

**Tópico: S13. Biomateriales****Susceptibilidad a la corrosión localizada y biocompatibilidad de aceros inoxidables de uso quirúrgico**

**Ricardo W. Gregorutti<sup>a\*</sup>, Jorge E. Grau<sup>a</sup>, Cecilia I. Elsner<sup>b</sup>, Daniel Castrogiovanni<sup>c</sup>, Julieta Parisi<sup>c</sup>, Miguel Reigosa<sup>c</sup>**

<sup>a</sup> Laboratorio de Entrenamiento Multidisciplinario para la Investigación Tecnológica (LEMIT-CIC), 52 e/121 y 122, La Plata, B1900AYB, Argentina

<sup>b</sup> Centro de Investigación y Desarrollo en Tecnología de Pinturas (CIDEPINT, CIC-CONICET) y FI-UNLP, Av. 52 e/121 y 122, B1900AYB, La Plata, Argentina

<sup>c</sup> Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE, CONICET-CIC), Calle 526 y Camino General Belgrano, B1906APO, La Plata, Argentina

\* metalurgia@lemit.gov.ar

**ABSTRACT**

Corrosion resistance and biocompatibility are some of the most important properties to be satisfied by the alloys used to elaborate surgical implants. In the present work, the susceptibility to localized corrosion and cytotoxicity of ASTM F745 austenitic and ASTM A890 Type 5A duplex stainless steels were analyzed. Susceptibility to localized corrosion was evaluated by means of cyclic polarization tests using aqueous solution of 0.9 wt % NaCl at 37 °C and pH between 4 and 9. On the other hand, cytotoxicity was analyzed by neutral red (NR), methyl tetrazolium (MTT) and collagen type I assays, according to ISO 10995-5 Standard, using the rat osteoblastic cell line UMR-106 (ATCC, CRL-1661). To evaluate the biocompatibility, the technique of direct contact was performed, for that UMR-106 cells were cultivated on the sterilized alloys surfaces.

Cyclic polarization tests revealed that ASTM A890 Type 5A duplex stainless steel has lower susceptibility to pitting and greater repassivation capacity than ASTM F745 austenitic stainless steel. The better anti-corrosion behavior of the duplex stainless steel can be ascribed to its higher Cr, Mo and N content, that increase the Pitting Resistance Equivalent Number (PREN) in media containing Cl<sup>-</sup> ions.

From the biological point of view, RN, MTT and collagen type I assays, showed the absence of cytotoxic compounds released to the environment from both considered materials. At the same time, the direct contact technique showed that UMR-106 cells adhere to smooth surfaces of the alloys.

According to the methodology of analysis used, it can be concluded that both stainless steels have a high biocompatibility.

**Keywords:** Biomaterials, Stainless Steel, Biocompatibility.

**RESUMEN**

La resistencia a la corrosión y la biocompatibilidad son algunas de las propiedades más importantes que deben cumplir las aleaciones destinadas a la fabricación de implantes quirúrgicos. En el presente trabajo, se analizó la susceptibilidad a la corrosión localizada y la citotoxicidad de los aceros inoxidables ASTM F745 y dúplex ASTM A890 Tipo 5A. La susceptibilidad a la corrosión localizada se evaluó mediante ensayos de polarización cíclica usando una solución acuosa de NaCl al 0,9% a 37°C y pH entre 4 y 9. Por otro lado, los bioensayos desarrollados para evaluar la citotoxicidad fueron los de rojo neutro (RN), MTT y colágeno tipo I, de acuerdo a NORMA ISO 10995-5, empleando como sustrato diana la línea celular osteoblástica de rata, UMR-106 (ATCC, CRL-1661). Paralelamente se realizó la técnica de contacto directo, donde se cultivaron las células UMR-106 sobre las superficies pulidas y esterilizadas de las aleaciones mencionadas para determinar la biocompatibilidad de las mismas.

