normal.

Materiales y métodos

Las aleaciones de NiTi estudiadas en este trabajo eran aleaciones de aproximadamente un 50% atómico en níquel.

Estas aleaciones fueron obtenidas por fundición en un horno de arco en atmósfera de argón, con posterior tratamiento de homogeneización a 1100°C (rampa de calentamiento de 3 horas) durante 6 horas y enfriamiento lento, también en atmósfera de argón. Se realizó un tratamiento térmico para estabilizar la fase b a temperatura ambiente y las propiedades de memoria de forma. Este tratamiento consistió en una solubilización a 800°C durante 10 minutos seguida de un temple en agua fría y de un revenido a 500°C durante una hora.

Se estudiaron los tratamientos de oxidación siguientes:

1) Ataque químico seguido de un tratamiento en autoclave a 120°C y 21 p.s.i durante 30 minutos en cápsulas de Petri, y de un secado de 35 minutos

2) Ataque químico seguido de un baño en agua hirviendo de 30 minutos

El ataque en 1) y 2) se realizó en una solución de HF, HNO₃ y agua en proporción 1:4:5 respectivamente (en vol.) durante 10 minutos [20].

3) Baño en agua hirviendo de una hora sin ataque químico previo

4) Pulido mecánico hasta conseguir una superficie especular

5) Electropulido en una solución de 5 ml de ácido perclórico (70%) y 100 ml de ácido acético (99.8%), con un voltaje de 30 V durante un tiempo de 2 min 15 s.

6) Oxidación térmica a 400°C (rampa de calentamiento de 20°C/min), durante 2 h 30, y enfriamiento en el horno, con una presión de aproximadamente 3.10⁻² mbar de aire.

En este trabajo se compararon los resultados obtenidos por espectroscopia de fotoelectrones de rayos X (XPS). Esta técnica se basa en inci-

Correspondencia:

F.J. Gil.

CREB. Dept. C. Materiales e Ing. Metalúrgica,
E.T.S.E.I.B., Universidad Politécnica de Cataluña,
Avda. Diagonal 647, Barcelona, 08028, España
Fax : 934016706

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

dir con una fuente de rayos X monoenergética (en este caso Al Ka a 1486.6 eV) la superficie de un material, y en analizar la energía y contar los fotoelectrones emitidos. Sabiendo que la energía del fotoelectrón es característica del estado químico de un elemento determinado, se puede conocer de manera cuantitativa (concentración) y cualitativa (estado de oxidación) la presencia de cada elemento. Esta técnica permite un análisis superficial de algunos nanómetros de profundidad. Una vez analizada la superficie, se decapa con un bombardeo de Ar⁺ (en este caso de 0.2 min en 0.2 min hasta 3 min y luego de 0.5 min en 0.5 min hasta el final) y se vuelve a analizar esta nueva superficie, lo cual permite, repitiendo estas dos operaciones, obtener un perfil de concentración en función de la profundidad. Los espectros de XPS se obtuvieron con un ángulo de escape de 45° entre la muestra y el analizador. Se utilizó el pico del C 1s a 284.8 eV para calibrar la escala de los espectros obtenidos. Se analizaron los datos con el software Multipak de una manera rigurosamente idéntica para cada muestra. Se determinó el espesor del óxido según un método utilizado a menudo en la bibliografía [19]: el tiempo necesario para que el oxígeno alcance la mitad de su concentración máxima. El valor del espesor del óxido en función del tiempo de bombardeo fue aproximado según el valor de referencia proporcionado por el equipo de XPS utilizado (4 keV, Ar⁺, 190 nA/(300mm/2)²p, 45°) que es de 60 Å/min. para el TiO₂.

La cuantificación de los iones Ni liberados en el SBF durante el experimento de liberación de iones se hizo por absorción atómica en horno de grafito (GFAAS).

