

Fabricación de recubrimientos compuestos de Bioglass[®]/poli(ϵ -caprolactona) obtenidos por co-deposición electroforética sobre acero inoxidable

Fabrication of Bioglass[®]/poly(ϵ -caprolactone) composite coatings obtained by co-electrophoretic deposition on stainless steel

Gisela Alejandra Ramona Quiroga¹, Franco Leonardo Redondo²,
Mario Daniel Ninago^{1,2}, Andrés Eduardo Ciolino^{2,3},
Marcelo Armando Villar^{2,3}, María José Santillán¹

¹ Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria (FCAI-CONICET), Departamento de Ingeniería Química, Universidad Nacional de Cuyo, CP: 5600, Bernardo de Irigoyen 375, San Rafael, Mendoza, Argentina.

² Planta Piloto de Ingeniería Química, PLAPIQUI (UNS-CONICET), CP: 8000, Camino "La Carrindanga" Km 7, Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina.

³ Departamento de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Sur, CP: 8000, Av. Alem 1253, Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina.

e-mail: agquiroga@fcai.uncu.edu.ar, mminago@plapiqui.edu.ar; flredondo@plapiqui.edu.ar; aciolino@plapiqui.edu.ar; mvillar@plapiqui.edu.ar; mjsanti@fcai.uncu.edu.ar

RESUMEN

En este trabajo se obtuvieron mediante co-deposición electroforética (co-EPD) dos clases de "recubrimientos blandos". En todos los casos se empleó como fase inorgánica un biovidrio y como fase orgánica poli(ϵ -caprolactona), PCL, comercial (PCL_C) o sintetizada aniónicamente y modificada con anhídrido maleico (PCL_S). Para asegurar un adecuado recubrimiento del sustrato metálico se optimizaron variables del proceso de deposición (diferencia de potencial y tiempo). Mediante técnicas de caracterización complementarias (FTIR, DSC) se corroboró la presencia de ambas fases en los recubrimientos estudiados. En los recubrimientos con PCL_C comercial se observó mediante SEM la formación de aglomerados de mayor tamaño en comparación a los recubrimientos con PCL aniónica (PCL_S), observándose en ambos casos un alto grado de recubrimiento del sustrato metálico y la ausencia de microfisuras. La bioactividad de los recubrimientos obtenidos se evaluó mediante ensayos de inmersión en fluido corporal simulado (SBF). Por difracción de rayos X se evidenció la formación de un precipitado de hidroxiapatita sobre la superficie de los recubrimientos y a través de microanálisis SEM-EDS se determinó que la hidroxiapatita presente en los recubrimientos con PCL_S funcionalizada presentó una relación calcio/fósforo Ca/P ~ 1,78; valor muy próximo al estequiométrico en tejidos óseos.

Palabras clave: biovidrio, poli(ϵ -caprolactona), deposición electroforética, estructura, bioactividad

ABSTRACT

In this work two kinds of "soft coatings" were obtained by co-electrophoretic deposition technique (co-EPD). In all cases a bioglass was used as inorganic phase, and a commercial poly(ϵ -caprolactone), (PCL_C), and an anionic synthesized PCL modified with maleic anhydride (PCL_S) were used as organic phase. To ensure an adequate coating over the metallic substrate, deposition process variables (such as electric voltage and time) were optimized. Metal coated samples were analyzed by complementary characterization techniques (FTIR, DSC) to confirm the presence of both phases on the composite coatings. From SEM analysis, larger agglomerates were observed for the coatings obtained using commercial PCL_C compared to those prepared from anionic modified PCL_S, with a high degree of coating of the metallic substrate and absence of microcracks. Finally, by immersion tests in simulated body-fluid (SBF), the bioactivity of the coatings was evaluated. X-ray diffraction tests demonstrated the formation of a hydroxyapatite (HA) precipitate on the surface coat-

ings, and by SEM-EDS microanalysis it was determined that HA present in PCL₅ coatings showed a Ca/P value ~ 1.78, which is close to stoichiometric values observed in bone tissues.

Keywords: bioglass, poly(ϵ -caprolactone), electrophoretic deposition, structural characterization, bioactivity.

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, la ingeniería de tejidos ha sido centro de atención de numerosas investigaciones, ya que proporciona un nuevo enfoque para el desarrollo de materiales capaces de contribuir a la reparación y regeneración de tejidos. Uno de los principales desafíos consiste en desarrollar materiales no tóxicos y con buena estabilidad mecánica al momento de su aplicación [1–4]. Entre los más estudiados se puede mencionar a los polímeros, cerámicos y biovidrios, fundamentalmente por su capacidad para ser reabsorbidos o degradados después de cierto tiempo de ser implantados, sin generar productos tóxicos en el organismo receptor [5–8]. Otro reto que presentan los materiales bioactivos se basa en determinar la relación que existe entre la velocidad de reabsorción vs la velocidad de sustitución por tejido nuevo sin comprometer sus propiedades estructurales, manteniendo tanto la resistencia como así también la estabilidad interfacial durante el período de incubación [9,10].

En el ámbito de la medicina se han estudiado diversos materiales inorgánicos tales como hidroxiapatita (HA), titanita o TiO₂-Ag nanoestructurado porque, además de ser bioactivos, presentan un potencial efecto bactericida fundamental para su uso en implantes [11,12]. También se evaluaron las propiedades de materiales vítreos a base de fosfatos, ya que presentan excelentes respuestas a nivel genético y morfológico dentro del proceso regenerativo y osteoconductor [13], como así también mayor degradabilidad y elevada resistencia a la corrosión y compresión. No obstante, su alta rigidez y menor resistencia a la fractura constituyen sus principales desventajas. Para superar estas deficiencias, una alternativa consiste en el uso de nanocompuestos de polímero-cerámica que otorguen una mayor flexibilidad al material final [14,15]. Aunque existen numerosos polímeros que tienen la capacidad de ser compatibles con el tejido humano y degradarse en el tiempo luego de ser implantados, la biodegradabilidad es una propiedad muy deseable ya que es necesario que los productos generados a partir de la metabolización no presenten toxicidad en el organismo vivo [6,7]. Es por ello que, junto a la modificación de sus propiedades mecánicas, la incorporación de moléculas específicas a la estructura química del polímero es uno de los aspectos más atractivos debido a que podrían proporcionar nuevas aplicaciones a los materiales compuestos [16,17].

