

Estudio de la fotofuncionalización de membrana rígidas de cromo-cobalto utilizadas en la generación de aumento óseo mediante radiación ultravioleta controlada

Oscar Deccó*; Engelke, Wilfried**; ZUCHUAT, Jérica*; CURA, Andrea Cecilia*

AUTORES: *Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Entre Ríos, Ruta provincial N° 11 - Km 10, Oro Verde, Entre Ríos, 3100, Argentina. **Facultad de Medicina de la Universidad Georg-August Göttingen. Robert Koch Str. 40, 37075 Göttingen, Niedersachsen, Alemania.

CONTACTO: odecco@bioingenieria.edu.ar wengelke@med.uni-goettingen.de

Resumen

El diseño de diferentes dispositivos implantables, así como los tratamientos de superficies y/o los distintos recubrimientos para otorgar propiedades fisicoquímicas adecuadas para lograr una respuesta biológica deseada, continúan siendo objeto de investigación. La aleación de CrCoMo (ASTM F75) se ha utilizado en una amplia variedad de aplicaciones biomédicas, incluyendo dentales y como parte de prótesis ortopédicas. La técnica de fotofuncionalización se utiliza para mejorar las propiedades superficiales de materiales implantables. En el titanio se han reportado buenos resultados en estudios in vitro, respecto a la proliferación y supervivencia celular, e in vivo en relación a la oseointegración de implantes, aunque sobre otros materiales de implante, como la aleación de CrCoMo no ha sido explorado en profundidad. Mediante el empleo de discos de CrCoMo granallados y envejecidos durante 8 semanas, se estudió el fenómeno de fotofuncionalización de la superficie con radiación UVA (365 nm) y UVC (254 nm), y se evaluó su biactividad mediante una incubación in vitro durante 7 días en líquido simulador de tejido biológico (R-SBF). Se estudiaron la variación del ángulo de contacto pre y post irradiación, y la composición superficial de los discos, cuantificando el porcentaje en peso de los cristales de Ca y P por el método EDAX ZAF mediante EDS. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), correspondiente a superficies hidrofílicas, para las muestras irradiadas con UVA durante 48 horas y para las irradiadas con UVC durante 3 horas, y se encontraron superficies superhidrofílicas para aquellas irradiadas durante 12, 24 y 48 horas con UVC. Se determinó que la disminución en el contenido de carbono se relaciona con el aumento en el contenido de calcio y fósforo, y viceversa sobre las superficies de CrCoMo.

Palabras clave: Cr-Co-Mo; Barreras; Hidrofilia; Ángulo de contacto; Fotofuncionalización

Objetivos

General

Evaluar el efecto de la radiación UV en la superficie de obturadores de Cr-Co bajo diferentes condiciones de exposición.

Específicos

- Comparar la osteoconducción de obturadores de Cr-Co tratados con radiación UV de distintas longitudes de onda y a distintos tiempos de exposición, realizando pruebas in vitro con fluido corporal simulado, mediante la cuantificación de cristales en la superficie de las membranas.
- Analizar los cambios en el grado de hidrofilia de las superficies tratadas con radiación UV mediante medición del ángulo de contacto.
- Estudiar la composición de la superficie de las membranas antes y después de ser sometidas a radiación UV.

Marco teórico

Los biomateriales metálicos implantables son aquellos materiales no vivos, utilizados en un entorno médico, y concebidos para interactuar con sistemas biológicos [1]. Como característica primordial, el material debe ser biocompatible, lo que significa que su presencia dentro de los tejidos biológicos no provoca respuestas bioquímicas perjudiciales, ni para dichos tejidos, ni para el buen desempeño de las funciones sustitutorias o de reparación [1]. Como característica básica adicional, se debe mencionar la resistencia a la corrosión, ya que si los materiales metálicos son oxidados por el fluido corporal, se provocan reacciones de toxicidad y alergia in vivo, llevando a la liberación de iones metálicos por un periodo prolongado, y a la combinación de estos con biomoléculas, como proteínas y enzimas [2].

La ingeniería y la ciencia de los materiales han estudiado intensamente el comportamiento, análisis y mejoras de las propiedades de los materiales implantables con el fin de favorecer su interacción con el medio biológico, sus características biomecánicas en función de las cargas aplicadas, dependiendo de la estructura reemplazada, como así también su comportamiento en un organismo vivo.

En el área de la implantología, el estudio del diseño de los implantes dentales y demás dispositivos implantables, así como los tratamientos de superficies y/o los distintos recubrimientos para otorgar propiedades fisicoquímicas adecuadas para lograr una respuesta biológica deseada continúan siendo objeto de investigación. En particular, materiales metálicos como el Titanio (actual gold estándar) y la aleación de Cr-Co-Mo han sido algunos de los más estudiados [3-6].

La aleación de Cr-Co-Mo se ha utilizado en una amplia variedad de aplicaciones biomédicas, incluyendo dentales y como parte de prótesis ortopédicas [7, 8]. Esta aleación demuestra altos niveles de biocompatibilidad y posee excelentes propiedades, incluyendo resistencia a la picadura, al desgaste, a la abrasión y corrosión por grieta, así como una elevada resistencia a la fatiga, maleabilidad y ductilidad [9, 10], aunque existe evidencia de reacciones de toxicidad por la liberación de iones, en aquellas aplicaciones que incluyen la fricción de diferentes elementos prostéticos entre sí [11, 12]. En estudios anteriores [13, 14], realizados por este grupo de investigación, se demostró que las membranas de Cr-Co-Mo proporcionan un espacio adecuado para permitir el crecimiento óseo, y que la combinación de estas tanto con sangre entera como con plasma rico en plaquetas como factores promotores del crecimiento revela buenos resultados tanto en altura y volumen, como en calidad ósea. Adicionalmente, se ha observado que la implantación de la membrana propiamente dicha, sin el agregado de factores o células, posiblemente haya promovido y, tal vez, originado la proliferación,

diferenciación y adhesión celular, resultando en un aumento óseo consecuente, de forma similar a lo demostrado por Mustafa K. *et al.* (2001) [15] y Jayaraman, M. *et al.* (2004) [16] para el titanio.

Las características de la superficie del material, composición y porosidad son algunas de las propiedades que pueden modificarse para mejorar la forma en que el material implantado se relacionará con el tejido huésped y responderá en el ambiente biológico [17].

La mojabilidad refiere al estudio del comportamiento de un líquido al depositarse sobre una superficie, y la forma en la que éste se esparce sobre el material. Al colocar un dispositivo implantable y al entrar este en contacto con la sangre, la interacción entre la superficie del material de implante y la humectancia del complejo bucal determinarán de qué forma este se relacionará con la sangre, por lo que el fenómeno condicionará las características osteoconductoras del biomaterial.

Como una primera aproximación para determinar la afinidad existente entre la sangre y un biomaterial tratado superficialmente, en un medio biológico, se han desarrollado técnicas de cuantificación de la humectación a través de la medición del ángulo de contacto [18]. Esta magnitud, de simple medición y observable macroscópicamente, indica el grado de afinidad de un material por un líquido. Generalmente, se utiliza agua como medio líquido, obteniendo resultados similares a los que se producen con la sangre [19, 20].