Los estudios de cultivo celular se hicieron con osteoblastos de línea MG63, en medio DMEM suplementado con 10% de FCS, 1% de L-Glutamina, 1% de Penicilina/Streptomycin y 1% de Piruvato. Se trabajó con discos de diámetro 8 mm, de NiTi no tratados y tratados térmicamente según el tratamiento 6 descrito anteriormente, y con discos de Ti puro comercial del mismo diámetro. El Ti sirve en este estudio como material comparativo ya que está aceptado como uno de los materiales más biocompatibles en aplicaciones biomédicas. Se usaron también un control positivo y un control negativo, siendo los dos el plástico de la placa de cultivo con medio de cultivo suplementado, o no, con un 0.02% de dodecil sulfato de sodio (SDS) respectivamente. Se sembraron 5000 células por disco y se mantuvieron en un incubador a 37°C en una

atmósfera con el 5% de CO₂. Se hizo un estudio de adhesión a 24h y de proliferación hasta 9 días. Luego se estimularon las células para la diferenciación durante 48 h con dexametasona y vitamina C. Después de estas 48h de estimulación, se determinaron la cantidad de proteína total, la actividad de la fosfatasa alcalina y los niveles de osteocalcina. Los contajes celulares se llevaron a cabo con el test WST de Roche. El test WST es un test de viabilidad colorimétrico que se basa en la reducción de una sal de tetrazolio en formazán por la acción enzimática de las mitocondrias de las células viables. Teniendo el formazán una coloración violeta se puede cuantificar el número de células viables mediante una medida de absorbancia a 405 nm. Los tests para cuantificar la proteína total, la fosfatasa alcalina y la osteocalcina también están basados en ensayos colorimétricos.

Resultados

Oxidación

Comparando los perfiles de concentración de Ni (*Fig.1*) y el espesor del óxido obtenido de los distintos tratamientos estudiados (*Fig.2*), se observó que el tratamiento de oxidación térmica es el tratamiento superficial que permite obtener un mayor espesor de óxido, con un contenido de Ni muy bajo y casi nulo en la superficie. Este tratamiento permitió obtener un ratio (Ti/Ni)superficie alto respecto a las otras técnicas (*Tabla 1*).

Un ajuste (*peak fitting*) del pico Ti2p en la superficie del NiTi oxidado 2h30 (*Fig.3*) indica la presencia de TiO₂ puro y homogéneo, a un valor de energía de enlace de 458.4 eV para Ti2p_{3/2}, y una separación entre Ti2p_{3/2} y Ti2p_{1/2} de 5.7 eV en acuerdo con la bibliografía ([16]). También, se observó la presencia de grupos OH (531.43 eV) en la superficie del material mediante el ajuste del pico O1s de la misma muestra.

En todo el espesor de muestra analizada, el elemento Ni está solo presente en forma metálica. No hay ni Ni²⁺, ni Ni³⁺.

Los resultados del experimento de liberación de iones Ni que se llevó a cabo en Simulated Body Fluid (SBF, formulación de Kokubo et al. [21], fluido con una concentración iónica muy próxima a la del plasma sanguíneo humano, pH 7.4) a 37°C y hasta 30 días de inmersión obtenidos por GFAAS mostraron que para las superficies tratadas se reduce un 70% la liberación de Ni respecto a las no tratadas durante la primera hora de inmersión (*Fig.4*).