El uso de polímeros en compuestos biodegradables permite la fabricación de materiales con geometrías específicas, que pueden ser usados en aplicaciones diversas tales como implantes en cirugía ortopédica, unión de ligamentos, suturas, tornillos, clavos para la fijación de fracturas, liberación de fármacos, tubos flexibles para cirugía cardiovascular y reparaciones dentales, entre otras [18,19]. En las últimas décadas han surgido diversas metodologías capaces de desarrollar nuevos materiales, como por ejemplo la técnica de deposición electroforética (EPD). EPD es un método frecuentemente empleado para la formación de recubrimientos, fundamentalmente debido a su simplicidad, bajo costo en equipamiento y facilidad de uso en sustratos con geometría complejas. Tradicionalmente, la EPD se usó en el desarrollo de recubrimientos cerámicos y vitrocerámicos sobre sustratos metálicos biocompatibles tales como, titanio y acero inoxidable entre otros, con el objetivo de evitar la liberación de iones metálicos producto de la corrosión de los sustratos. Además, con este tipo de metodología se consigue una unión fuerte entre el material a implantar y el tejido óseo [20, 22]. Sin embargo, el uso de materiales vítreos y cerámicos en recubrimientos generalmente implica un posterior tratamiento térmico para aumentar la adherencia del recubrimiento sobre el metal [23], lo que puede inducir cambios en la estructura cristalina final del recubrimiento reduciendo su capacidad bioactiva así como también generar microfisuras por diferencias entre los coeficientes de dilatación térmica del sustrato y el recubrimiento [24,25].

El biovidrio es uno de los principales materiales usados en EPD debido a que permite la formación de una capa de carbohidroxiapatita (HA) biológicamente activa, química y estructuralmente equivalente a la fase mineral del hueso luego de ser implantado en organismos vivos, lo que posibilita una fuerte unión interfacial entre el implante y el tejido [26]. Sin embargo, luego del sinterizado, su estructura cristalina se modifica reduciéndose la capacidad bioactiva resultante [27]. Por lo tanto, una alternativa que permite superar esta limitación consiste en desarrollar recubrimientos bioactivos que no necesiten tratamientos térmicos posteriores [8]. Así, la co-deposición electroforética (co-EPD) de mezclas de polímeros y vitrocerámicos es una alternativa viable para obtener recubrimientos que presenten una adecuada adherencia al sustrato metálico sin comprometer la bioactividad final del material [14,25].

Un polímero susceptible de ser empleado como componente orgánico en recubrimientos compuestos es la poli(ϵ -caprolactona), PCL, un poliéster hidrofóbico y biocompatible, cuya baja temperatura de fusión lo

convierte en un material versátil para el procesado tanto en fundido como en solución. Además, debido a su susceptibilidad a procesos de hidrólisis, puede generar productos capaces de ser metabolizados sin comprometer al organismo receptor [17]. Aunque en diversos trabajos se ha reportado el uso de PCL junto a silicatos bioactivos y nanopartículas de HA [2,3,8], su uso en la formulación de materiales compuestos a base de BG/PCL depositados sobre sustratos de acero inoxidable por aplicación de campo eléctrico, es un área de aplicación aún no explorada. Por otra parte, la PCL con estructura controlada puede obtenerse a partir de polimerización aniónica, técnica que permite obtener una amplia variedad de materiales con características específicas [28–30]. Por estas razones, el estudio de materiales basados en polímeros modificados estructuralmente o la combinación de diferentes polímeros con rellenos inorgánicos, se plantea como una alternativa poco explorada y promisoría que permitiría desarrollar materiales compuestos con propiedades híbridas cuyas características específicas los convertirían en potenciales candidatos para ser usados en medicina regenerativa [12,31,32]. Además, la topografía y las características fisicoquímicas del material son factores que pueden influenciar indirectamente (a través de la capa proteínica) y/o directamente en el comportamiento celular [5–7].

En este trabajo se realizaron recubrimientos biovidrio/PCL a través de la técnica de co-EPD. Se empleó PCL comercial (Sigma-Aldrich) y PCL sintetizada por vía aniónica y con posterior modificación química de su grupo funcional terminal. Como componente inorgánico se utilizó 45S5-Bioglass[®], el cual fue suministrado por el Dr. A.R. Boccaccini (Instituto de Biomateriales del Departamento de Ciencia e Ingeniería de Materiales de la Universidad de Erlangen-Nuremberg, Alemania). La masa molar y la distribución de masas molares de las PCL comercial y sintetizada aniónicamente se determinaron mediante cromatografía por exclusión de tamaños (SEC). Se optimizó el proceso de co-deposición analizando distintas tasas de deposición para diferentes tiempos y voltajes aplicados. La microestructura y propiedades térmicas de los recubrimientos fueron evaluadas a través de técnicas complementarias de caracterización tales como espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), calorimetría diferencial de barrido (DSC) y microscopía electrónica de barrido (SEM). Para determinar la efectividad del proceso de modificación química de la PCL aniónica, se estudió la respuesta bioactiva de los recubrimientos mediante ensayos *in-vitro* de inmersión en fluido corporal simulado (SBF). A través de difracción de rayos X (XRD) y microscopía electrónica de barrido con microanálisis (SEM-EDS) se evidenció la formación de una capa de HA bioactiva sobre los recubrimientos luego de 14 días de inmersión, alcanzándose relaciones calcio/fósforo Ca/P ~1,78 similares a las encontradas en tejidos duros [33,34].

