

Evaluación de la bioactividad in vitro de recubrimientos compuestos de chitosan/Bioglass®/TiO₂

Evaluation of the in vitro bioactivity of chitosan/Bioglass®/TiO₂ composite coatings

Silvia Clavijo¹, Paola Torres¹, Sofía Elena Santillán², María José Santillán^{1,3}

1.Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria-UNCUYO. 2. Facultad de Ciencias Médicas-UNCUYO.

3-Facultad de Ingeniería-UNCUYO.

scclavijo@fcai.uncu.edu.ar

Resumen

Desde el descubrimiento de Bioglass®, una gran cantidad de materiales cerámicos han sido investigados para uso potencial en el campo de la ingeniería de tejidos. En este ámbito es bien conocida la habilidad que exhiben los materiales bioactivos para unirse al tejido óseo a través de la formación de una capa de hidroxiapatita cristalina, al ponerlos en contacto con fluidos fisiológicos simulados o reales. En el área de materiales bioactivos, los recubrimientos compuestos representan una opción muy atractiva para promover propiedades funcionales diferentes a las que presentan los materiales individualmente. Con el propósito de obtener recubrimientos compuestos con alta bioactividad se fabricaron por deposición electroforética (EPD) recubrimientos de chitosan/Bioglass®/TiO₂. Se desarrolló una serie de experimentos para optimizar la calidad de las películas depositadas por EPD teniendo en cuenta la densidad y adherencia de los depósitos al sustrato, donde se incluyó la evaluación de parámetros tales como tiempo de deposición, voltaje aplicado, pH de la suspensión, y conductividad. Posteriormente, los depósitos obtenidos fueron sumergidos en fluido fisiológico simulado (SBF) a pH de 7.25 y una temperatura de 37°C por un periodo de 14 y 21 días. Los cambios microestructurales generados durante la reacción ocurrida en la superficie del material compuesto fueron caracterizados empleando microscopía electrónica de barrido (MEB). De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo se demostró la formación de una capa densa y homogénea de hidroxiapatita cristalina sobre la superficie de todos los depósitos compuestos obtenidos. Los resultados obtenidos indican que los materiales compuestos conformados a partir de chitosan y Bioglass® son materiales altamente potenciales para la regeneración de tejido óseo.

Palabras clave: deposición electroforética, materiales bioactivos, chitosan, vidrio bioactivo

Abstract

Since the discovery of Bioglass®, a large number of ceramic materials have been investigated for potential use in the field of tissue engineering. The ability of bioactive materials to bind to bone tissue through the formation of a crystalline hydroxyapatite layer upon contact with simulated or real physiological fluids is well known in this field. In the area of bioactive materials, composite coatings represent a very attractive option to promote functional properties different from those of individual materials. In order to obtain composite coatings with high bioactivity, chitosan/Bioglass®/TiO₂ coatings were fabricated by electrophoretic deposition (EPD). A series of experiments were developed to optimise the quality of the EPD deposited films taking into account the density and adhesion of the deposits to the substrate, including the evaluation of parameters such as deposition time, applied voltage, pH of the suspension, and conductivity. Subsequently, the obtained deposits were immersed in simulated physiological fluid (SBF) at pH 7.25 and a temperature of 37°C for a period of 14 and 21 days. The microstructural changes generated during the reaction on the surface of the composite material were characterised using scanning electron microscopy (SEM). According to the results obtained in the present work, the formation of a dense and homogeneous layer of crystalline hydroxyapatite on the surface of all the composite deposits obtained was demonstrated. The results obtained indicate that composite materials made from chitosan and Bioglass® are highly potential materials for bone tissue regeneration.