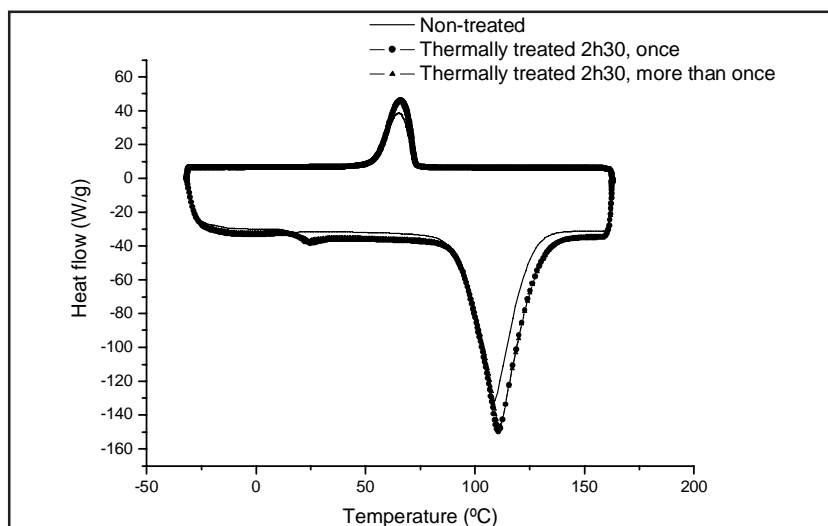


Figura 1. Perfil de concentración de Ni en función del tratamiento de oxidación.

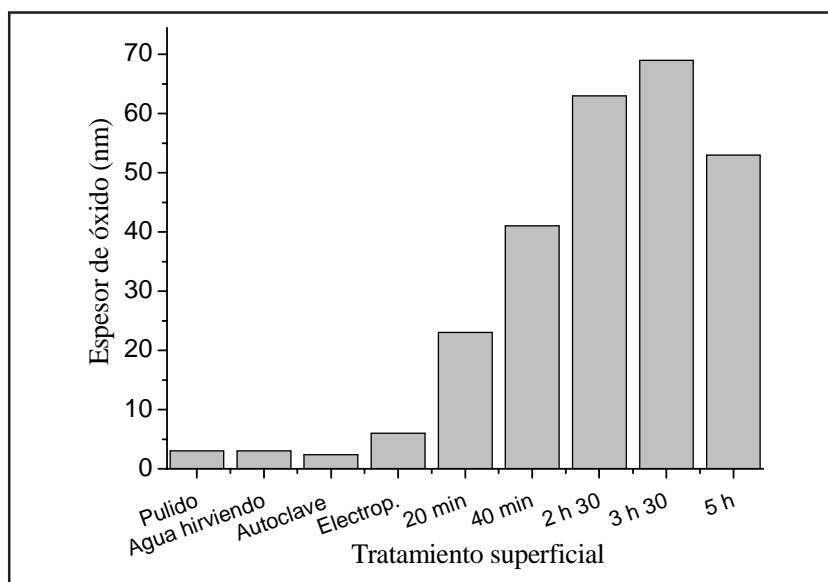


Figura 2. Espesor de óxido (nm) en función del tratamiento superficial.

Tratamiento	Concentración Ni %at. (a 0.2 min de bombardeo)	ratio (Ti/Ni) _{sup}
Pulido espejo	33.6	1
Baño agua hirviendo	9.5	4
Autoclave vapor	17.8	1.6
Electropulido	2.8	17
Oxidación térmica (2h30)	2	16

Tabla 1. Ratio Ti/Ni y concentración de Ni superficial en función del tratamiento de oxidación.

Cultivo celular

Con el test WST, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos materiales a día 1. Luego, para los días 3, 6 y 9 se vieron diferencias estadísticamente significativas entre los materiales y el control negativo, teniendo el control negativo una mayor proliferación (Fig.5).

Se observó que el NiTi tratado térmicamente tiene una cantidad de proteína total menor que para los demás materiales, siendo esta diferencia estadísticamente significativa (Fig.6).

En cuanto a la cuantificación de la actividad de la fosfatasa alcalina (Fig.7) y de los niveles de osteocalcina (Fig.8), se observó la misma tendencia. El NiTi tratado térmicamente presenta valores estadísticamente más altas que los demás materiales.

Discusión y conclusiones

En todos los espectros de XPS obtenidos, a pesar de trabajar con aleaciones 50/50, el Ni alcanza una concentración final de aproximadamente 60-65% atómico, mientras el Ti llega a 40-35% atómico. Esto se debe al fenómeno referenciado como bombardeo preferencial del Ti ([18]). También, se observó una reducción del óxido de titanio TiO_2 por el bombardeo de argón en subóxidos de tipo TiO_{2-x} , o Ti_2O_3 , como lo demostraron en [17].