Los ensayos de polarización cíclica indicaron que el inoxidable dúplex ASTM A890 Tipo 5A presenta una menor susceptibilidad a sufrir picado y una mayor capacidad de repasivación que el acero inoxidable austenítico ASTM F745. La mejor respuesta a la corrosión del acero inoxidable dúplex, puede atribuirse a su mayor contenido de Cr, Mo y N que incrementan el índice de resistencia a la corrosión por picado (PREN: Pitting Resistance Equivalent Number), en medios que contienen iones cloruro.

Los bioensayos de RN, MTT y colágeno tipo I, demostraron la ausencia de compuestos citotóxicos liberados al medio de extracción. La técnica de contacto directo puso en evidencia que las células UMR-106 se adhieren a las superficies esterilizadas de las aleaciones.

De acuerdo a los resultados obtenidos con la metodología de análisis empleada se puede concluir que ambos aceros inoxidables poseen una alta biocompatibilidad.

**Palabras Clave:** Biomateriales, Aceros inoxidables, Biocompatibilidad.

## 1. Introducción

Los aceros inoxidable austeníticos ASTM F138 y ASTM F745 son usados para elaborar distintos tipos de prótesis e implantes quirúrgicos, además de ser usados en odontología para alambres de ortodoncia. Estos aceros se caracterizan por poseer una aceptable biocompatibilidad, y fundamentalmente, por su bajo costo respecto de las aleaciones de Ti y Co-Cr-Mo. Sin embargo, su resistencia a la corrosión es menor, por lo que presenta mayor susceptibilidad a sufrir procesos de corrosión localizada tales como, corrosión por picado, por crevice y corrosión bajo tensión.

Otra desventaja de los aceros inoxidable austeníticos es el porcentaje de Ni (12-14%), elemento que puede causar reacciones alérgicas y sistémico-tóxicas [1-4]. Por estos motivos, se ha evaluado al acero inoxidable dúplex como posible sustituto de los aceros inoxidable austeníticos, existiendo referencias bibliográficas que analizan este material en aplicaciones ortopédicas, incluyendo estudios de biocompatibilidad *in vitro*, y en aplicaciones odontológicas [5-11]. El acero inoxidable dúplex se diferencia del los aceros ASTM F138 y ASTM F745 en que presenta mayor contenido de Cr y menor contenido de Ni, lo que genera una estructura bifásica consistente en ferrita y austenita, en proporciones aproximadas al 50 %.

Los implantes están sometidos al medio fisiológico corrosivo del cuerpo humano, el que a su vez puede disminuir su pH debido a hematomas, inflamaciones e infecciones de los tejidos adyacentes, volviéndose más agresivo aún. En este contexto, en el presente trabajo se evaluó la susceptibilidad a la corrosión localizada en medios que simulan el entorno del cuerpo humano a distintos pH, y la biocompatibilidad de los aceros inoxidable ASTM F745 y dúplex ASTM A890 Tipo 5A, mediante estudios de citotoxicidad.

## 2. Procedimiento experimental

Los aceros inoxidable ASTM F745 y ASTM A890 Tipo 5A fueron obtenidos por fusión en horno de inducción y colado. Posteriormente, fueron sometidos a tratamientos térmicos de solubilizado, para disolver carburos y fases fragilizantes, como la fase sigma (Fe-Cr). Las composiciones químicas obtenidas se detallan en la Tabla 1.