Keywords: electrophoretic deposition, bioactive materials, chitosan, bioactive glass

1. Introducción

Desde la década de 1970 hasta la actualidad, los materiales cerámicos bioactivos han sido utilizados para la regeneración o remplazo total de tejido óseo dañado. La aplicación de tales materiales, promueve la unión entre la prótesis y el tejido circundante a partir de la formación de una capa de hidroxiapatita similar a la ósea, originando una continuidad fisicoquímica, reduciendo de este modo el rechazo del tejido al material implantado (Hutmacher et al. 2007). Los materiales más estudiados en el área de biocerámicos incluyen diferentes tipos de vidrios bioactivos principalmente: vidrios silicatos (Yao, et al. 2015) fosfatos (Ahmed et al. 2008) y boratos (ElBatal et al. 2016). Los vidrios bioactivos, en particular los vidrios en base sílice como el Bioglass®, presentan una alta bioactividad y por ende son materiales potenciales para diversas aplicaciones de reemplazo óseo.

El Bioglass® (45S5) tiene la siguiente composición en peso: 45% óxido de silicio (II) SiO_2 , 24.5% óxido de calcio (CaO), 24.5% óxido de sodio (Na_2O), y 6% de pentóxido fosforoso (P_2O_5) porcentaje en peso. El material Bioglass® está compuesto de minerales que se encuentran naturalmente en el cuerpo (SiO_2 , Ca, Na_2O , H, and P), y las proporciones moleculares de óxidos de calcio y fósforo son similares a las encontradas en los huesos (Krishnan *et al.* 2013). Recubrimientos de quitosan/Bioglass® se han obtenido anteriormente por deposición electroforética (EPD) sobre sustratos metálicos (Pishbin *et al.* 2011).

En este trabajo se empleó la técnica de EPD para obtener recubrimientos de quitosan/Bioglass®/ TiO_2 sobre sustratos de acero inoxidable. La EPD es una técnica ampliamente utilizada para el procesamiento de biomateriales debido a su buena relación costo-efectividad y versatilidad. En los últimos años, la EPD ha despertado interés en el campo biomédico, debido a la posibilidad de producir novedosas micro y nanoestructuras, así como combinaciones de materiales de gran interés para aplicaciones biomédicas (Corni *et al.* 2009). La deposición electroforética (EPD) implica la deposición sobre un sustrato conductor de carga opuesta (electrodo de deposición) de partículas cargadas que se encuentran suspendidas en un medio líquido cuando se aplica un campo eléctrico (Zheng *et al.* 2014).

El módulo de Young y la resistencia a la compresión son parámetros importantes para caracterizar las propiedades mecánicas en los

materiales compuestos que van a ser utilizados en sustitución ósea. El Módulo de Young, que es la pendiente de la curva tensión-deformación en la región elástica, proporciona información sobre la rigidez del compuesto. Teniendo en cuenta que la carga sobre los huesos en el cuerpo es por lo general a la compresión, es importante estudiar el límite de elasticidad. La tenacidad a la fractura da información importante acerca de la energía que se absorbe hasta la fractura. Ante esto, el objetivo de este trabajo consistió en la fabricación de recubrimientos aptos para ser utilizados en ingeniería de tejidos por lo cual se realizó la medición del módulo de Young y resistencia a la compresión de los mismos, a la vez que se investigó la biocompatibilidad de estos materiales sintéticos utilizando simulador de fluido corporal (SBF) acelular.

2. Metodología Empleada

La EPD consta de dos etapas. La primera etapa es la migración de partículas cargadas suspendidas en el medio líquido hacia el electrodo de deposición; la segunda etapa es la deposición de partículas en el electrodo de deposición formando un depósito o película compacto denso y homogéneo (Figura 1).

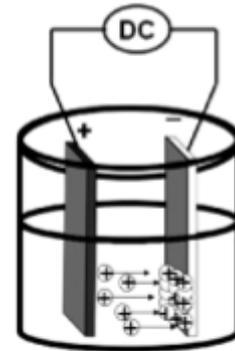


Figura 1 – Esquema de una celda de EPD. Las partículas con carga superficial positiva se depositan sobre el electrodo de deposición para formar un depósito denso y compacto.