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

Se utilizó Bioglass[®] suministrado por el Dr. A.R. Boccaccini (Instituto de Biomateriales del Departamento de Ciencia e Ingeniería de Materiales de la Universidad de Erlangen-Nuremberg, Alemania) de composición 45 SiO₂-24,5 Na₂O-24,5 CaO-6 P₂O₅ (wt%) (BG), con tamaño de partícula promedio de ~ 5 μm. Como fase orgánica se empleó una poli(ε-caprolactona) (PCL) comercial (Sigma-Aldrich), y una PCL sintetizada en el laboratorio empleando polimerización aniónica. Para realizar la apertura del anillo del monómero de ε-caprolactona (ε-CL) se utilizó como iniciador de reacción 1,1 difenil-hexil litio, preparado por reacción entre *n*-BuLi⁺ (Sigma-Aldrich) y 1,1'-difenetileno (DFE) (Sigma-Aldrich). La polimerización se llevó a cabo en alto vacío, utilizando benceno (Dorwill) como solvente. Luego de 15 minutos de reacción a temperatura ambiente, la polimerización se finalizó por agregado de ácido acético glacial (Cicarelli). El polímero obtenido se precipitó en metanol frío (Química Industrial) [29]. La funcionalización del extremo terminal de la PCL sintetizada se realizó en solución por reacción con anhídrido maleico, (AM), (Sigma-Aldrich), en presencia de piridina (Sigma-Aldrich) como catalizador. El polímero modificado se lavó con agua destilada y acetona para eliminar el exceso de AM sin reaccionar, y se secó en estufa de vacío, a 30°C, hasta peso constante. Se denominó PCL_C al polímero comercial y PCL_S al poliéster sintetizado con posterior funcionalización química.

2.2 Preparación de la suspensión y co-deposición electroforética de los recubrimientos

Se preparó una suspensión de biovidrio/polímero, con una relación BG/PCL = 2,5 en una mezcla de agua/acetona al 10 % (v/v). Para lograr estabilizar la suspensión, se agitó magnética y ultrasónicamente de manera sucesiva durante 30 min. Como electrodo de trabajo se colocó el sustrato a recubrir de acero inoxidable (AISI 316L) con geometría rectangular (20×7×0,5 mm). Antes de realizar la co-EPD, el sustrato metálico fue lavado en un equipo ultrasónico con etanol durante 20 min y enjuagado con agua destilada.

Los ensayos de co-EPD se llevaron a cabo conectando la celda electroforética a una fuente regulable (AT-TEN modelo TPR3020S, 220 V/50 Hz). Se optimizaron diferentes condiciones de deposición empleando distintos voltajes (5, 12, 20 y 30 V) y diferentes tiempos de deposición (1, 4 y 6 min.), a fin de determinar las mejores condiciones de trabajo. La separación entre los electrodos (sustrato y contra electrodo) fue mantenida constante en 1 cm y el área depositada fue $\sim 1 \text{ cm}^2$. Finalmente, las muestras obtenidas se secaron en un desecador, hasta peso constante, y la tasa de deposición obtenida en cada una de las condiciones ensayadas se determinó por técnicas gravimétricas.

2.3 Ensayos de bioactividad en fluido corporal simulado (SBF)

Para evaluar el grado de bioactividad de los recubrimientos fabricados se realizaron ensayos de inmersión en fluido corporal simulado (SBF), durante 14 días, siguiendo el protocolo de KOKUBO *et al.* [35]. Para ello, se preparó una solución con NaCl, NaHCO₃, KCl, K₂HPO₄·3H₂O, MgCl₂·6H₂O, CaCl₂, NaSO₄, y NH₂C(CH₂OH)₃ en agua bidestilada, a 37 °C, manteniendo el pH de la solución entre 7,3 - 7,4. Se determinó el volumen de SBF necesario a partir de la ecuación (1) [36], renovándose la solución cada 3 días.

$$V_s = \frac{S_d}{10} \quad (1)$$

donde V_s es el volumen de solución de SBF empleada en cada muestra y S_d , es el área de recubrimiento depositada sobre el sustrato.

2.4 Caracterización de los recubrimientos compuestos

Cromatografía por exclusión de tamaño (SEC): La masa molar promedio en número (M_n) y el índice de polidispersión (M_w/M_n) de la PCL sintetizada aniónicamente fueron determinados mediante SEC, empleando un sistema constituido por una bomba Waters 515 HPLC y un refractómetro diferencial Waters modelo 410, equipado con tres columnas y una pre-columna PLGel. Se empleó cloroformo como solvente, a temperatura ambiente, con un caudal de 1 mL·min⁻¹. Las constantes de Mark-Houwink empleadas fueron $K_{PCL} = 0,1298 \text{ mL g}^{-1}$ y $\alpha = 0,828$ [37,38].

Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR): La presencia de partículas de bioglass y PCL en los recubrimientos se determinó mediante FTIR. Para ello se realizó el raspado del recubrimiento y con el material obtenido se prepararon pastillas de KBr al 1 % (p/p), mediante el uso de una prensa hidráulica con sistema de vacío ($\sim 700 \text{ kPa}$, 5 min). Los espectros FTIR se registraron en un espectrómetro Nicolet 520 FT-IR en el rango 400 - 4000 cm⁻¹, bajo flujo constante de nitrógeno.

Calorimetría diferencial de barrido (DSC): Las transiciones de fase de los recubrimientos obtenidos se estudiaron por calorimetría diferencial de barrido (DSC), en un calorímetro Perkin-Elmer[®] Pyris 1. Todos los ensayos térmicos se realizaron bajo atmósfera de nitrógeno, desde 30 a 90°C, a una velocidad de calentamiento de 10°C/min, reportándose los datos correspondientes al segundo ciclo de calentamiento con el propósito de eliminar la historia térmica del material. A partir de los termogramas obtenidos se determinó la temperatura de fusión (T_f) y la variación de entalpía (ΔH_f) necesaria para calcular el porcentaje de cristalización X_c % de cada muestra [38,39].