**Tabla 1 – Composición química, en masa %, de los aceros inoxidable analizados.**

Acero	C	Cr	Ni	Mo	Si	Mn	N
ASTM F745	0,04	18,09	12,46	2,02	0,49	0,9	-
ASTM A890 Tipo 5A	0,03	25,22	7,07	4,10	1,00	0,78	0,30

La susceptibilidad a la corrosión localizada se evaluó mediante ensayos de polarización cíclica usando una solución acuosa de NaCl al 0,9% a 37°C con pH entre 4 y 9. En la celda electroquímica el material a estudiar fue el electrodo de trabajo (cilindro con área expuesta de 3 cm<sup>2</sup>), como referencia se usó un electrodo de calomel saturado (ECS) y como contraelectrodo una banda de gran área de acero inoxidable en arreglo cilíndrico. El barrido de potencial fue realizado con un potencióstato/galvanostato PAR 273A acoplado a una PC y comandados por el programa CorrWear<sup>®</sup>. El barrido de potencial se inició en un valor

0,2 V más catódico que el potencial de circuito abierto ( $E_{ca}$ ) del sistema y se continuó en sentido anódico, definiendo la condición de inversión de la dirección de barrido en un potencial de 3 V vs. el potencial del ECS o en valor máximo permisible de la densidad de corriente de 1.10<sup>-4</sup> A/cm<sup>2</sup>. La velocidad de barrido fue de 0,167 mV/s.

Los ensayos de biocompatibilidad se realizaron empleando la línea celular osteoblástica de rata UMR-106 (ATCC, CRL-1661), la que fue cultivada en medio DMEM 10% SBF a 37°C y 5% de anhídrido carbónico. El material a ensayar se puso en contacto con el vehículo de extracción (VE), consistente en el medio de cultivo, durante 72 horas a 37°C, siguiendo la relación superficie/volumen de 2 cm<sup>2</sup>/mL, de acuerdo a lo especificado por la NORMA ISO 10995-5. Los bioensayos desarrollados para evaluar la citotoxicidad fueron los de rojo neutro, ensayo de reducción del bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolico y ensayo de colágeno Tipo I.

Paralelamente se realizó la técnica de contacto directo. Dicha técnica pone en evidencia la competencia existente entre las células y el producto a analizar. Las células UMR-106 fueron cultivadas conjuntamente sobre las superficies pulidas y esterilizadas de las aleaciones.

## 3. Resultados y discusión

### 3.1 Susceptibilidad a la corrosión localizada

La susceptibilidad a la corrosión localizada fue evaluada a través del ensayo de polarización cíclica mencionado precedentemente, mediante el cual es posible determinar el potencial de corrosión ( $E_{corr}$ ), el potencial de ruptura de la película pasiva ( $E_{rupt}$ ) y el potencial de protección o repasivación ( $E_{repas}$ ). El  $E_{corr}$  es el potencial de corrosión o potencial de circuito abierto que adquiere el material en contacto con el medio corrosivo cuando no hay circulación neta de corriente; el  $E_{rupt}$  es el potencial a partir del cual se rompe la pasividad del material y se observa un aumento considerable de la corriente de disolución y el  $E_{repas}$  es el potencial al cual se completa el lazo de histéresis, denotando la repasivación del material. Cuanto mayor sea la diferencia ( $E_{rupt} - E_{corr}$ ) mayor será el rango de pasividad del material en el medio considerado y, por lo tanto, menor será su tendencia a desarrollar un proceso de picado. A su vez, cuanto menor sea la diferencia ( $E_{rupt} - E_{repas}$ ) mayor será la capacidad de repasivación del material. En las Figs. 1 a 3 se ilustran las curvas de polarización cíclica obtenidas para ambos materiales al ser expuestos al electrolito en las distintas condiciones de pH consideradas. El detalle de los valores de potencial significativos para el presente análisis se presenta en la Tabla 2.

Ambos materiales mostraron valores de  $E_{corr}$  en el rango -0,34/-0,18 V(ECS). En ningún caso se observaron tendencias monótonas de variación con el pH. Una diferencia significativa de comportamiento entre ambos materiales radica no sólo en el amplio rango de pasividad presentado por el acero ASTM A890 Tipo 5A, sino que también para todas las condiciones de pH consideradas, el  $E_{repas}$  estuvo muy próximo al  $E_{rupt}$ , lo que permite establecer que para este material su condición de pasividad resulta más estable y por ende le confiere mayor potencial para ser utilizado como biomaterial.