Entre todos los tratamientos de superficie estudiados, los resultados obtenidos por XPS mostraron que el más adecuado para lograr una capa de TiO_2 homogénea con una cantidad de Ni insignificante en la superficie de las aleaciones NiTi es la oxidación térmica a $400^\circ C$ en atmósfera de aire controlada.

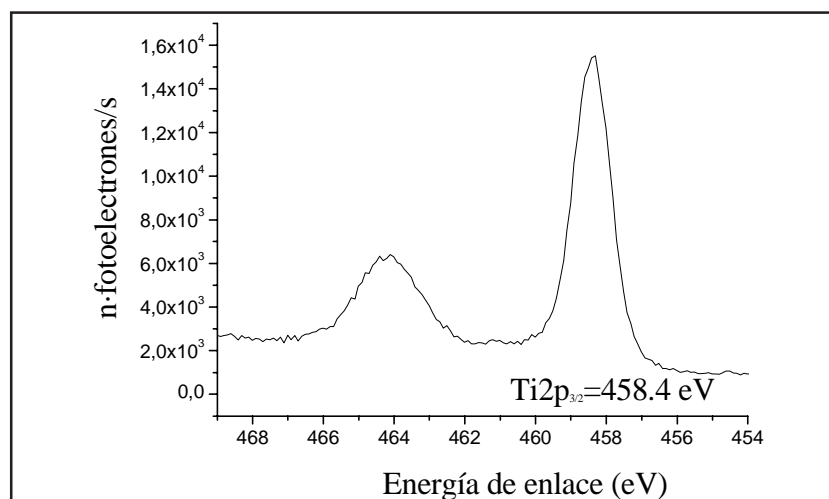


Figura 3. Espectro $Ti2p$ de la superficie de una muestra de NiTi oxidada térmicamente 2h30.

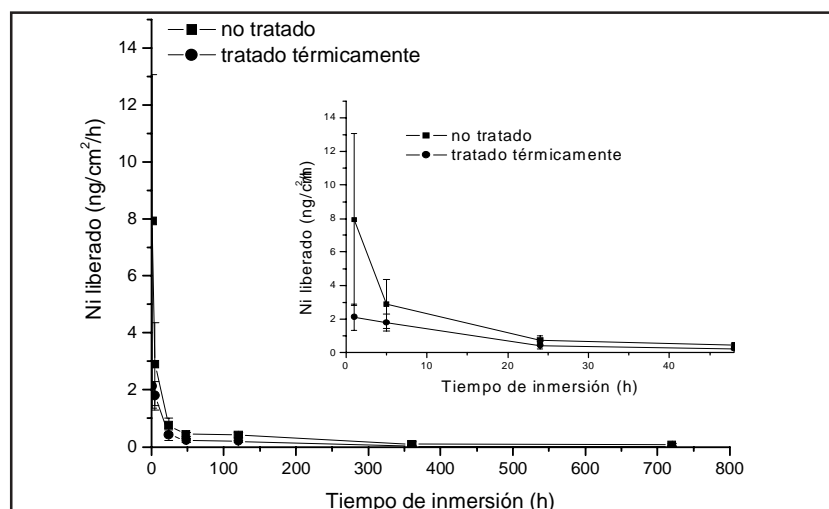


Figura4. Cantidad de Ni liberado en función del tiempo de inmersión en SBF para superficies tratadas térmicamente y superficies no tratadas de NiTi.