Microscopia electrónica de barrido (SEM-EDS): La morfología y las características estructurales de los recubrimientos se analizaron mediante SEM empleando un microscopio electrónico JEOL JSM-6490LV, acoplado a un detector de rayos X de energía dispersiva (EDS). Para realizar este estudio, las muestras fueron recubiertas con una fina capa de oro y carbono. A partir del análisis de estos resultados fue posible la visualización de la superficie del sustrato metálico y de los recubrimientos antes y después de ser sometidos a ensayos de bioactividad, obteniéndose la relación Ca/P para cada caso.

Difracción de rayos X (XRD): La identificación de la estructura cristalina de cada componente y la presencia de HA en los recubrimientos luego de ser sometidos a ensayos de bioactividad se determinaron por XRD. Los difractogramas se obtuvieron empleando un difractómetro Philips PW1710, provisto de un tubo y ánodo de cobre con monocromador curvo de grafito operado a 45 KV, 30 mA y 2 θ variando desde 2 hasta 60°.

Determinación de la tasa de deposición (T_d): La tasa de deposición se calculó mediante técnicas gravimétricas entre el sustrato y el sustrato con recubrimiento (Δ_m) dividido por el área efectiva de deposición (S_d), siguiendo la ecuación 2.

$$T_d = \frac{\Delta_m}{S_d} \quad (2)$$

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Optimización del proceso de co-EPD

A partir de las suspensiones estudiadas se determinaron las condiciones óptimas de deposición aplicando diferentes voltajes en el rango de 5 a 30 V, para tres tiempos diferentes (Figura 1). Los resultados obtenidos para los recubrimientos BG/PCL_C y BG/PCL_S, mostraron que la T_d se incrementó con el aumento del voltaje aplicado para todos los tiempos ensayados. En la Figura 1a se observan los resultados obtenidos para los recubrimientos BG/PCL_C. Puede verse que, para valores menores a 12 V, la cantidad de material depositado (T_d) sobre el sustrato metálico fue similar para los tres tiempos ensayados. Sin embargo, para voltajes mayores (20 y 30 V) y un tiempo de deposición de 6 min, se observó un incremento de 2,6 y 1,8 veces en los valores de T_d , comparados con los obtenidos para 1 min de deposición. Por otro lado, en la Figura 1b se muestran los resultados obtenidos para los recubrimientos BG/PCL_S, en los que se empleó la PCL funcionalizada. Para 5 y 12 V la tasa de deposición obtenida no varió significativamente para 4 y 6 min de ensayo. Sin embargo, para 6 min de deposición y voltajes de 20 y 30 V, se evidenció un incremento de 5,7 y 4,9 veces en la T_d , con respecto a los valores obtenidos para 1 min de ensayo. A partir de estos resultados, se decidió emplear 20 V y 6 min de ensayo como condiciones de trabajo, debido a que en estas condiciones se obtuvieron los mayores valores de T_d .

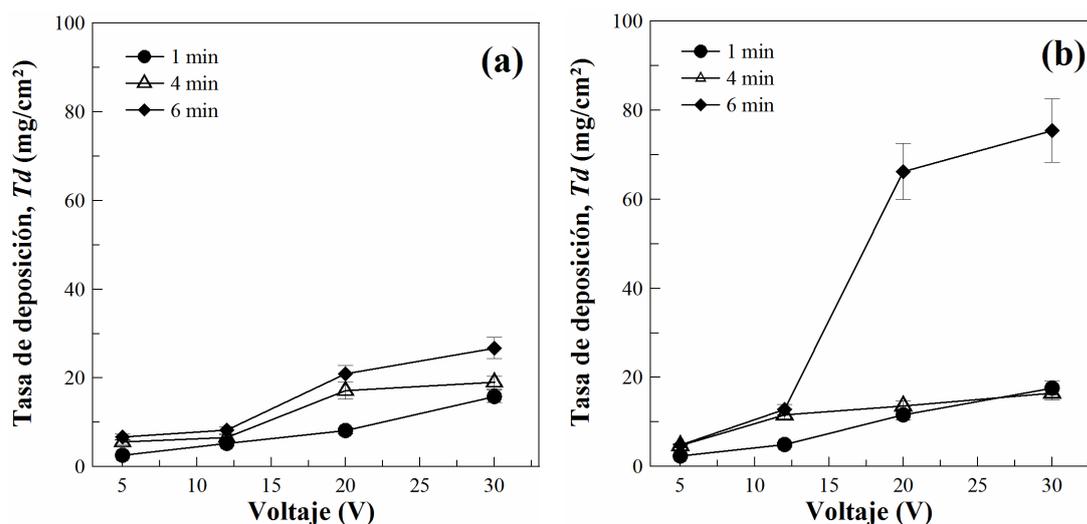


Figura 1: Tasa de deposición (T_d) versus voltaje aplicado (V), a diferentes tiempos de deposición, para los recubrimientos obtenidos con Bioglass y PCL comercial (a); y Bioglass y PCL sintética (b).