La deposición electroforética se puede clasificar en dos tipos de acuerdo a cuál sea el electrodo de deposición (ánodo o cátodo). Cuando las partículas en suspensión tienen carga positiva, la deposición se lleva a cabo en el cátodo y el proceso se llama deposición electroforética catódica (ver Figura 1). Si las partículas en suspensión se cargan negativamente la deposición tiene lugar en el ánodo y el proceso se llama deposición electroforética anódica. Por lo tanto por modificación adecuada de la carga superficial de las partículas, se puede lograr cualquiera de los dos modos de deposición.

Los pasos necesarios para realizar el recubrimiento del sustrato metálico son los siguientes:

1) Preparación de la superficie: consiste en la limpieza adecuada del objeto con acetona y posterior enjuague con agua destilada.

2) La preparación de una suspensión estable a ser utilizada en deposición electroforética implica colocar los reactivos chitosan (MW=80 kDa) con grado de deacetilación de 85% (Sigma-Aldrich), Bioglass® en polvo 45S5 y nanopartículas de dióxido de titanio (TiO₂-P25) (80% anatasa y 20% rutilo con área superficial de cerca de 50 m².g⁻¹ y tamaño medio de partícula de 21 nm, Degussa Co, Germany) en solución acuosa de ácido acético 0,01 M. Dicha suspensión se coloca en agitador magnético durante 30 minutos y luego 2 horas en ultrasonido.

3) Una placa de acero AISI 316L con dimensiones de 20 mm x 30 mm se elige como sustrato y se lo emplea como cátodo en el interior de una cuba que contiene la suspensión. Se utilizó un ánodo de acero inoxidable, ambos separados por una distancia de 15 mm. Los electrodos se conectaron a una fuente de corriente continua PASCO SE-9721A (PASCO Instrument, Roseville, USA). Al concluir el proceso de EPD, se extrajo el sustrato recubierto del baño y se introdujo en un desecador.

4) Las muestras se sometieron a pruebas de bioactividad *in vitro* por medio de la inmersión de las mismas durante diferentes periodos de tiempo (14 y 21 días), manteniendo constantes las condiciones fisiológicas (pH= 7.25 y 37°C). Se utilizó una solución de fluido corporal simulada (SBF). Dicha solución SBF se preparó por disolución de los siguientes reactivos en agua desionizada: NaCl, NaHCO₃, KCl, K₂HPO₄.4H₂O, MgCl₂.6H₂O, CaCl₂.2H₂O, (CH₂OH)₃ CNH₂ y Na₂SO₄, de acuerdo al procedimiento descrito por Kokubo (Kokubo, 1991). El pH de la solución se ajustó a 7.25 con tris-hidroximetil-aminometano y HCl 1N y se realizó a 36.5±0.5°C. El SBF utilizado posee una concentración iónica inorgánica similar a la del plasma sanguíneo humano, ver Tabla 1.

Tabla 1. Concentración iónica del fluido fisiológico simulado (SBF) y del plasma sanguíneo humano.

Concentración iónica (nM)	Plasma sanguíneo humano	SBF
Na+	142	142
K+	5	5
Ca ²⁺	2.5	2.5
Mg ²⁺	1.5	1.5
Cl-	103	147.8

HCO ₃ -	27	4.2
HPO ₄ ²⁻	1	1
SO ₄ ²⁻	0.5	0.5

5) Medición de propiedades mecánicas: La resistencia a la compresión y la elongación porcentual (%) se determinaron en un texturómetro TA.XT2i – Stable Micro Systems (Inglaterra) mediante ensayos según la norma ASTM D638-01 (2001). Para los ensayos se utilizaron probetas circulares de 6 cm de longitud y diferentes espesores producidas por EPD. Las curvas de fuerza (N) en función de la deformación (mm) fueron registradas por el software Texture Expert Exceed.