Absorvancia= número de células

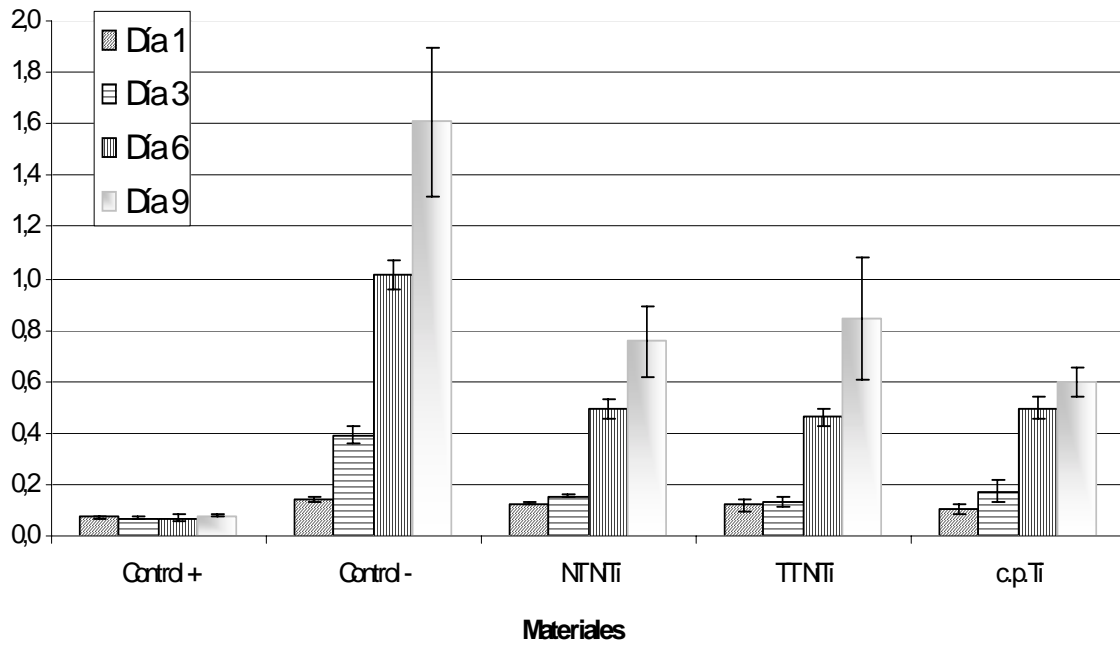


Figura 5. Proliferación celular de día 1 a 9 para superficies tratadas (TT NiTi) y no tratadas (NT NiTi) de NiTi, de titanio puro (c.p.Ti). Los controles positivos y negativos a citotoxicidad son respectivamente control + y control -.

Proteína total (g/ml)

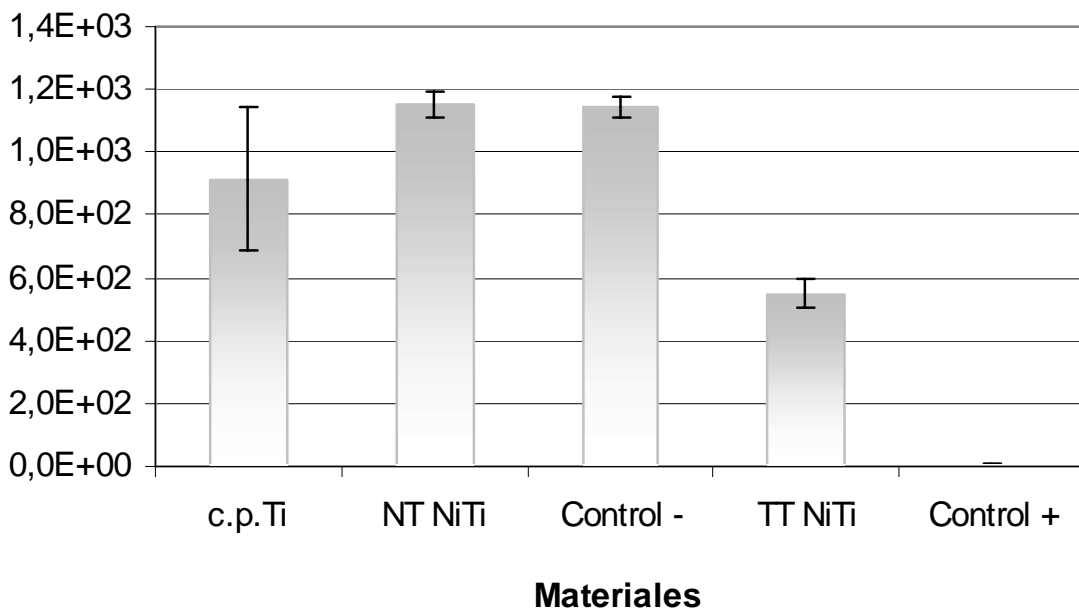


Figura 6. Cantidad de proteína total determinada para los diferentes materiales y controles estudiados.