3.2 Caracterización de los recubrimientos obtenidos

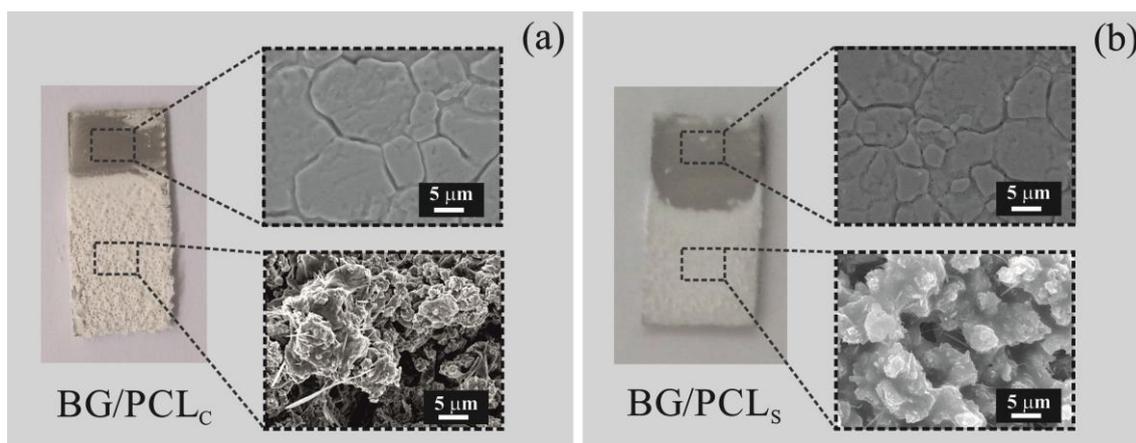
Las características moleculares de las PCL empleadas se muestran en la Tabla 1. Con el fin de evaluar la influencia que producen las partículas de biovidrio durante el proceso de cristalización de la PCL_C y PCL_S, se evaluó el comportamiento térmico empleando DSC en ambos recubrimientos. Como se esperaba, ambos materiales (PCL_C y PCL_S) mostraron una temperatura de fusión de $\sim 56,6^\circ\text{C}$, esperada para PCL lineales [28,30,40]. También se observó una reducción significativa de la cristalinidad de la PCL en cada recubrimiento (X_C), con valores de $\sim 6,7\%$ para BG/PCL_C y $\sim 6,3\%$ para BG/PCL_S, respectivamente. Estos resultados son similares a los reportados por CHEN *et al.* [23] durante el estudio de materiales compuestos a base de PCL con partículas bioactivas. Estos autores reportaron que la incorporación de partículas de $\sim 5\ \mu\text{m}$ de tamaño podrían entorpecer el ordenamiento de las cadenas de la PCL durante el proceso de cristalización, disminuyendo los valores de X_C del material resultante.

Tabla 1: Caracterización química y térmica de los recubrimientos estudiados.

MUESTRA	M_n (g mol ⁻¹) ^(a)	M_w/M_n ^(a)	T_f (°C) ^(b)	X_c (%) ^(b)
PCL _C	45.500	1,8	60,4 ± 1,2	55,2 ± 0,6
PCL _S	26.800	1,6	56,2 ± 0,8	45,4 ± 1,2
BG/PCL _C	N/C	N/C	55,6 ± 1,1	6,7 ± 0,4
BG/PCL _S	N/C	N/C	55,5 ± 0,9	6,3 ± 0,5

^(a) Masa molar e índice de polidispersión determinados por SEC. ^(b) Temperatura de fusión y porcentaje de cristalinidad determinados por DSC, considerando $\Delta H_{PCL100\%}=136,1 \text{ J g}^{-1}$ [24].

En la Figura 2, se muestran las macrografías y micrografías SEM de los sustratos metálicos y de los recubrimientos obtenidos por co-EPD. Como puede observarse, ambos recubrimientos mostraron un aspecto homogéneo y la ausencia de fisuras, confirmando la efectividad del proceso. En relación a las micrografías SEM, el sustrato metálico (ampliación de la región superior de las macrografías, Figura 2a y b), mostró una morfología y aspecto típico asociado a materiales metálicos [41]. Con respecto al recubrimiento obtenido con PCL_C (Figura 2a), se observó una superficie con un elevado grado de recubrimiento; una buena dispersión de las partículas de biovidrio en la matriz de PCL; y la formación de agregados de mayor tamaño. Por otra parte, en los recubrimientos obtenidos con PCL_S (Figura 2b), se evidenció la formación de aglomerados de menor tamaño que condujeron al desarrollo de un recubrimiento más compacto (Figura 2b). En este sentido, ZHITOMIRSKY *et al.* (2009) [42] reportaron resultados similares durante el estudio de compuestos biovidrio/polímero obtenidos por co-EPD.


Figura 2: Fotografía y micrografías SEM a (3000x) del sustrato metálico AISI316 y los recubrimientos obtenidos con (a) PCL comercial (BG/PCL_C) y (b) PCL sintetizada aniómicamente (BG/PCL_S).

El análisis por FTIR permitió corroborar la presencia de bandas de absorción características asociadas a grupos funcionales presentes en las PCL estudiadas y en el biovidrio (Figura 3). Para la PCL comercial se puede observar a 2960 cm⁻¹ y 2865 cm⁻¹ bandas de absorción de los enlaces C-H. En 1724 cm⁻¹ se observa la presencia de una banda fuerte y aguda debida a las vibraciones de estiramiento del grupo carbonilo (>C=O) y en 732cm⁻¹ una pequeña banda atribuida a la vibración de flexión de los grupos -(CH₂)_n con n > 4 [28,37]. Además, en el espectro FTIR de PCL_S se observa un incremento en la banda de absorción a 3430 cm⁻¹ asociada al grupo OH presente en ácidos no asociados, corroborando la eficiencia del proceso de modificación química. En el caso del biovidrio, se observaron señales a 1043 cm⁻¹ y 924 cm⁻¹ correspondientes a una banda asimétrica y estrecha asociada a los enlaces Si-O-Si, que son sus señales más característica [5,24].

A través de ensayos de bioactividad por impregnación en fluido corporal simulado (SBF), se evaluó la capacidad de mineralización de una capa de HA bioactiva sobre la superficie de los recubrimientos compuestos. En la Figura 4 se muestran los espectros de difracción de rayos X correspondientes a la PCL y al vidrio bioactivo utilizados en los recubrimientos. Además, se incluyen los patrones de difracción de los recubrimientos luego del periodo de inmersión en SFB.