Tomando como referencia el criterio teórico definido por el índice de resistencia a la corrosión por picado (PREN: Pitting Resistance Equivalent Number), en medios que contienen iones cloruro, ec. (1) [12], este comportamiento podría ser atribuido a su mayor contenido de Cr y Mo y a

la presencia de N en su composición.

$$\text{PREN} = \%Cr + 3,3\%Mo + 16\%N \quad (1)$$

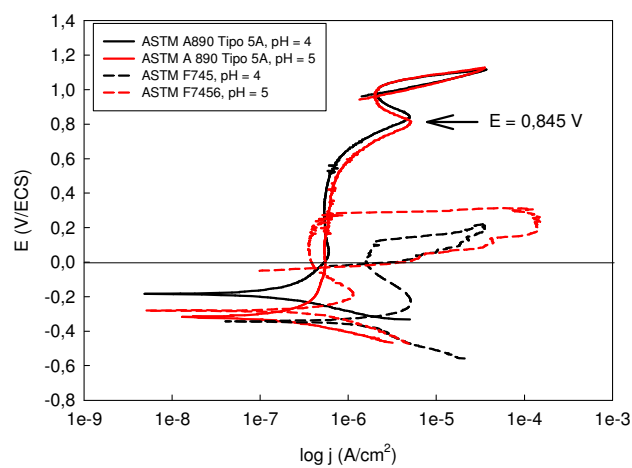


Figura 1 - Curvas obtenidas a pH 4 y 5.

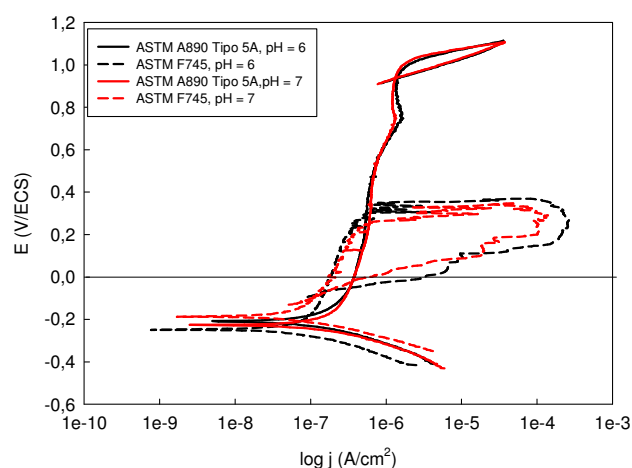


Figura 2 - Curvas obtenidas a pH 6 y 7.

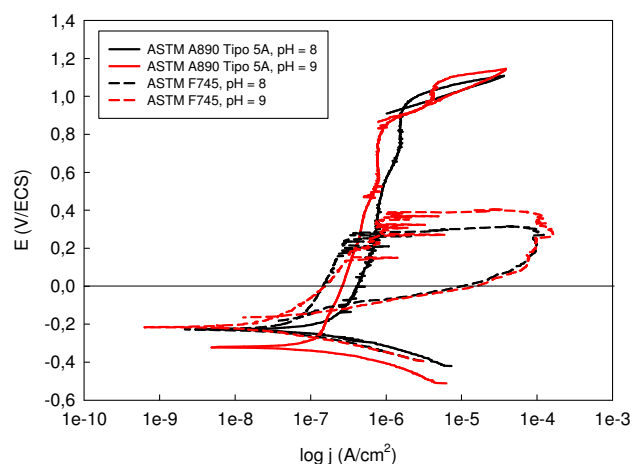


Figura 3 - Curvas obtenidas a pH 8 y 9.