ALP (mole PNP/min/mg proteína)

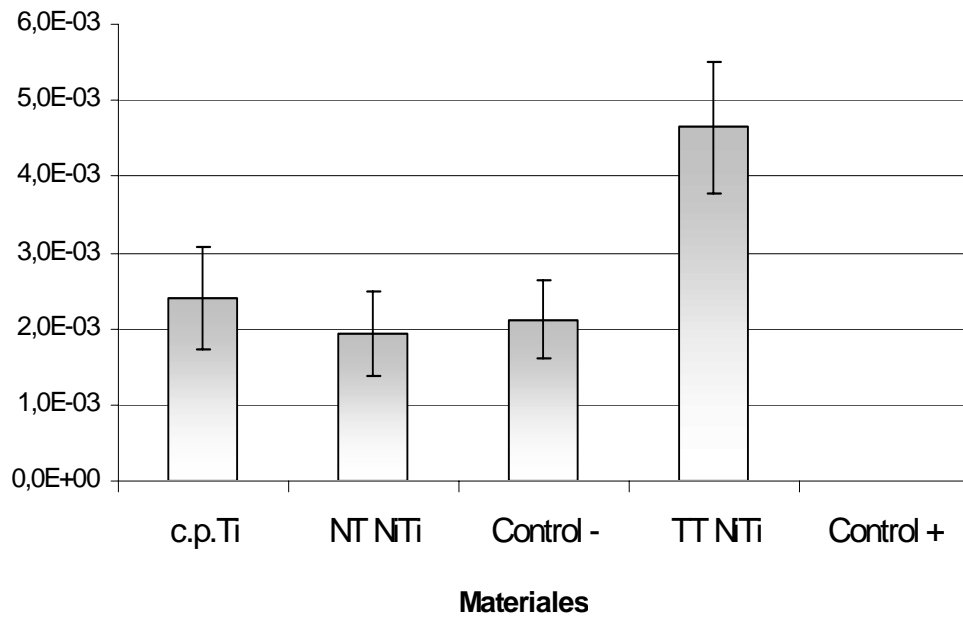


Figura 7. Actividad de la fosfatasa alcalina para MG63 sobre superficies de NiTi tratado térmicamente (TT NiTi), no tratado (NT NiTi), Ti puro (c.p.Ti) y controles positivos y negativos a citotoxicidad (control + y control – respectivamente).

Nivel de osteocalcina (ng/ g proteína)