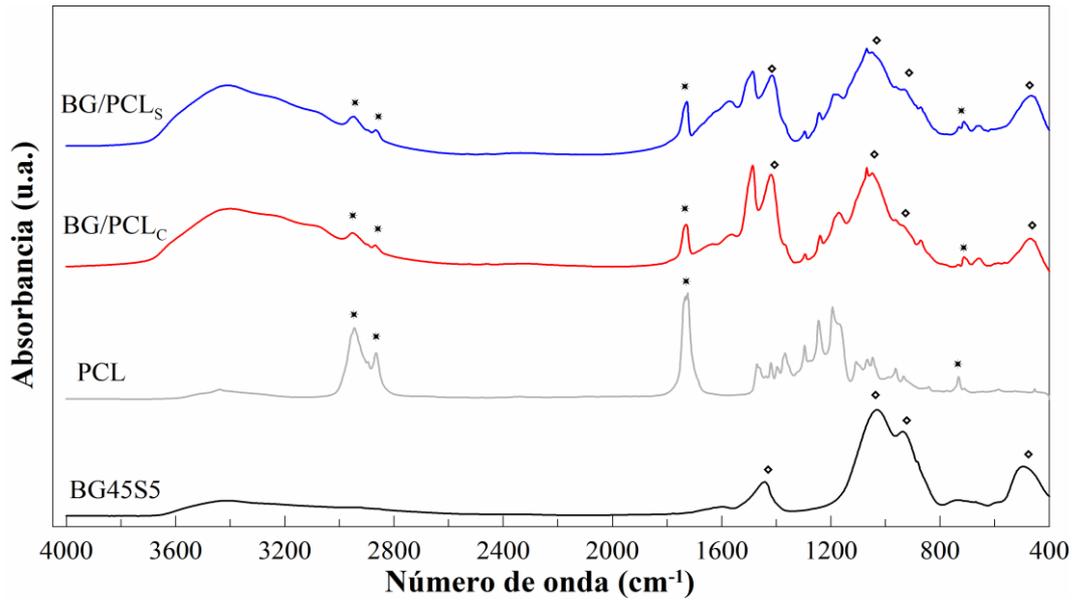


Figura 3: Espectro FTIR de PCL (sintetizada aniómicamente), biovidrio (BG45S5) y los recubrimientos obtenidos con PCL comercial (BG/PCL_C) y PCL sintetizada aniómicamente (BG/PCL_S).

Para el BG se observó una única señal a $2\theta \sim 32^\circ$, la cual está asociada a vidrios bioactivos amorfos [43]. En el caso de poliésteres lineales, se visualizan dos picos agudos y fuertes a ángulos $2\theta \sim 21^\circ$ y $\sim 24^\circ$ que son típicas de PCL [29]. Por otra parte, los recubrimientos obtenidos por EPD luego de ser sometidos durante 14 días a ensayos de bioactividad en SBF, revelaron la presencia de picos de difracción asociados a una fase de HA. Como se observa en la Figura 4, aparece una señal aguda e intensa asociada a la HA presente en el recubrimiento para un valor de $2\theta \sim 31,8^\circ$. Aunque esta reflexión podría estar solapada con la correspondientes al BG a $2\theta \sim 32^\circ$, la reflexión detectada resultó más intensa y estrecha para ambos recubrimientos. Además, se detectaron otros planos de difracción característicos de la HA, – (200), (211), (221) y (203) – lo que confirma la efectividad del proceso de mineralización que presentan los recubrimientos obtenidos a través de co-EPD [32,44].

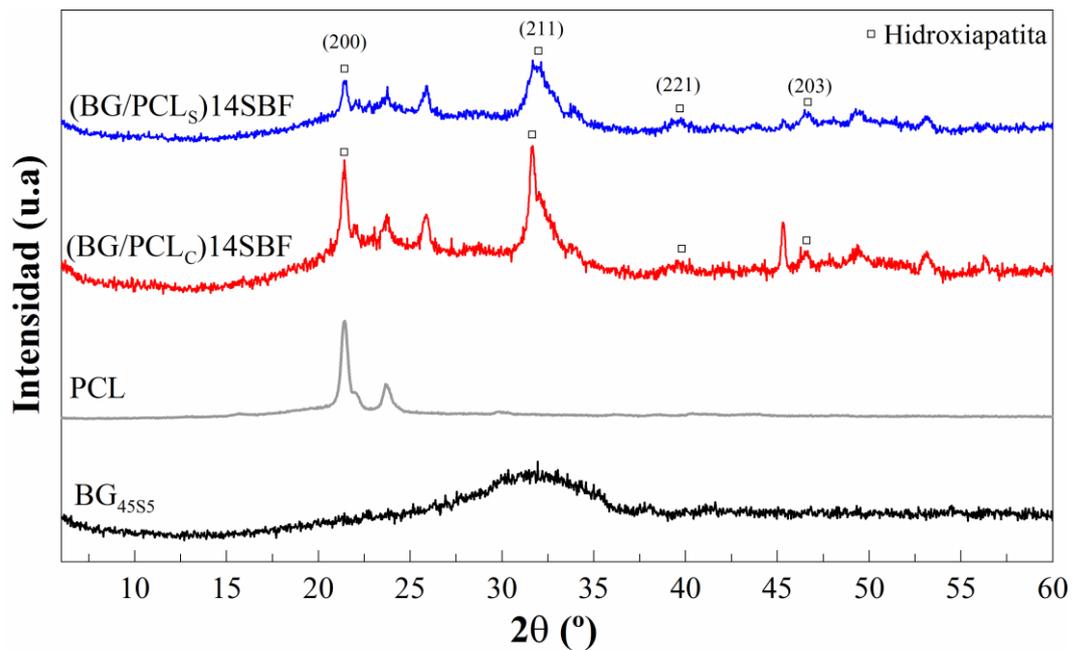


Figura 4: Espectros de difracción de rayos X para Biovidrio (BG45S5), PCL sintetizada aniómicamente, y los recubrimientos obtenidos con PCL comercial y sintetizada aniómicamente luego de los ensayos de bioactividad durante 14 días (BG/PCL_C)14SBF y (BG/PCL_S)14SBF.