Las características del biomaterial, el tiempo y el medio de almacenamiento del mismo, influyen en su respuesta con el ambiente biológico. El envejecimiento es el fenómeno por el cual una superficie metálica se contamina con impurezas orgánicas, principalmente hidrocarburos, captados del ambiente (atmósfera, agua u otras soluciones con las que entre en contacto), y que provocan el aumento de la hidrofobia de la superficie. Se ha demostrado que la presencia de esta clase de impurezas disminuye la afinidad entre el agua o la sangre y el material, con un consecuente empobrecimiento de la interacción entre fases [21]. Dicha contaminación es proporcional al tiempo y es mayor cuanto menos protegido se encuentre el material del ambiente [22-24]. Aita H. *et al.* (2009) [24] han propuesto un método para su eliminación, mediante irradiación con luz ultravioleta previo procedimiento quirúrgico para su implantación.

La fotofuncionalización con luz ultravioleta es una tecnología emergente en el ámbito biomédico. De acuerdo a lo expresado por Ogawa T. (2014) [25], en el titanio, se producen una serie de alteraciones fisicoquímicas que mejoran la respuesta biológica en una serie de estudios *in vitro*, demostrando una mejora considerable en la fijación, retención y la producción de consecuentes cascadas funcionales de células osteogénicas derivadas de animales y humanos, con la superficie del material luego de su irradiación con UV [26, 27]. Del mismo modo, estudios *in vivo* encontraron que la morfogénesis ósea inducida alrededor de los implantes tratados con luz UV conducen a una mejora en la unión del tejido óseo al implante [24, 28].

Este tratamiento ha demostrado ser simple, eficaz y aplicable a la totalidad de las topografías superficiales comunes en el ámbito de la implantología [23, 24, 28]. La fotofuncionalización se ha investigado principalmente en el titanio; sin embargo, recientemente se han realizado trabajos sobre otros materiales como aleaciones en base a Cr-Co [29] y Zirconia [30].

El presente trabajo tiene como objetivo estudiar la respuesta en la superficie de membranas de Cr-Co-Mo, luego de su fotofuncionalización, con el objetivo de otorgar mejoras a las características de las mismas, en relación a la hidrofilia. Para evaluar las superficies tratadas con radiación UV, se realizará un estudio *in vitro* con R-SBF, y se observará y cuantificará la deposición de cristales de Ca y P sobre las mismas, lo que indicaría que la superficie del material es adecuada para la formación de una capa de apatita similar al hueso.

Materiales y Métodos

Muestras de Cr-Co-Mo y caracterización de la superficie

Para determinar y cuantificar los cambios en la hidrofilia, provocados por el tratamiento de superficie, se emplearon discos de Cr-Co-Mo de 20 mm de diámetro y 2 mm de espesor, fabricados por colado mediante el método de cera perdida. Los discos fueron sometidos a una serie de procesos de corte y pulido, hasta obtener las muestras individuales, libre de defectos superficiales (cuya generación es intrínseca el proceso de colado).

Posteriormente, las superficies fueron granalladas con partículas de Al₂O₃ de 220 µm, y los discos fueron lavados en ultrasonido con agua bidestilada durante 10 minutos para eliminar residuos del tratamiento superficial.

Los discos se dejaron envejecer durante 2 meses, almacenados individualmente bajo una atmósfera controlada (21,85°C temperatura promedio, 77,48 % humedad relativa promedio), en ambiente oscuro y seco.

La elección de una geometría en forma de discos para la realización de las pruebas in vitro no es arbitraria. La terminación superficial es equivalente a la de implantes comerciales según lo descrito por Alfarsi et al. (2014) [31].

Irradiación con luz ultravioleta

El protocolo de irradiación contempló dos longitudes de onda del espectro ultravioleta: 254 nm (UV-C) y 365 nm (UV-A).

Para la irradiación se emplearon tubos de 15[W] de potencia, con densidad de potencia de 2[mW/cm²] para las longitudes de ondas mencionadas, con una distancia de irradiación de 3 cm. Para cada longitud de onda se irradiaron 5 discos a diferentes tiempos (15 min, 3, 12, 24 y 48 horas), más un disco testigo, sin irradiar.

Medición del ángulo de contacto

El montaje sobre el cual se depositaron las muestras para las mediciones correspondientes comprendió una platina con una inclinación de superficie de 45°, calculada experimentalmente de acuerdo al límite de deslizamiento macroscópico de la gota (Fig. 1). Se empleó una cámara digital Réflex Cannon Eos KissX5®, punto F 5.6, distancia focal 60 mm, tiempo de exposición 1/100 segundos, ISO 100; con objetivo Macro Canon® EF-S 60mm f/2.8, dispuesta de forma fija, perpendicularmente a la muestra, montada sobre un trípode. Se utilizó retroiluminación led para maximizar el contraste entre el material y la gota de agua.

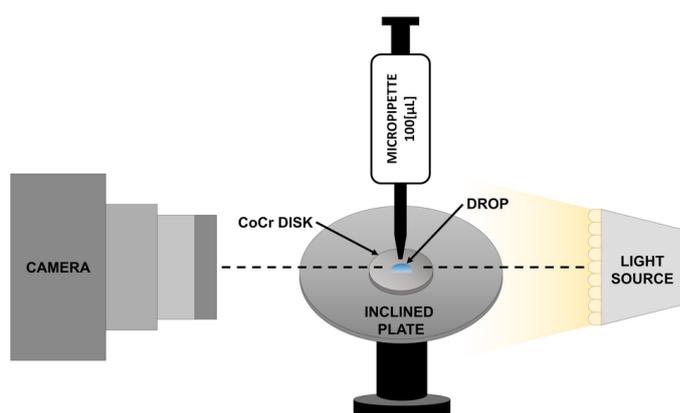


FIGURA 1. MONTAJE PARA LA CAPTURA DE IMÁGENES.

El protocolo para la obtención de imágenes pre y post irradiación consistió en la deposición de una gota de agua bidestilada de 100 µl con una micropipeta de canal simple (DragonLab®, China) y la captura de la imagen. El procedimiento se repitió 3 veces para cada muestra, previo secado mediante la inserción en una cámara de circulación de aire forzado.

Luego de la captura de las imágenes, a partir de las cuales se cuantificaron posteriormente los ángulos de contacto iniciales de cada grupo de muestras, se procedió a la irradiación de las mismas, de acuerdo al protocolo descrito en la sección anterior. Una vez alcanzado el tiempo de irradiación de cada disco, se extrajeron de la cámara y se capturaron las imágenes post-irradiación. Finalmente, las muestras fueron almacenadas individualmente en cápsulas de Petri.

Los ángulos de avance y retroceso, en los estados de pre y post irradiación, en base a los cuales se calculó el ángulo de equilibrio fueron cuantificados mediante un analizador de imagen (ImageJ, NIH, Bethesda, ML).

Inmersión en R-SBF

Luego del protocolo de irradiación, e inmediatamente a la medición del ángulo de contacto post irradiación, los discos fueron colocados individualmente en una Cápsula de Petri, donde se cubrieron con R-SBF [32] y se cultivaron en estufa a 37[°C] durante 7 días. Luego de este periodo, se eliminó la solución, se secaron los discos en campana de extracción y se almacenaron individualmente para el posterior estudio mediante espectroscopia por dispersión de energía de rayos X (EDS, Genesis 2000), en microscopio electrónico de barrido (SEM LEO 1450VP).