Tabla 2 - Potenciales obtenidos de las curvas de polarización cíclica. Valores en V/ECS.

pH	ASTM A890 Tipo 5A				
	$E_{\text{Corr}}$	$E_{\text{Rupt}}$	$E_{\text{Repas}}$	$E_{\text{Rupt}} - E_{\text{Corr}}$	$E_{\text{Rupt}} - E_{\text{Repas}}$
4	-0,184	1,000	0,976	1,184	0,024
5	-0,318	0,998	0,960	1,316	0,038
6	-0,208	0,974	0,936	1,182	0,038
7	-0,226	0,996	0,936	1,222	0,060
8	-0,227	0,960	0,935	1,187	0,025
9	-0,322	0,853	0,935	1,175	-

pH	ASTM F745				
	$E_{\text{Corr}}$	$E_{\text{Rupt}}$	$E_{\text{Repas}}$	$E_{\text{Rupt}} - E_{\text{Corr}}$	$E_{\text{Rupt}} - E_{\text{Repas}}$
4	-0,343	0,121	-0,010	0,464	0,131
5	-0,281	0,284	-0,036	0,565	0,320
6	-0,249	0,351	-0,070	0,600	0,421
7	-0,187	0,260	-0,097	0,447	0,357
8	-0,227	0,283	-0,167	0,510	0,450
9	-0,216	0,389	-0,159	0,605	0,548

De acuerdo a las composiciones químicas indicadas en la Tabla 1, el PREN para el acero dúplex ASTM A890 Tipo 5A (43,5) es sensiblemente mayor al correspondiente al acero ASTM F745 (24,8), lo que estaría indicando una mayor resistencia al picado del primero.

Una particularidad que presentaron las curvas obtenidas para el acero dúplex ASTM A890 Tipo 5A fue la definición de un pico anódico de corriente a potenciales cercanos a 0,845 V(ECS); la definición del pico fue haciéndose menos notoria a medida que se alcalinizaba el electrolito. Tomando como referencia comportamientos similares reportados en la bibliografía este pico podría atribuirse a la generación de iones solubles. En el caso de materiales con alto contenido de Cr, como los aceros inoxidable analizados en el presente trabajo, se ha reportado que a altos potenciales, el Cr podría oxidarse formando iones dicromato ( $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ), que son solubles en la solución de NaCl utilizada. El proceso se conoce como disolución transpasiva, y decrece hasta el inicio de una pasivación secundaria de origen desconocido [13]. Este proceso podría explicar la respuesta registrada a pH = 9, donde se observó un aumento de la densidad de corriente a 0,853 V/ECS y luego una breve segunda pasivación hasta 1,063 V/ECS.

### 3.2 Ensayos de biocompatibilidad

Los ensayos de biocompatibilidad se realizaron para evaluar la citotoxicidad de los aceros inoxidable analizados. Se entiende por citotoxicidad a la disminución de la proliferación celular inducida por un agente físico, químico o biológico. Los bioensayos realizados fueron los siguientes:

- Ensayo de Rojo Neutro (RN): Esta técnica evalúa la pérdida de la viabilidad celular. Un determinado compuesto se denomina citotóxico cuando interfiere en el proceso de división y multiplicación celular, provocando una disminución de la velocidad de crecimiento celular, lo que se manifiesta en el número de células presentes en el cultivo.
- Ensayo de reducción del bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolico (MTT): Este ensayo determina la viabilidad celular, a partir de la capacidad de las células de reducir al MTT a un

compuesto denominado formazan, después de su exposición ante el compuesto cuya toxicidad se pretende evaluar.

- Ensayo de determinación de colágeno Tipo I: El ensayo consiste en la coloración del colágeno producido por las células osteoblásticas, mediante un dado colorante, en una solución saturada de ácido pícrico. El colorante fijado al colágeno se extrae y luego se mide su absorbancia.

En la Fig. 4 se ilustran los resultados del ensayo de RN, donde si bien se observa una ligera disminución en el porcentaje de viabilidad celular en el cultivo correspondiente al acero dúplex ASTM A890 Tipo 5A, las diferencias no son significativas respecto del control de referencia (CTR).