6) Caracterización de recubrimientos: Se utilizó Microscopía Electrónica de Barrido MEB (JEOL JSM-7000F) para caracterizar la uniformidad de la microestructura de recubrimientos, porosidad residual, así como para evaluar la presencia de bioactividad en los recubrimientos.

3. Resultados y Discusión

3.1. Deposición Electroforética (EPD)

Debido a que el chitosan es un polication, se estimó que el proceso electroforético catódico se podía emplear para preparar películas de chitosan. El chitosan no se disuelve adecuadamente en agua pura y precipita cuando se emplean valores altos de pH (Pishbin, *et al.*2011), por lo que se utilizó una solución acuosa de ácido acético 0,01 M para obtener una suspensión con 0,16 g/l de chitosán, 20 g/l de Bioglass® y 15 g/l de TiO₂. Trabajando a temperatura ambiente, se aplicó un voltaje continuo de 2 V y se observó la formación de un depósito sobre el cátodo durante el proceso de EPD.

Se desarrollaron varias series de experimentos a fin de optimizar los parámetros de EPD. Una de ellas involucró el proceso de deposición a concentración de sólidos constante variando el voltaje entre 0 y 3 V (Figura 2).

En la Figura 3 podemos observar el peso depositado por unidad de área de recubrimiento cuando se han seleccionado dos suspensiones de composición diferente y se han realizado deposiciones a diferentes tiempos de control.

En la Figura 4 es posible observar las características microestructurales por medio de microscopía SEM de los depósitos chit-BG-TiO₂ sobre sustratos metálicos planos obtenidos por deposición electroforética (EPD) operando a temperatura ambiente.

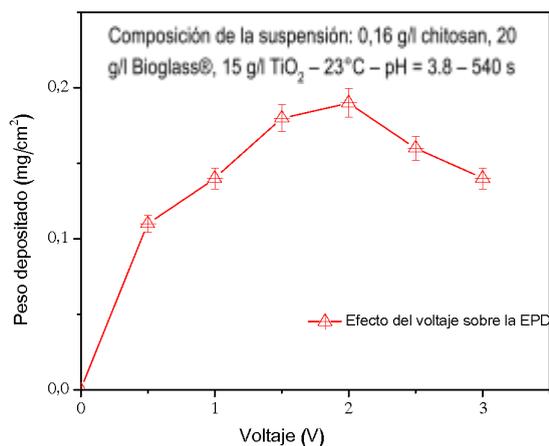


Figura 2. Efecto del voltaje sobre el peso de recubrimiento de Chit-BG-TiO₂ depositado por EPD

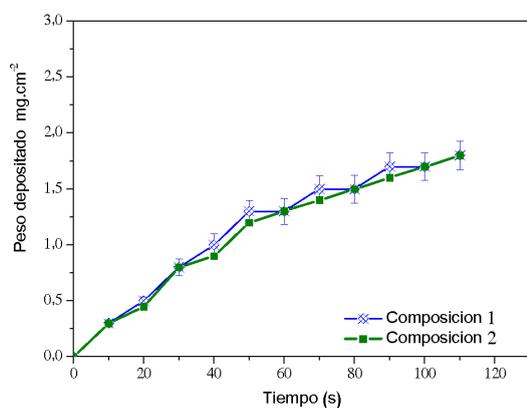


Figura 3. Peso depositado vs. tiempo para suspensiones de Chit-BG-TiO₂; 2 V

A bajas magnificaciones (Fig. 4 a y b) las partículas de vidrio bioactivo y nanopartículas de TiO₂ están incrustados en la matriz de chitosan pero su distribución no es uniforme. Se pueden observar, aglomeraciones de partículas que pueden ser atribuidas posiblemente a Bioglass®. La figura 5 muestra el espectro EDS correspondiente a la muestra observada en la Figura 4.

Los picos corresponden a C, Si, Na, O, Ca y Ti (C: 68%; Si: 2%; O: 19%; Ca:9%). El espectro de EDS obtenido de la muestra es consistente con los elementos presentes en los recubrimientos compuestos de Ch-BG-Ti.