Análisis estadístico

El número de muestras fue de 3 para todos los estudios ($n=3$). Se utilizó el software estadístico SPSS®, y se empleó un análisis ANOVA unidireccional para examinar las diferencias entre los diferentes grupos de muestras; se consideraron significativos aquellos valores de $p < 0,05$.

Resultados

Ángulo de contacto

Para cuantificar el grado de afinidad por el medio líquido, se empleó el principio físico descrito por Young y Dupré [33], quienes formularon la ecuación matemática que relaciona las tensiones superficiales de un equilibrio trifásico, en este caso: sólido, líquido y gas, considerando la condición de equilibrio

del sistema, mediante la cual queda definido el ángulo de contacto de equilibrio para un caso ideal e hipotético.

Tadmor [34] demostró que es posible calcular el ángulo de equilibrio definido por la ecuación de Young-Dupré en función de los valores máximos del ángulo de avance y retroceso.

En este trabajo se calculará el ángulo de equilibrio de acuerdo a la ecuación de Tadmor [34] (Ec 1).

$$\theta_C = \arccos\left(\frac{r_A \cos \theta_A + r_R \cos \theta_R}{r_A + r_R}\right), \text{ con } r_A = \left(\frac{\sin^3 \theta_A}{2 - 3 \cos \theta_A + \cos^3 \theta_A}\right)^{1/3}, \text{ y (Ec. 1)}$$

$$r_R = \left(\frac{\sin^3 \theta_R}{2 - 3 \cos \theta_R + \cos^3 \theta_R}\right)^{1/3}$$

Los valores medios \pm desviación estándar de los ángulos de contacto pre y post irradiación, para ambas longitudes de onda, se muestran en la Tabla 1. Para determinar cualquier diferencia estadística entre los grupos, los datos se sometieron a un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) y prueba de Tukey. La significancia se determinó a un nivel de confianza del 95 %.

El análisis de los valores de los ángulos de contacto previa irradiación mostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los valores de los ángulos para todos los grupos de muestras.

TABLA 1. Ángulos de contacto pre y post-irradiación

LONGITUD DE ONDA	TIEMPO DE IRRADIACIÓN	ÁNGULO DE CONTACTO PRE-IRRADIACIÓN [°]	ÁNGULO DE CONTACTO POST-IRRADIACIÓN [°]
254 (UVC)	15 MIN	64,51 \pm 2,97	70,60 \pm 2,31
	3 HORAS	76,14 \pm 2,21	46,16 \pm 0,95
	12 HORAS	62,38 \pm 1,70	0,00 \pm 0,00
	24 HORAS	73,46 \pm 0,1	0,00 \pm 0,00
	48 HORAS	76,63 \pm 3,31	0,00 \pm 0,00
365 (UVA)	15 MIN	56,59 \pm 1,99	55,93 \pm 0,74
	3 HORAS	46,36 \pm 1,37	49,68 \pm 0,62
	12 HORAS	62,50 \pm 1,58	67,42 \pm 1,97
	24 HORAS	37,86 \pm 2,17	39,49 \pm 0,09
TESTIGO	48 HORAS	51,35 \pm 2,43	27,29 \pm 2,13
	SIN IRRADIAR	57,56 \pm 3,37	56,51 \pm 1,69

Al analizar estadísticamente cada longitud de onda en función de los tiempos de irradiación, se demostró que para los discos irradiados con 365 nm no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de los ángulos para los grupos correspondientes a los tiempos de irradiación de 15 minutos, 3, 12 y 24 horas, observando en ocasiones el aumento de los mismos luego de la irradiación (Fig. 2). Sin embargo, se encontró que para el grupo de discos irradiados por 48 horas existieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), correspondiendo con una disminución de los valores luego de la irradiación, resultando en superficies hidrofílicas (ángulos de equilibrio menores a 90°).

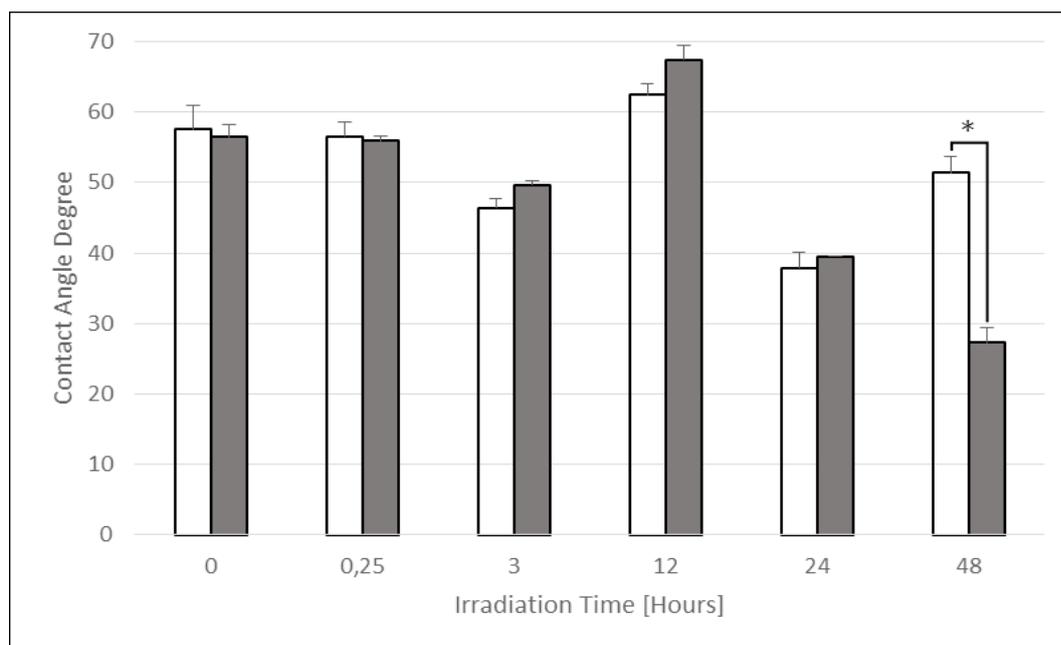


FIGURA 2. Variación de los ángulos de contacto pre y post-irradiación con 365 [nm] (UVA). No se observan diferencias significativas para los 4 primeros tiempos de irradiación. * A las 48 hs se observan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Para los discos irradiados con 254 nm, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores pre y post irradiación del grupo irradiado por 15 minutos. Sin embargo, para los tiempos de irradiación posteriores se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los valores de los ángulos pre y post irradiación, a partir de las 3 horas (hidrofilia) (Fig. 3), resultando en superficies superhidrofílicas (ángulos de equilibrio de 0°) a partir de las 12 horas de irradiación.