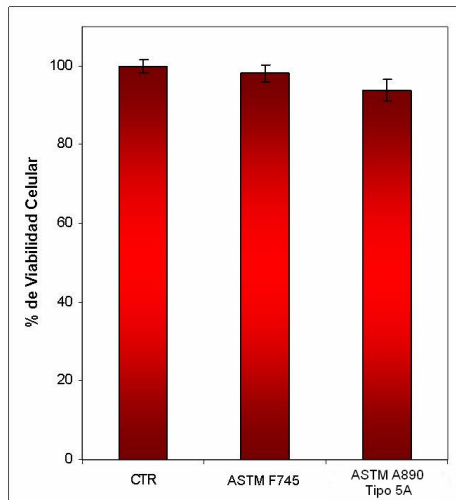


Figura 4 - Resultados del bioensayo de Rojo Neuto.

El mismo resultado se ha observado en el ensayo de reducción del MTT (Fig. 5), notándose una elevada viabilidad celular, respecto del CTR. En el caso del ensayo de colágeno Tipo I (Fig. 6), se apreció que la producción de colágeno fue cercana a la del CTR. La elevada viabilidad celular observada en los tres ensayos, indica la ausencia de compuestos citotóxicos en el medio de cultivo, por lo que se estima que la biocompatibilidad de ambos aceros es satisfactoria, en las condiciones de ensayo establecidas.

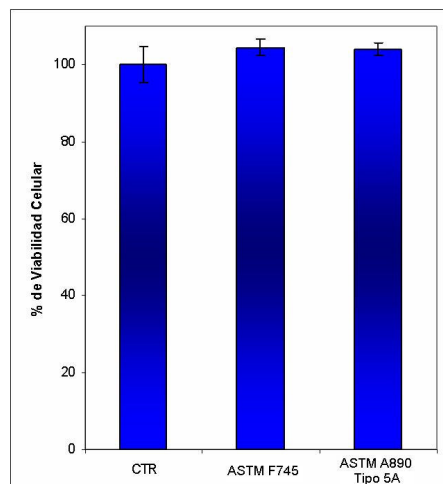


Figura 5 - Resultados del bioensayo de MTT.

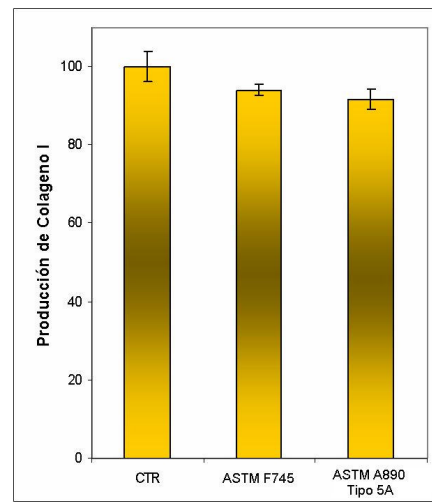


Figura 6 - Resultados del bioensayo de colágeno Tipo I.

Por otro lado, las Figs. 7 y 8 ilustran células UMR-106 sembradas sobre las superficies de ambos aceros, mediante la técnica de contacto directo. Las células fueron coloreadas con Naranja de Acridina para lograr un mayor contraste, observándose que las mismas se han adherido sin cambios en su morfología.

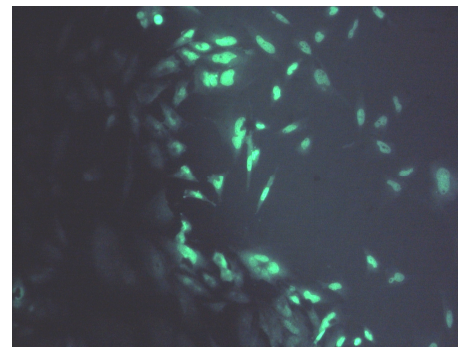


Figura 7 - Células UMR-106 crecidas sobre la superficie del acero ASTM F745, tomadas a 100 X.