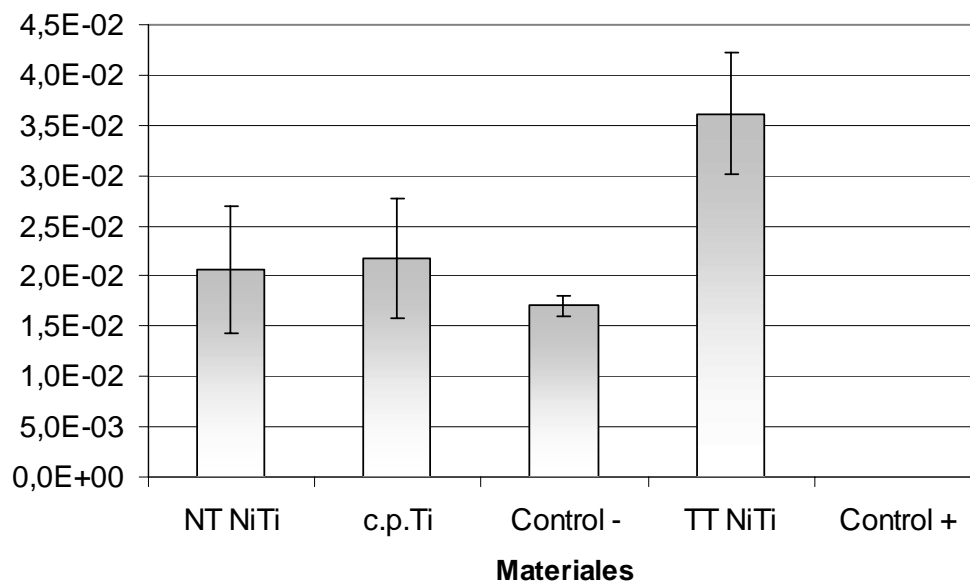


Figura 8. Niveles de osteocalcina determinados en sobrenadantes de cultivo celular de MG63 cultivados sobre distintas superficies: NiTi tratado térmicamente (TT NiTi), no tratado (NT NiTi), Ti puro (c.p.Ti) y controles positivos y negativos a citotoxicidad (control + y control – respectivamente).

Los resultados obtenidos con la oxidación térmica corroboran la teoría propuesta en [15] según la cual la formación del óxido es debida a una segregación del Ti inducida por el oxígeno seguida de la oxidación preferencial del Ti. Esto, puede ser debido a que la presión de trabajo de oxígeno es baja ($3 \cdot 10^{-2}$ mbar) y que termodinámicamente, la formación del TiO₂ está favorecida respecto a los óxidos de Ni o otros tipos de óxido de titanio (DGfor.(298K) = -212.6, -118.3 y -50.6 kcal.mol⁻¹, para TiO₂, TiO y NiO respectivamente). A la presión atmosférica, es decir con más oxígeno disponible en superficie del material, también se podría observar la formación de un óxido de Ni o/y de NiTi ([15, 18]).

El óxido formado en superficie obtenido en estas condiciones de trabajo es protector y actúa como una barrera a la difusión de los iones Ni hacia el medio exterior, como lo demostraron los resultados del experimento de liberación de iones. Los valores de liberación de iones para las superficies no tratadas son menores que las concentraciones umbrales referenciadas como tóxicas (en [14] de 29 ppm). Sin embargo, este umbral de toxicidad depende mucho del tipo de células estudiadas y de las condiciones del estudio. Además, en el caso de un implante permanente, estos bajos niveles de Ni liberados al medio podrían provocar a largo plazo una sensibilización del paciente al Ni. Un tratamiento superficial de oxidación de las superficies de NiTi, con la formación de un TiO₂ protector, podría ser beneficioso para evitar estas reacciones adversas de toxicidad y alergias.

Los resultados de cultivo celular sugieren que el tratamiento térmico de las superficies favorece una rápida maduración de los osteoblastos MG63. Después de estimular los MG63 durante 48h, los que están en contacto con superficies tratadas térmicamente paran la proliferación y empiezan a diferenciarse, mientras en los demás materiales parecen seguir la proliferación. Aunque también hayan empezado a diferenciarse. Estos resultados podrían llevar a una mineralización y osteogenesis más rápida en el caso del NiTi tratado térmicamente, y podrían ser de un gran interés para aplicaciones ortopédicas o dentales.

Sin embargo, parece que la diferencia de respuesta biológica observada entre las superficies tratadas y no tratadas no sea solo debido a la reducción de la concentración superficial en Ni, o de la disminución de la liberación de Ni al medio, ya que el NiTi tratado tiene también una mejor respuesta celular de cara a la diferenciación que el control negativo o el Ti. Por esta razón, es importante ca-

racterizar físico-químicamente de una manera exhaustiva todas las superficies de los materiales estudiados para poder sacar conclusiones más generales sobre las interacciones material-células.

En conclusión, el tratamiento de oxidación a 400°C y a $3 \cdot 10^{-2}$ mbar de aire permite obtener una capa de óxido de titanio TiO₂ protectora en la superficie de aleaciones de NiTi equiatómicas.

La presencia de este óxido en la superficie de las aleaciones de NiTi no influye en la proliferación de las células MG63. Sin embargo, si que influye en el proceso de diferenciación de las mismas, favoreciendo la producción de osteocalcina y la actividad de la fosfatas alcalina.