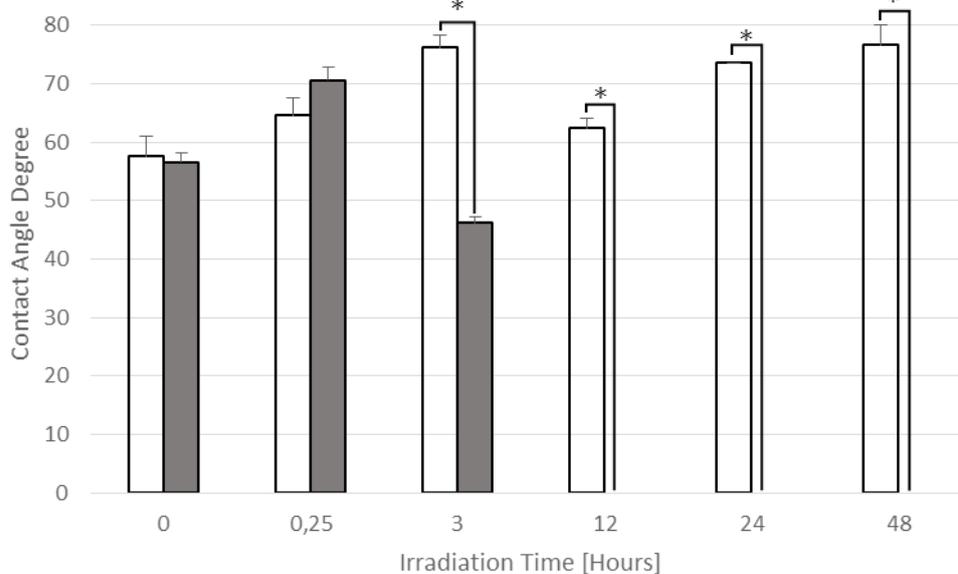


FIGURA 3. Variación de los ángulos de contacto pre y post-irradiación con 254 [nm] (UVC). No se observan diferencias significativas para el primer tiempo de irradiación (15 min). A partir de las 3 hs se observan diferencias estadísticamente significativas: * ($p < 0,05$), y a partir de las 12 hs, se observan superficies superhidrofílicas.

Al analizar los valores para el grupo control (sin irradiar), no se encontraron diferencias estadísticas entre ambos tiempos de medición (Figuras 2 y 3).

Cultivo In Vitro

A partir del análisis EDS de la composición superficial de los discos luego de su cultivo, se cuantificó mediante el método EDAX ZAF con elementos normalizados: el porcentaje en peso de los cristales de apatita (calcio y fósforo), los elementos correspondientes a la aleación (cromo, cobalto y molibdeno), y del carbono, para determinar, por un lado, la bioactividad de la nueva superficie de la membrana, y por el otro, la contaminación superficial durante la manipulación y almacenamiento de muestras durante el periodo en el cual no se realizó el microanálisis. En la figura 4 se muestra la proporción de los elementos encontrados en el mapeo de la superficie de los discos irradiados con UVA, donde se puede observar cómo el tiempo de irradiación no modifica la composición superficial de C, sino que éste aumenta en relación al aumento en el tiempo de tratamiento, además tampoco se observan diferencias significativas en la presencia de Ca y P, hasta las 24 horas.

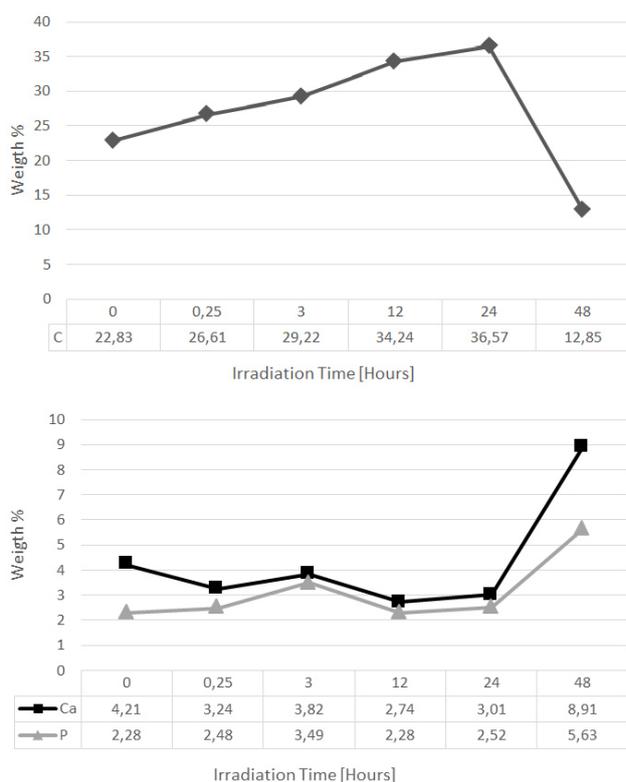


FIGURA 4. Contenido de C (a), Ca y P (b) sobre la superficie de los discos irradiados con 365 [nm] (UVA).

De forma similar a lo encontrado para el ángulo de contacto, en la muestra correspondiente a las 48 hs de irradiación, el contenido de C disminuyó significativamente, lo que se corresponde con un aumento en la deposición de cristales de Ca y P.

Respecto a las muestras irradiadas con 254 [nm] (UVC), inicialmente se observa una disminución en el contenido de carbono (hasta las 3 horas) respecto al control (sin irradiar), y vuelve a aumentar, incluso hasta valores superiores a los iniciales, para las muestras correspondientes a las 12 y 24 horas (Fig. 5). De forma similar a lo que ocurre con las muestras irradiadas con UVA, para los discos de las 48 horas, el contenido de carbono disminuye abruptamente. La concentración porcentual de cristales de Ca y P se correlaciona con la de C: al disminuir este, aumentan los primeros, y viceversa.

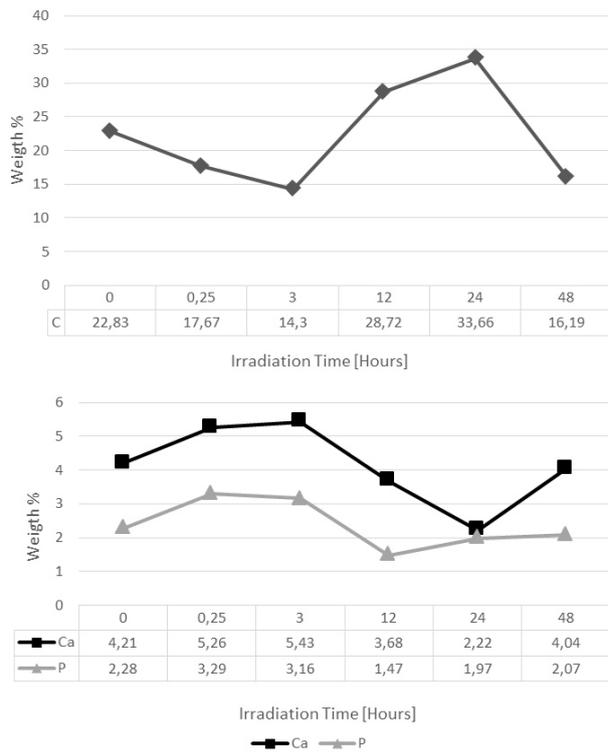


FIGURA 5. Contenido de C (a), Ca y P (b) sobre la superficie de los discos irradiados con 254 [nm] (UVC).