La presencia en el difractograma de las distintas reflexiones que identifican a la HA permite confirmar que los recubrimientos de BG/PCL son favorables para la nucleación y deposición de HA; es decir, que los revestimientos son bioactivos.

En la Figura 5 se observan las imágenes SEM de los recubrimientos luego de 14 días de inmersión en solución de SBF a 37°C. En ambos materiales, las partículas de biovidrio se disolvieron gradualmente hasta formar una capa de precipitado denso y continuo que cubrió completamente los recubrimientos de BG/PCL. Los depósitos de HA se evidenciaron a través del desarrollo de una morfología de apariencia similar a la de una coliflor, la cual está caracterizada por presentar formas irregulares y micro-granulares (Figura 5a). En tal sentido, ROOHANI-ESFAHANI *et al.* [45] reportaron similares aspectos superficiales en recubrimientos compuestos a base de biovidrios activos luego de ser sometidos a ensayos de bioactividad. La ampliación de la micrografía en la Figura 5a, muestra capas de HA que exhiben una estructura de grano fino con poros de tamaño nanométrico, siendo estos resultados equivalentes a los reportados por HUANG *et al.* [46] durante el estudio de la conversión de partículas de biovidrio en HA luego de ser sometidos a ensayos de bioactividad en solución de SBF. En este contexto, CORRAL NUÑEZ *et al.* 2016 [46], reportaron la formación de aglomerados semejantes a estructuras con morfología similar a la del coliflor que fueron obtenidos luego de que las partículas de biovidrio se sometieran a ensayos de bioactividad en SBF, presentando valores de relación calcio/fósforo muy cercanos a la estructura estequiométrica de HA. Además, ROGINA *et al.* 2017 [47], también informaron la formación de aglomerados con formas similares, las cuales estaban compuestas por cristales de HA en forma de placas nanométricas distribuidas homogéneamente en toda la estructura. Estos resultados están en concordancia con los reportados por VICHERY *et al.* 2016 [48], el cual reportó que un vidrio bioactivo, se disuelve gradualmente liberando iones que promueven el crecimiento de una capa de hidroxiapatita carbonatada en su superficie. Así, los cationes sodio y calcio superficiales, se intercambian inicialmente con los H⁺ presentes en el fluido biológico creando enlaces Si-OH, los cuales forman más enlaces Si-OH generando un aumentando en el pH del medio, y empobreciendo en cationes sodio y calcio el medio, induciendo la formación de una capa de fosfato cálcico amorfo, que luego se cristaliza en HA gracias a la incorporación de hidróxido y iones carbonato presentes en el fluido biológico [49]. Por otra parte, LATIFI *et al.* 2017 [50], reportaron que la biomineralización de apatita en solución fisiológica, al igual que los vidrios bioactivos, podría estar asociada a cambios en los grupos de silanol presentes en la superficie del recubrimiento, los cuales se convierten en grupos funcionales (Si-O) que generan una cargada negativa global en la superficie, la cual atrae a los iones de calcio presentes en la solución fisiológica induciendo la precipitación de los mismos sobre el recubrimiento.

En el caso particular de los recubrimientos obtenidos con PCL_s (Figura 5b), se observó una morfología de tipo diente de león (región ampliada), que podría estar atribuida a una fase policristalina de HA. En este aspecto, SADAT-SHOJAI *et al.* [51] reportaron el estudio de diversas morfologías de HA, entre las que encontraron nanoestructuras orientadas radialmente a partir de un núcleo central, presentando una morfología de tipo diente de león. Los autores demostraron que este tipo de estructura presenta una marcada dependencia con el pH de la solución, siendo favorecida a valores de pH más elevados. Por otra parte, MILOVAC *et al.* [34] reportaron que este tipo de morfología mejora la rugosidad de la superficie y el área de superficie disponible, proporcionando una unión más eficiente entre el recubrimiento de PCL y los cristales de HA.

Por otra parte, a través de microscopía electrónica de barrido con microanálisis de rayos X se evidenció la presencia de calcio (Ca), fósforo (P), magnesio (Mg) y cloro (Cl) en los recubrimientos estudiados. En las Figuras 5a y 5b, se observan dos imágenes (región derecha) correspondientes al microanálisis de las superficies de los recubrimientos donde se presentan en color rosa a los iones P y en verde a los iones Ca. A partir del microanálisis EDS se pudo determinar la composición de cada uno de los elementos presentes en el recubrimiento. Se determinó la relación Ca/P para cada material. Para BG/PCL_C se obtuvo una relación Ca/P ~ 2,15, la cual es mayor a la encontrada en tejidos biológicos duros (huesos). En este aspecto, HUANG *et al.* [52] reportaron relaciones Ca/P con valores mayores a 2, junto a la observación de pequeñas cantidades de Mg, Cl y Si presentes en los recubrimientos, que podrían ser indicadores de una conversión incompleta de las partículas de vidrios bioactivos en HA [35]. Por otra parte, los resultados EDS de los recubrimientos con PCL_s (BG/PCL_S) presentaron un valor de Ca/P ~1,78 y la ausencia de señales de silicio en la superficie del recubrimiento. Aparentemente, el proceso de modificación química beneficia la deposición de HA, ya que PCL_s parece actuar como puntos de nucleación que favorecen el proceso de conversión de las partículas de biovidrio en una fase bioactiva de HA. Eso podría explicar los valores de Ca/P obtenidos, que son mucho más cercanos al valor estequiométrico reportado en hueso (Ca/P ~1,67) [23,33]. Asimismo, los resultados obtenidos por EDS resultaron equivalentes a los observados por XRD. En este sentido, el poliéster funcionalizado (PCL_S) ayudaría a acelerar los procesos de osteointegración, mejorando la capacidad bioactiva de los sistemas que actualmente son utilizados para la fabricación de estos tipos de recubrimientos.