Agradecimientos

A la CYCIT por su financiación. Referencia del proyecto: MAT2000-1736

Bibliografía

1. **Filip P.** Structure and surface of NiTi human implants. *Biomaterials* 22, 2131:2138 (2001)
2. **H.Zitter.** The electrochemical behavior of metallic implant materials as an indicator of their biocompatibility. *J.Biomed.Mater.Res.*, 21, 881-896 (1987)
3. **S.Rhalmi et al.** Hard, soft tissue and in vitro cell response to porous NiTi: a biocompatibility evaluation. *Biomedical Material Engineering*, 9, 151:162 (1999)
4. **A.Kapanen et al.** Effect of NiTi shape memory metal alloy on bone formation. *Biomaterials* 22, 2475:2480 (2001)
5. **Ryhänen J et al.** Biocompatibility of nickel titanium shape memory metal and its corrosion behavior in human cell cultures. *J.Biomed.Mater.Res.*, 35, 451-457 (1997)
6. **DJ.Weaver et al.** Cytotoxic, allergic and genotoxic activity of a nickel-titanium alloy. *Biomaterials*, 18, 1115:1120 (1997)
7. **M.Assad.** Comparative in vitro biocompatibility of Nickel-Titanium, pure nickel, pure titanium, and stainless steel: genotoxicity and atomic absorption evaluation. *Biomed.Mater.Eng.*, 9, 1:12 (1999)
8. **F.Takeshita.** Histomorphometric analysis of the response of rat tibiae to shape memory alloy (nitinol). *Biomaterials*, 18, 21:25 (1997)
9. **Dunlap LC.** Allergic reaction to orthodontic wire: report of case. *J.Am.Dent.Assoc.*, 118, 449:450 (1989)
10. **M.Taira.** Studies on cytotoxic effect of nickel ions on three cultural fibroblasts. *J.Mater.Sci.: Mater.in Med.*, 12, 373:376 (2001)
11. **S.A.Shabalovskaya.** On the nature of the biocompatibility and on medical applications of

- NiTi shape memory and superelastic alloys. *Biomed.Mater.Eng.*, 6, 267:289 (1996)
12. **D.J.Weaver et al.** Electrochemical and surface characterization of a nickel-titanium alloy. *Biomaterials*, 19, 761:769 (1998)
 13. **F.Widu et al.** Corrosion and biocompatibility of orthodontic wires. *J.Mater.Sci.: Mat.in Med.*, 10, 275:281 (1999)
 14. **Wenyi Jia et al.** Nickel release from orthodontic arch wires and cellular immune response to various nickel concentrations. *J.Biomed.Mater.Res. (Appl.Biomater.)*, 48, 488:495 (1999)
 15. **C.-M.Chan et al.** Oxidation of an NiTi alloy. *Surface and Interface Analysis*, vol.15, 349:354 (1990)
 16. **B.Lee et al.** XPS study of bioactive graded layer in Ti-In-Nb-Ta alloy prepared by alkali and heat treatment. *Biomaterials*, 24, 2257:2266 (2003)
 17. **E.McCafferty et al.** An X-ray photoelectron spectroscopy sputter profile study of the native air-formed oxide film on titanium. *Applied Surface Science*, 143, 92:100 (1999)
 18. **G.S.Firstov et al.** Surface oxidation of NiTi shape memory alloy. *Biomaterials*, 23, 4863:4871 (2002)
 19. **C.Trépanier et al.** Effect of modification layre on NiTi stent corrosion resistance. *J.Biomed.Mater.Res. (Appl.Biomater.)*, 43, 433:440 (1998)
 20. **Shabalovskaya S.A.** Surface spectroscopic characterization of NiTi nearly equiatomic shape memory alloys for implants. *J.Vac.Sci.Technol.A*, 13 (5), 2624:2632 (sept/oct 1995)
 21. **H.-M. Kim, et al.** Preparation of bioactive Ti and its alloys via simple chemical surface treatment. *J.Biomed.Mater.Res.*, 32, 409:417 (1996)