En la figura 6 se muestra la micrografía e histograma correspondiente a la muestra de 3 hs de exposición a UVC (derecha), donde se observó la mayor eliminación de C superficial, lo que se corresponde con una relación del contenido de Ca/P similar a la presentada por la hidroxiapatita sobre la superficie. A la izquierda se incluyen micrografía e histograma correspondiente a la muestra de 3 hs de exposición a UVA.

En la figura 7 se muestra la distribución superficial de cristales de Ca (a) y P (b) sobre el área de estudio para ambas longitudes de onda.

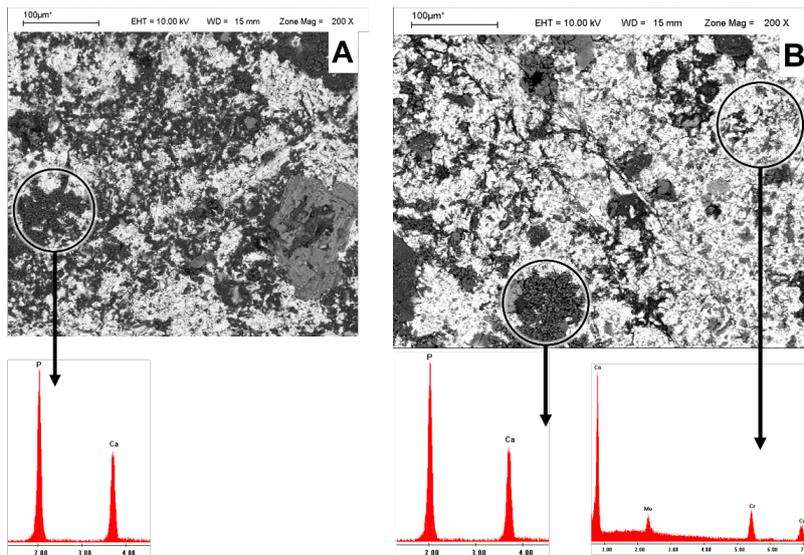


FIGURA 6. Micrografía e histograma para discos de Cr-Co-Mo irradiados con UVC durante 3 hs, cultivados en R-SBF durante 7 días.

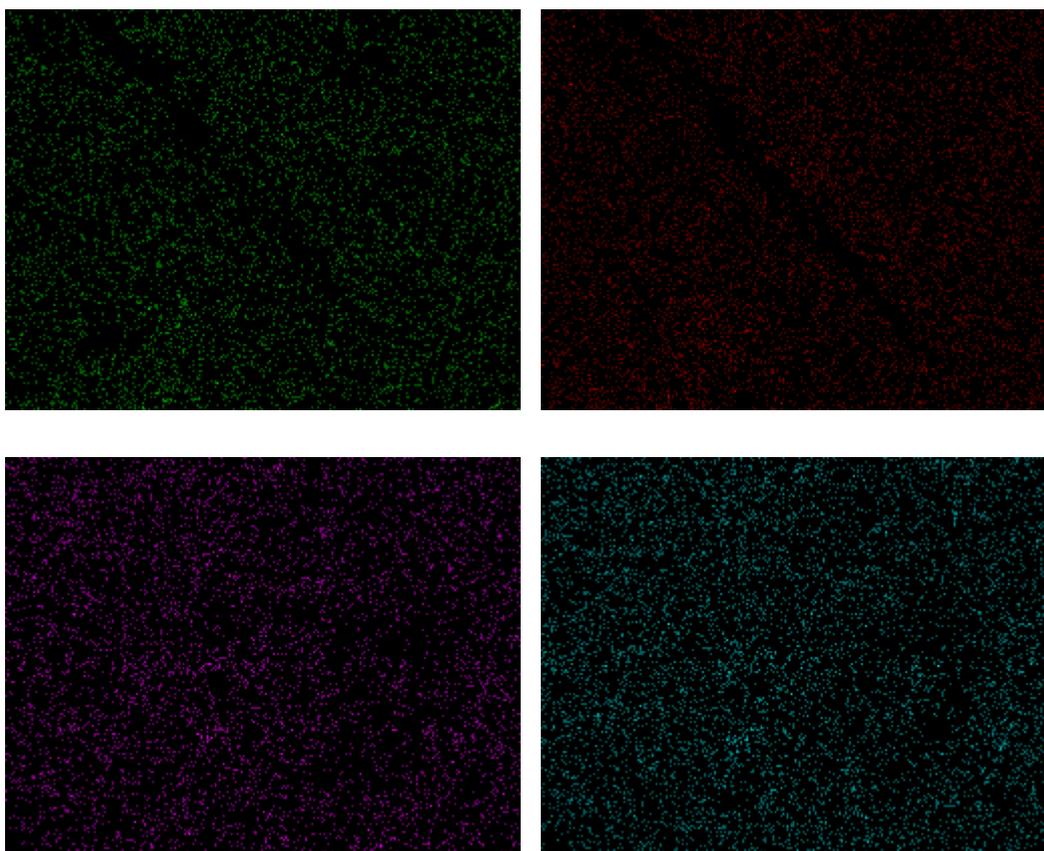


FIGURA 7. Mapeo de la distribución de Ca (a) y P (b) superficial para la muestra de 3 hs (UVC) y la distribución de Ca (c) y P (d) superficial para su homóloga, irradiada con UVA.

El promedio de la relación Ca/P para las muestras irradiadas con UVA fue de 1.37; y para las muestras irradiadas con UVC, 1.79. La relación Ca/P para la hidroxiapatita humana es de 1.67.

Discusión

La principal fuente de contaminación de los implantes durante el proceso de fabricación se produce dentro de los primeros segundos de exposición al oxígeno del aire, contaminando la superficie mediante el depósito de hidrocarburos, lo que se traduce en una disminución de la energía libre superficial, que se refleja posteriormente en un aumento en el ángulo de contacto [31, 35]. Estudios previos han informado que la deposición progresiva de hidrocarburos sobre superficies de titanio es inevitable en el entorno práctico [36, 37]. Morra *et al.* (2003) [38] analizaron la composición química de varios tipos de superficies de implantes, encontrando una deposición de carbono de 17,9 % a 76,5 % en 34 implantes de titanio diferentes, independientemente de la topografía; lo que sugiere que la deposición de hidrocarburos se puede producir en materiales a base de titanio, con cualquier textura superficial. Aunque se ha estudiado principalmente el titanio, todos los implantes utilizados hoy en día tienen una cierta cantidad de contaminación por hidrocarburos unida a la superficie. Los enlaces insaturados en la superficie de estos se saturan por la adsorción de moléculas contaminantes, que se encuentran presentes en el aire [39].

Para evaluar la presencia de hidrocarburos y la efectividad de los efectos de los tratamientos de superficie sobre los materiales de implante se emplea la medición del ángulo de contacto, como un método para caracterizar de forma precisa las nuevas superficies de los biomateriales [40]. Este parámetro

es de utilidad en la evaluación de las propiedades macroscópicas superficiales, tales como la energía superficial y la humectabilidad, indicando la efectividad del tratamiento en el aumento de la hidrofilia, lo que se corresponderá con una mayor afinidad entre la sangre y el biomaterial, en su posterior aplicación clínica [41, 42].