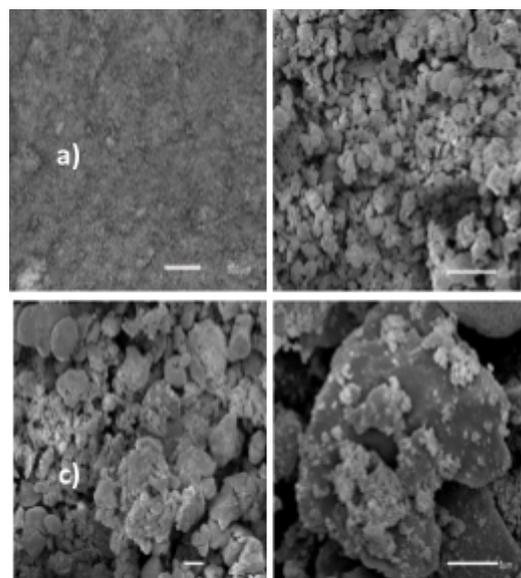


Figura 4. Morfología superficial de recubrimientos de Chit-BG-TiO₂ obtenidos por EPD a 2 V DC (Composición 1 fig. 3).

3.2. Propiedades mecánicas

3.2.1 Medición de la resistencia a la compresión y Módulo de Young

El Módulo de Young y la resistencia a la compresión del hueso humano están en el rango de 1-20 GPa y 1-200 MPa (Hench, 1998), respectivamente. Con el aumento de la densidad ósea tanto el Módulo de Young como la resistencia a la compresión aumentan significativamente. Dado que el objetivo de realizar recubrimientos bioactivos de chit-BG-TiO₂ sobre sustratos metálicos se centra en estudiar su posible aplicación como material para ingeniería de tejidos, el estudio de la resistencia a la compresión y módulo de Young permite establecer si el material tendrá un comportamiento similar al hueso.

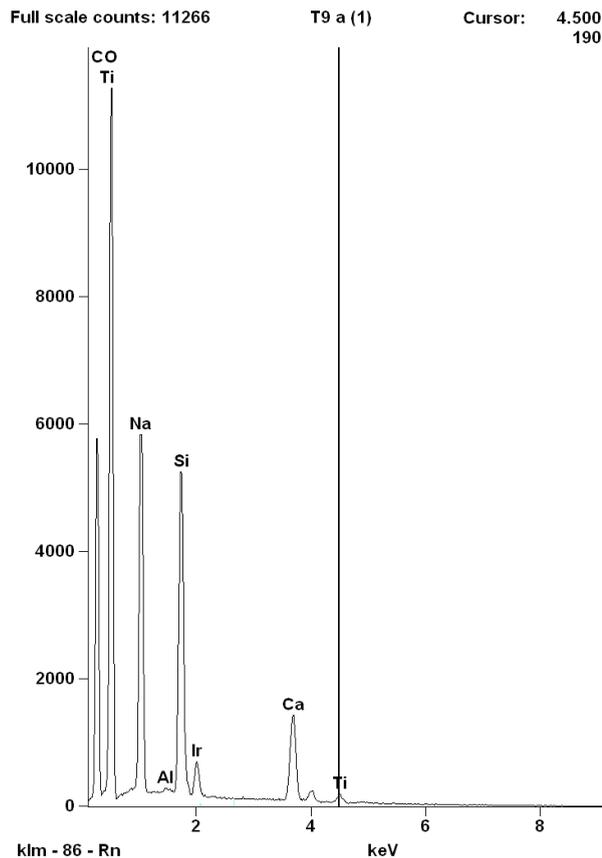


Figura 5. Espectro EDS correspondiente al recubrimiento observado en la figura 4.