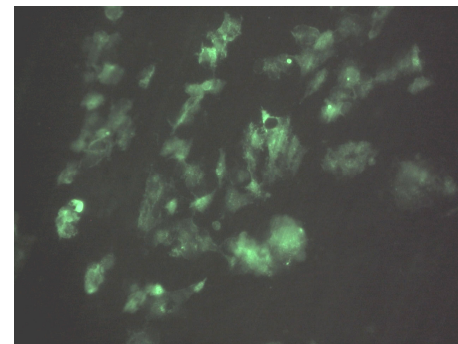


Figura 8 - Células UMR-106 crecidas sobre la superficie del acero dúplex ASTM A890 Tipo 5A, tomadas a 100 X.

#### 4. Conclusiones

En las condiciones de ensayo consideradas el acero inoxidable dúplex ASTM A890 Tipo 5A ha mostrado menor susceptibilidad a sufrir corrosión localizada que el acero ASTM F745, al poseer un rango de pasividad más amplio y una mayor capacidad de repasivación. Estas propiedades no presentaron variaciones significativas en el rango de pH considerado.

En cuanto a los bioensayos realizados para evaluar la citotoxicidad de ambos aceros, se ha observado que la viabilidad celular ha sido satisfactoria, evidenciando la ausencia de compuestos citotóxicos liberados al medio, en las condiciones de ensayo establecidas. Al mismo tiempo, las células sembradas sobre las respectivas superficies no sufrieron cambios en su morfología. De acuerdo a estos resultados, los aceros inoxidables analizados presentan una muy buena biocompatibilidad.

De la totalidad de los resultados obtenidos puede concluirse que en las condiciones consideradas el acero inoxidable dúplex ASTM A890 Tipo 5A es el material con mejor performance para ser utilizado como biomaterial.

#### Agradecimientos

Al LEMIT, a la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, al CONICET y a la UNLP, por el apoyo económico brindado para el desarrollo del trabajo.

#### REFERENCIAS

- [1] M. Niinomi, Metallurgical and Materials Transactions **33 A** (2002) 477.
- [2] W. Bal, H. Kozłowski, K. Kasprzak, Journal of Inorganic Biochemistry **79** (2000) 213.
- [3] K. Yang, Y. Ren, Science and Technology of Advanced Materials **11** (2010) 1.
- [4] M. Sumita, T. Hanawa, S.H. Teoh, Materials Science and Engineering C **24** (2004) 753.
- [5] A. Cigada, G. Rondelli, B. Vicentini, M. Giacomazzi, A. Roos, Journal of Biomedical Material Research **23** (1989) 1087.
- [6] A. Cigada, G. De Santis, A. M. Gatti, A. Roos, D. Zaffe, Journal of Applied Biomaterials **4** (1993) 39.
- [7] M. M. Beloti, J. M. D. A. Rollo, A. Itman Filho, A.L. Rosa, Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics **2** (2004) 162.
- [8] J. Pan, C. Karlén, C. Ulfvin, Journal of The Electrochemical Society **147** (2000) 1021.
- [9] K. Oh, Y. Kim, Y. Park, K. Kim, Journal of Biomedical Material Research B: Applied Biomaterials **69** (2004) 183.
- [10] A. Kocijan, M. Conrado, Materials and Technology **44** (2010) 21.
- [11] J. A. Platt, A. Guzman, A. Zuccari, D. W. Thornburg, B. F. Rhodes, Y. Oshida, B. K. Moore, American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, **112** (1997) 69.
- [12] G. S. Frankel, Metals Handbook **13A Corrosion Fundamentals, Testing and Protection** (pp. 591-599). ASM International Ohio (2003).
- [13] J. G. N. Thomas, G. Hinds (Ed.), The electrochemical of Corrosion (pp. 1-25). Jeeva4384 Publisher (2014).