En nuestra investigación se emplearon discos de Cr-Co-Mo, con los mismos tratamientos superficiales desarrollados por Alfarsi, M A. et al. (2014) [31], como muestra representativa de los implantes, los cuales se dejaron envejecer durante 8 semanas previo tratamiento con luz UV, con el objetivo de verificar el depósito de hidrocarburos sobre la superficie y comprobar su influencia en el valor del ángulo de contacto, para luego evaluar el cambio en la hidrofilia posterior a su exposición a la luz UV, cuantificar los valores de los ángulos de contacto para cada situación y analizar estadísticamente los resultados obtenidos. En este aspecto se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los valores previos a la irradiación para todas las muestras, a pesar de haber sido almacenados individualmente en cápsulas de Petri bajo las mismas condiciones, por lo que se postula que la deposición de hidrocarburos sobre los discos se produce de forma aleatoria, y es altamente dependiente de la composición del aire encapsulado. Las relativamente grandes desviaciones estándar (en el rango de 0.1-3.37, aunque normales según la prueba de Shapiro-Wilk) en la medición de ángulos de contacto para un mismo disco en las sucesivas repeticiones, podría indicar que la captura de las imágenes y, por ende, la posterior medición de los ángulos, se ve alterada por las condiciones atmosféricas durante su manipulación y secado en cámara de circulación de aire, pudiendo estos ser orígenes de deposición de hidrocarburos.

Las muestras fueron irradiadas periodos determinados de tiempo con UVA y UVC, de acuerdo al protocolo descrito en la sección 2.2. Los resultados obtenidos luego de la fotofuncionalización con UVA no arrojaron diferencias estadísticas para todos los tiempos de irradiación menores a 48 horas, a diferencia de las muestras irradiadas con UVC, donde se encontraron diferencias significativas para todos los tiempos de irradiación a partir de las 3 horas. Estos resultados podrían argumentarse al analizar las propiedades intrínsecas de cada longitud de onda, ya que la radiación UVC de 254 nm (correspondiente al intervalo de máxima absorción de ozono) promueve, de forma directa, la formación simultánea y la descomposición del ozono, y son capaces de romper enlaces químicos de alta energía, como el doble enlace etilénico carbono-carbono [43], eliminando las impurezas presentes en la superficie. A las 3 horas de irradiación con UVC se observaron diferencias estadísticas ($p < 0,05$) respecto a los ángulos previa irradiación, correspondiendo a superficies hidrofílicas (ángulos menores a 90°) y, a partir de las 12 horas, se observó que los discos irradiados con UVC presentaban superficies superhidrofílicas (ángulos menores a 5°). Los resultados hallados se corresponden con los encontrados por Aita H. et al. (2009) [24, 26], quienes sometieron sus muestras de titanio a 48 horas de irradiación con UVC (densidades de potencia de 2 mW/cm²). De la misma forma, Al Qahtani, M. et al. (2015) [21], encontraron resultados similares, a los 40 minutos, exponiendo las muestras a fuentes de radiación con densidades de potencia de 15 mW/cm², en comparación a los 2 mW/cm² empleados en nuestro estudio. Att W. et al. (2009) [23] han aplicado radiación UVC durante 48 horas a una aleación de Cr-Co, encontrando superhidrofilia; los mismos resultados obtenidos en nuestra investigación, a partir de las 12 horas de irradiación.

No se encontraron diferencias entre los valores pre y post irradiación para ninguna de las longitudes de onda para los discos expuestos a 15 minutos.

Para las muestras irradiadas con UVA durante 48 horas se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), correspondientes a superficies hidrofílicas (ángulos de contacto menores a 90°), lo que está relacionado a una disminución en el contenido de carbono superficial, según los resultados obtenidos del microanálisis. Si bien se logra la disminución del carbono en la superficie, el mecanismo mediante el cual se lleva a cabo la eliminación se produciría, en este contexto, por fotocatalisis, de forma similar a lo encontrado por Zubkov T. et al. (2005) [44] para el titanio.

Inmediatamente a la irradiación con UV, las muestras fueron cultivadas *in vitro* durante 7 días a 37°C para evaluar y cuantificar la deposición de cristales de apatita sobre las superficies tratadas con UVA y UVC, de forma similar a lo realizado por Kokubo *et al.* (1996) [45], quienes han demostrado que, el requerimiento esencial para que un implante se una al hueso, es la existencia de una capa de apatita similar al hueso, y que la formación de esta en la superficie de los implantes, puede ser reproducida en condiciones experimentales, al sumergir estos materiales en líquido simulador de fluido biológico acelular, con concentraciones iónicas (Cl⁻ y HCO₃⁻) similares a las del plasma humano. La formación de esta capa de tipo apatítica es útil para la evaluación *in vitro* de la bioactividad de un material, y para la síntesis biomimética de apatita ósea. En este caso, empleamos la nueva formulación (R-SBF) propuesta por Kim *et al.* (2001) [32], correspondiendo con la versión revisada que se utiliza actualmente en la mayoría de las investigaciones *in vitro*.

Para los discos irradiados con UVA, los resultados del microanálisis mostraron que, luego del cultivo, el contenido de carbono sobre la superficie aumentó para todas las muestras irradiadas hasta 24 horas, en concordancia con la disminución del porcentaje en peso de calcio y fósforo, a diferencia de lo observado en la muestra correspondiente a las 48 horas, donde se observa lo contrario.

Para los discos irradiados con UVC se observó una disminución del carbono para las muestras de 15 minutos, 3 y 48 horas de irradiación, con aumento en la proporción Ca/P; y un marcado aumento en el contenido de carbono para las muestras de 12 y 24 horas, correspondiendo con una baja en el contenido Ca/P. Esta diferencia en la cuantificación de los elementos, posiblemente, podría deberse a que el área de mapeo es muy pequeña (1 mm²) en relación a la superficie del disco. Además, la deposición de los cristales no es uniforme, sino que varía dependiendo del lugar donde se enfoque la muestra para analizar mediante EDS, sumado a los contaminantes orgánicos que puedan depositarse durante la manipulación y almacenamiento de las muestras. En este sentido, debemos mencionar que es importante el tiempo transcurrido entre la finalización del cultivo y el estudio de cuantificación mediante microanálisis por espectroscopia; ya que, según Att W. *et al.* (2009) [23], el porcentaje atómico de carbono en las superficies de titanio aumenta de 20 a 60 % en 4 semanas en una atmósfera regular; y según Denzer *et al.* (2002) [43], el estado de bajo carbono (8-13 %) se mantiene prácticamente sin cambios durante, al menos, un día.

Al comparar el promedio de las relaciones Ca/P para las muestras irradiadas con cada longitud de onda, se observó que aquellas tratadas con UVC presentan un valor cercano al correspondiente a la composición de la hidroxiapatita humana, mientras que el promedio de la relación para las muestras tratadas con UVA fue inferior.