La resistencia a la compresión del recubrimiento de la figura 4 es de 16 MPa. Dicho recubrimiento sin Titania presenta una resistencia a la compresión de 12 MPa. El valor del módulo de Young para la película de chit-BG-TiO₂ es de 62,63 MPa mientras que es 41,63 MPa cuando el composite no tiene Titania. En este caso. Como podemos apreciar, el valor de las propiedades mecánicas de los recubrimientos es inferior al del hueso, por lo cual este material debe ser sinterizado si se desea utilizarlo como reemplazo de estructuras óseas.

3.3. Evaluación de la bioactividad

T. Kokubo propuso que para que un material artificial pueda crear un enlace directo con el hueso, luego de ser implantado en el cuerpo humano, era necesaria la formación de una capa de apatita similar a la del hueso en su superficie, Esta formación puede ser reproducida en un fluido corporal simulado (SBF – simulated body fluid) que contiene concentraciones de iones similares a las del plasma sanguíneo humano (ver Tabla 1), por lo que la bioactividad de un material puede ser precedida por medio de la formación de apatita en su superficie cuando se lo sumerge en SBF. Por otro

lado, también existen resultados cuantitativos (Takadama 2006) que muestran que el grado de formación de apatita de los materiales inmersos en SBF predice el grado de formación que puede inducir in vivo.

Se evaluó la bioactividad de los recubrimientos compuestos de chit-BG-TiO₂ sobre acero 316L, utilizando el SBF como medio de inmersión, el cual fue renovado semanalmente; ya que, en el cuerpo, existe una renovación continua del fluido fisiológico. Según L.M. Grover y colaboradores, la renovación del medio incrementa la formación de la capa de hidroxiapatita. Imágenes SEM de las películas de chit-BG-TiO₂ luego de 14 días de inmersión se muestran en las figuras 6 y 7. Una notable precipitación homogénea de hidroxiapatita (partículas de forma esférica pequeñas) se puede observar que se ha formado sobre la superficie del recubrimiento.

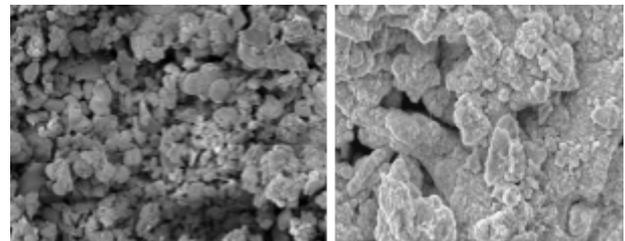


Figura 6. Micrografías SEM a baja magnificación de recubrimientos de chit-BG-TiO₂ a) Antes de su inmersión en SBF y b) después de haber permanecido 14 días en baño de SBF.

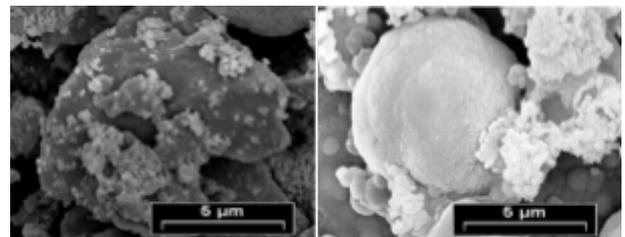


Figura 7. Micrografías SEM en alta magnificación de recubrimientos de chit-BG-TiO₂ a) Antes de su inmersión en SBF y b) después de 14 días en SBF.

4. Conclusiones

Este trabajo ha demostrado que se pueden producir recubrimientos uniformes de chitosan/Bioglass®/TiO₂ sobre acero inoxidable 316L utilizando deposición electroforética (EPD) como técnica de fabricación. Las mejores condiciones de deposición fueron obtenidas usando suspensiones con 20 g/l de Bioglass®, 15 g/l de TiO₂, 1,6 g/l de chitosan en un solvente compuesto por ácido acético 0,01 M aplicando 2 V cuando se emplea un tiempo de deposición de 540 segundos, y el pH de la suspensión se ha ajustado a 3,8