En concordancia con lo expresado por Aita *et al.* (2009) [24, 26] y Hori *et al.* (2010) [27], algunos de los resultados encontrados en el presente trabajo mostraron que una disminución del ángulo de contacto puede no indicar una mayor deposición de cristales de Ca y P sobre la superficie de las muestras, lo que sugiere que se pueden generar controversias al momento de relacionar los resultados hallados para el ángulo de contacto con los de la bioactividad de la superficie, proponiendo que existe una serie de variables que podrían verse afectadas por la radiación UV, pero que al momento no se han identificado, registrado ni controlado; lo que imposibilita un análisis de la relación entre las variables cuantificadas, y concluir sobre las mismas. Más allá de esto, en la práctica clínica, la superhidrofilia de las superficies podría favorecer el contacto de la sangre con el implante, agilizando los procesos de cicatrización [21].

Conclusiones

Se encontró que para las superficies granalladas de la aleación de Cr-Co-Mo se verifican modificaciones fisicoquímicas mediadas por la radiación UV, de forma similar a lo que ocurre en el titanio.

Se observaron superficies hidrofílicas a partir de las 3 horas de irradiación con UVC (254 nm), y superficies superhidrofílicas a partir de las 12 horas.

A partir de las 48 hs de irradiación con UVA (365 nm), se observó hidrofilia en la superficie de los discos de Cr-Co-Mo, lo que indicaría que a mayor tiempo de exposición podría mejorar la humectabilidad de la superficie. De todos modos, deberían realizarse estudios a tiempos de irradiación superiores a las 48 horas, considerando que la radiación UVA implica menos riesgos que la UVC, lo que justificaría su uso, si se obtienen resultados comparables, aunque sean a mayores tiempos de tratamiento.

Se pudo establecer que la disminución en el contenido de carbono se relaciona con el aumento en el contenido de calcio y fósforo, y viceversa. Además, el promedio de la relación Ca/P es más cercana a la relación de estos elementos en la hidroxiapatita humana, para las muestras irradiadas con UVC y cultivadas durante 7 días, que para las irradiadas con UVA y sometidas al mismo estudio.

Indicadores de producción

Decco, O.; Zuchuat, J.; Farkas, N. (2017). Improvement of Cr-Co-Mo Membrane Surface Used as Barrier for Bone Regeneration through UV Photofunctionalization: An In Vitro Study. *Materials*, 10(7), 825.

Bibliografía

- [1] Chen, Q., & Thouas, G. A. (2015). Metallic implant biomaterials. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 87, 1-57.
- [2] Jacobs, J. J., Gilbert, J. L., & Urban, R. M. (1998). Current concepts review-corrosion of metal orthopaedic implants. *J Bone Joint Surg Am*, 80(2), 268-82.
- [3] Larsson Wexell, C., Thomsen, P., Aronsson, B. O., Tengvall, P., Rodahl, M., Lausmaa, J., ... & Ericson, L. E. (2013). Bone response to surface-modified titanium implants: studies on the early tissue response to implants with different surface characteristics. *International journal of biomaterials*, 2013.
- [4] Saghiri, M. A., Asatourian, A., Garcia-Godoy, F., & Sheibani, N. (2016). The role of angiogenesis in implant dentistry part I: Review of titanium alloys, surface characteristics and treatments. *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal*, 21(4), e514.
- [5] Mengucci, P., Barucca, G., Gatto, A., Bassoli, E., Denti, L., Fiori, F., ... & Czyska-Filemonowicz, A. (2016). Effects of thermal treatments on microstructure and mechanical properties of a Co-Cr-Mo-W biomedical alloy produced by laser sintering. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 60, 106-117.
- [6] Chenakin, S. P., Filatova, V. S., Makeeva, I. N., & Vasylyev, M. A. (2017). Ultrasonic impact treatment of CoCrMo alloy: Surface composition and properties. *Applied Surface Science*, 408, 11-20.
- [7] Ren, F., Zhu, W., & Chu, K. (2016). Fabrication, tribological and corrosion behaviors of ultra-fine grained Co-28Cr-6Mo alloy for biomedical applications. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 60, 139-147.
- [8] Carr BC, Goswami T. Knee implants-Review of models and biomechanics. *Mater Design* 2009; 30: 398-413.
- [9] Sánchez-De Jesús F, Bolarín-Miró AM, Torres-Villaseñor CA, Cortés-Escobedo CA, Betancourt-Cantera JA. Mechanical alloying of biocompatible Co-28Cr-6Mo alloy. *J Mater Sci Mater Med* 2010; 21: 2021-2026.
- [10] Grgazka-Dahlke M, Dąbrowski JR, Dąbrowski B. Modification of mechanical properties of sintered implant materials on the base of Co-Cr-Mo alloy. *J Mater Process Tech* 2008; 204: 199-205.
- [11] Shahgaldi, BF; Heatley, FW; Dewar, A; Corrin, B. In vivo corrosion of cobalt-chromium and titanium wear particles. *J Bone Joint Surg*. 1995;77, 6:962-966.
- [12] Allen, MJ; Myer, BJ. The effects of particulate cobalt, chromium and cobalt-chromium alloy on human osteoblast-like cells in vitro. *J Bone Joint Surg*. 1997;79, 3:475-482.