trabajando a 25° C. La morfología y densidad superficial de los recubrimientos de quitosan/Bioglass®/TiO₂ sobre acero demostraron ser reproducibles, y de esta forma la EPD, puede ser considerada una alternativa de bajo costo para producir películas compuestas sobre sustratos metálicos que pueden ser empleados en aplicaciones en ingeniería de tejidos. Se comprobó que adicionar nanopartículas de TiO₂ a los recubrimientos de quitosan/Bioglass® mejora las propiedades mecánicas de éstos. Sin embargo, los depósitos obtenidos deben ser sinterizados a fin de alcanzar propiedades mecánicas comparables a las del hueso cortical humano. A fin de estudiar si las películas compuestas obtenidas son bioactivas las muestras se limpiaron con agua destilada y se sumergieron en SBF por períodos de tiempo de 14 a 21 días. Al cabo de los primeros 14 días se observó el crecimiento de partículas semiesféricas sobre los depósitos que presumiblemente son de hidroxiapatita (HA).

5. Referencias

- AHMED, I., PARSONS, A. J., RUDD C. D., NAZHAT S. N., KNOWLES J. C. (2008). *Comparison of phosphate-based glasses in the range 50P2O5-(50-x) CaO-xNa2O prepared using different precursors.* Eur. J. Glass Sci. Technol. A, 49 (2), 63-72
- CORNI I., NEUMANN, N., NOVAK S., VERONESI P., CHEN Q., RYAN M., BOCCACCINI A.R. (2009). *Electrophoretic deposition of PEEK-nano alumina composite coatings on stainless steel.* Surface & Coatings Technology 203, 1349-1359
- DAIXIONG ZHANG, XUEMING LI, XIAOGANG GUO, CHUAN LAI. (2014). *Fabrication of cobalt oxide (Co₃O₄) coating by electrophoretic deposition.* Materials Letters 126: 211-213
- FATMA H. ELBATAL, MONA A. OUIS, HATEM A. ELBATAL A. (2016). *Comparative studies on the bioactivity of some borate glasses and glass-ceramics from the two systems: Na₂O-CaO-B₂O₃ and NaF-CaF₂-B₂O₃.* Ceramics International, Volume 42, Issue 7, 8247-8256
- GROVER L. M., KNOWLES J. C., FLEMING J. C. BARRALET J.E. (2003). *In vitro ageing of brushite calcium phosphate cement.* Biomaterials 24: 4133-4141.
- HENCH, LL., *Bioaeramics.* Journal of American Ceramics Society 81: 1705-1728.
- HUTMACHER, J.T., SCHANTZ CH., LAM X., TAN T., LIM CH. (2007). *State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from biomaterials perspective.* J. Tissue Eng. Regen. M., 1, 245-260.
- PISHBIN F., SIMCHI A., RYAN M. P., BOCCACCINI A. R. (2011). *Electrophoretic deposition of chitosan/45S5 bioglass® composite coatings for orthopaedic applications.* Surf. Coat. Technol. 205, 5260-5268.
- KOKUBO T. (1991). *Bioactive glass ceramics. Properties and applications.* Biomaterials 12: 155-163
- KRISHNAN V., LAKSHMI T. (2013). *Bioglass: A novel biocompatible innovation.* J Adv Pharm Technol Res. Apr-Jun; 4(2): 78-83.
- QINGQING YAO, WEI LI, SHANSHAN YU, LIWEI MA, DAYONG JIN, ALDO R. BOCCACCINI, YONG LIU. (2015). *Multifunctional chitosan/polyvinyl pyrrolidone/45S5 Bioglass® scaffolds for MC3T3-E1 cell stimulation and drug release.* Materials Science and Engineering: C, Volume 56, Pages 473-480
- TAKADAMA H., KOKUBO, T. *How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity.* Biomaterials 27: 2907-2915.
- ZHENG, YANYAN, CHENGDONG XIONG, LIFANG ZHANG. (2014). *Formation of bone-like apatite on plasma-carboxylated poly(etheretherketone) surface.* Materials Letters 126: 147-150