- [13] Decco, O.; Cura, A.; Beltrán, V.; Lezcano, F.; Engelke, W. Bone augmentation in rabbit tibia using microfixed cobalt-chromium membranes with whole blood, tricalcium phosphate and bone marrow cells. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2015, 8, 135–144.
- [14] Decco, O. A., Beltrán, V., Zuchuat, J. I., Cura, A. C., Lezcano, M. F., & Engelke, W. (2015). Bone Augmentation in Rabbit Tibia Using Microfixed Cobalt-Chromium Membranes with Whole Blood and Platelet-Rich Plasma. *Materials*, 8(8), 4843-4856.
- [15] Mustafa, K., Wroblewski, J., Lopez, B. S., Wennerberg, A., Hulthenby, K., & Arvidson, K. (2001). Determining optimal surface roughness of TiO₂ blasted titanium implant material for attachment, proliferation and differentiation of cells derived from human mandibular alveolar bone. *Clinical oral implants research*, 12(5), 515-525.
- [16] Jayaraman, M., Meyer, U., Bühner, M., Joos, U., & Wiesmann, H. P. (2004). Influence of titanium surfaces on attachment of osteoblast-like cells in vitro. *Biomaterials*, 25(4), 625-631.
- [17] Bauer, S., Schmuki, P., von der Mark, K., & Park, J. (2013). Engineering biocompatible implant surfaces: Part I: Materials and surfaces. *Progress in Materials Science*, 58(3), 261-326.
- [18] Rupp, F., Gittens, R. A., Scheideler, L., Marmur, A., Boyan, B. D., Schwartz, Z., & Geis-Gerstorfer, J. (2014). A review on the wettability of dental implant surfaces I: theoretical and experimental aspects. *Acta biomaterialia*, 10(7), 2894-2906.
- [19] Gittens, R. A., Scheideler, L., Rupp, F., Hyzy, S. L., Geis-Gerstorfer, J., Schwartz, Z., & Boyan, B. D. (2014). A review on the wettability of dental implant surfaces II: biological and clinical aspects. *Acta biomaterialia*, 10(7), 2907-2918.
- [20] Hirota, M., Tanaka, M., Ishijima, M., Iwasaki, C., Park, W., & Ogawa, T. (2016). Effect of photofunctionalization on Ti6Al4V screw stability placed in segmental bone defects in rat femurs. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 74(4), 861-e1.
- [21] Al Qahtani, M. S., Wu, Y., Spintzyk, S., Krieg, P., Killinger, A., Schweizer, E., ... & Rupp, F. (2015). UV-A and UV-C light induced hydrophilization of dental implants. *Dental Materials*, 31(8), e157-e167.
- [22] Shen, J. W., Chen, Y., Yang, G. L., Wang, X. X., He, F. M., & Wang, H. M. (2015). Effects of storage medium and UV photofunctionalization on time-related changes of titanium surface characteristics and biocompatibility. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*.
- [23] Att, W., Hori, N., Takeuchi, M., Ouyang, J., Yang, Y., Anpo, M., & Ogawa, T. (2009). Time-dependent degradation of titanium osteoconductivity: an implication of biological aging of implant materials. *Biomaterials*, 30(29), 5352-5363.
- [24] Aita, H., Hori, N., Takeuchi, M., Suzuki, T., Yamada, M., Anpo, M., & Ogawa, T. (2009). The effect of ultraviolet functionalization of titanium on integration with bone. *Biomaterials*, 30(6), 1015-1025.
- [25] Ogawa, T. (2014). Ultraviolet photofunctionalization of titanium implants. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 29(1).
- [26] Aita H, Att W, Ueno T, et al. Ultraviolet light-mediated photofunctionalization of titanium to promote human mesenchymal stem cell migration, attachment, proliferation and differentiation. *Acta Biomater* 2009; 5:3247–3257.
- [27] Hori N, Ueno T, Suzuki T, et al. Ultraviolet light treatment for the restoration of age-related degradation of titanium bioactivity. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2010; 25:49–62.
- [28] Ueno, T., Yamada, M., Suzuki, T., Minamikawa, H., Sato, N., Hori, N., ... & Ogawa, T. (2010). Enhancement of bone–titanium integration profile with UV-photofunctionalized titanium in a gap healing model. *Biomaterials*, 31(7), 1546-1557.
- [29] Att, W., Hori, N., Iwasa, F., Yamada, M., Ueno, T., & Ogawa, T. (2009). The effect of UV-photofunctionalization on the time-related bioactivity of titanium and chromium–cobalt alloys. *Biomaterials*, 30(26), 4268-4276.

- [30] Tuna, T., Wein, M., Swain, M., Fischer, J., & Att, W. (2015). Influence of ultraviolet photofunctionalization on the surface characteristics of zirconia-based dental implant materials.
- [31] Alfarsi, M. A., Hamlet, S. M., & Ivanovski, S. (2014). Titanium surface hydrophilicity enhances platelet activation. *Dental materials journal*, 33(6), 749-756.
- [32] Kim, H. M., Miyazaki, T., Kokubo, T., & Nakamura, T. (2001). Revised simulated body fluid. In *Key Engineering Materials* (Vol. 192, pp. 47-50). Trans Tech Publications.
- [33] De Gennes, P. G., Brochard-Wyart, F., & Quéré, D. (2013). *Capillarity and wetting phenomena: drops, bubbles, pearls, waves*. Springer Science & Business Media.
- [34] Tadmor, R. (2004). Line energy and the relation between advancing, receding, and young contact angles. *Langmuir*, 20(18), 7659-7664.
- [35] Rupp, F., Scheideler, L., Olshanska, N., De Wild, M., Wieland, M., & Geis-Gerstorfer, J. (2006). Enhancing surface free energy and hydrophilicity through chemical modification of microstructured titanium implant surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 76(2), 323-334.
- [36] Hayashi, R., Ueno, T., Migita, S., Tsutsumi, Y., Doi, H., Ogawa, T.; Hanawa, T.; Wakabayashi, N. (2014). Hydrocarbon deposition attenuates osteoblast activity on titanium. *Journal of dental research*, 93(7), 698-703.
- [37] Toma, S., Lasserre, J., Brex, M. C., & Nyssen-Behets, C. (2015). In vitro evaluation of peri-implantitis treatment modalities on Saos-2osteoblasts. *Clinical oral implants research*.
- [38] Morra M, Cassinelli C, Bruzzone G, Carpi A, Di Santi G, Giardino R, et al. (2003). Surface chemistry effects of topographic modification of titanium dental implant surfaces: 1. Surface analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants* 18:40-45.
- [39] Kasemo, B., & Lausmaa, J. (1988). Biomaterial and implant surfaces: a surface science approach. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 3(4).
- [40] Lamour, G., Hamraoui, A., Buvailo, A., Xing, Y., Keuleyan, S., Prakash, V., ... & Borguet, E. (2010). Contact angle measurements using a simplified experimental setup. *Journal of chemical education*, 87(12), 1403-1407.
- [41] Hunter, A.; Archer, C.W.; Walker, P.S.; Blunn, G.W. Attachment and proliferation of osteoblasts and fibroblasts on biomaterials for orthopaedic use. *Biomaterials*, 1995.
- [42] Barbosa, J. N., Madureira, P., Barbosa, M. A., & Aguas, A. P. (2006). The influence of functional groups of self-assembled monolayers on fibrous capsule formation and cell recruitment. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 76(4), 737-743.
- [43] Denzer, A., & Simpson, J. (2002). U.S. Patent Application No. 10/492,131.
- [44] Zubkov, T., Stahl, D., Thompson, T. L., Panayotov, D., Diwald, O., & Yates, J. T. (2005). Ultraviolet light-induced hydrophilicity effect on TiO₂ (110)(1× 1). Dominant role of the photooxidation of adsorbed hydrocarbons causing wetting by water droplets. *The Journal of Physical Chemistry B*, 109(32), 15454-15462.
- [45] Kokubo, T., Miyaji, F., Kim, H. M., & Nakamura, T. (1996). Spontaneous formation of bonelike apatite layer on chemically treated titanium metals. *Journal of the American Ceramic Society*, 79(4), 1127-1129. *Dental Materials*, 31(2), e14-e24.

PID 6159

Denominación del Proyecto

Estudio de la fotofuncionalización de membranas rígidas de Cromo-Cobalto utilizadas en la generación de aumento óseo mediante radiación ultravioleta controlada

Director del proyecto

Decco, Oscar Alfredo

Codirectora

Engelke, Wilfried

Unidad Ejecutora

Laboratorio de Bioimplantes - Facultad de Ingeniería

Dependencia

Universidad Nacional de Entre Ríos

Área o disciplina científica

La Bioingeniería en la Odontología

Instituciones intervinientes públicas o privadas. Convenios o acuerdos debidamente acreditados, si correspondiera

Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Entre Ríos, Argentina y Facultad de Medicina de la Universidad Georg-August Göttingen, Robert Koch Str. 40, 37075 Göttingen, Niedersachsen, Alemania.

Integrantes del Proyecto

ZUCHUAT, Jéssica; CURA, Andrea Cecilia

Becarios de iniciación a la investigación

FARKAS, Nicolás

Fechas de iniciación y de finalización efectivas

10/09/2015 y 10/11/2017

Aprobación del Informe Final por Resolución CS N° 115/18 (05-06-2018)

[<<< VOLVER AL INICIO](#)