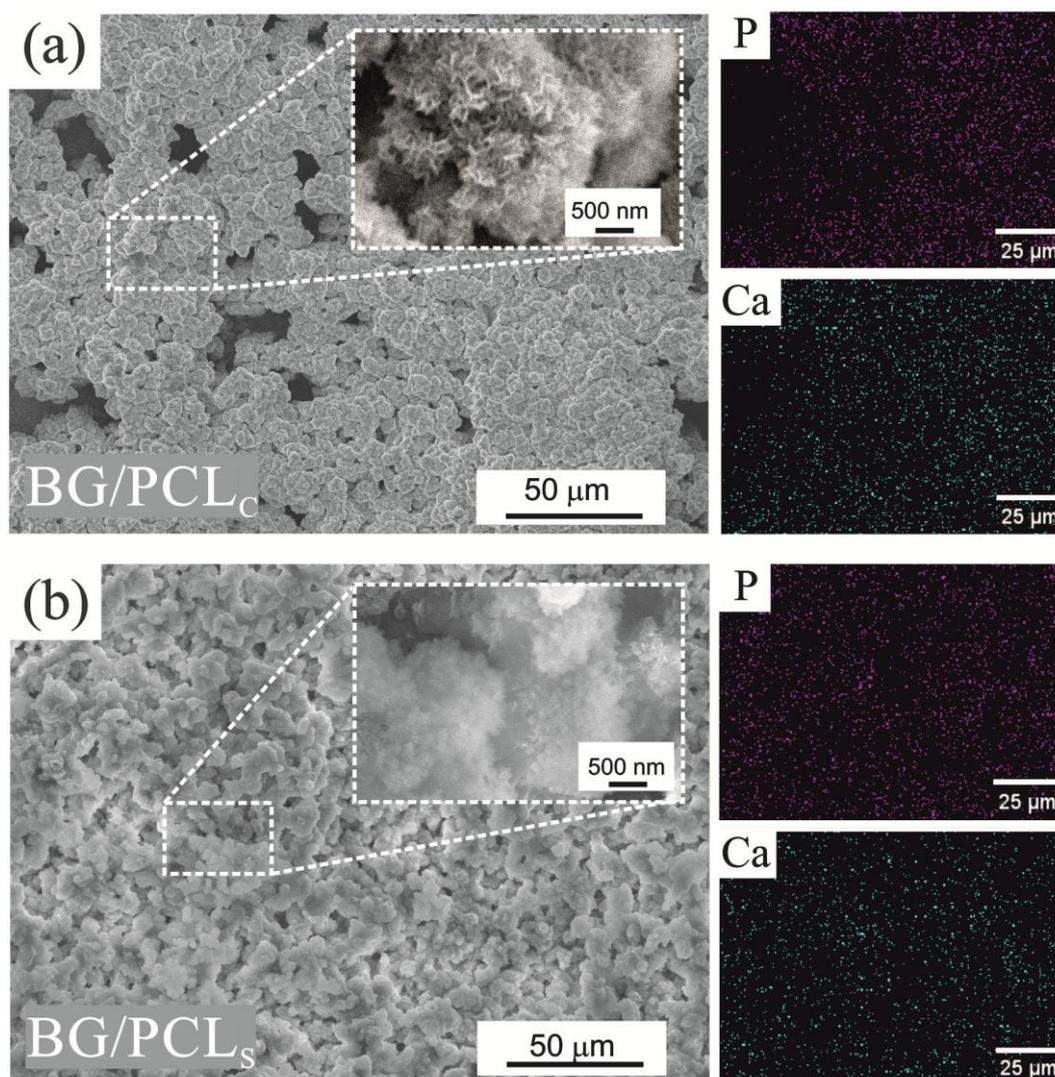


Figura 5: Micrográficas y microanálisis de rayos X (SEM –EDS) a (500×) de los recubrimientos obtenidos con (a) PCL_C (BG/PCL_C) y (b) PCL_S (BG/PCL_S). (Zona ampliada 15000×)

4. CONCLUSIONES

Se obtuvieron recubrimientos compuestos de biovidrio/PCL, mediante la técnica de co-deposición electrofórica, empleando como componente inorgánico, 45S5-Bioglass[®] y como componentes orgánicos, PCL comercial y una PCL sintética funcionalizada con anhídrido maleico. Mediante técnicas complementarias de caracterización (FTIR y SEM) se determinó la presencia de ambos componentes en los recubrimientos. El uso de técnicas gravimétricas permitió determinar la cantidad de material depositado, observándose valores mayores de *Td* para PCL_S y recubrimientos con una estructura más compacta. Mediante ensayos in vitro de bioactividad se pudo corroborar el desarrollo de estructuras cristalinas asociadas a fases minerales de HA. En este sentido, los recubrimientos obtenidos con el poliéster funcionalizado (BG/PCL_S) presentaron un mayor grado de osteointegración, el cual fue evidenciado por la ausencia de señales de silicio en la superficie del recubrimiento, así como también a través del análisis de la relación calcio/fósforo, el cual presentó valores muy cercanos a los encontrados en tejidos duros. Por lo tanto, la funcionalización química de las cadenas de PCL, representan una alternativa que ayudaría a mejorar la capacidad bioactiva de los sistemas que actualmente son utilizados para la fabricación de recubrimientos compuestos. Así, los efectos sinérgicos proporcionados por las propiedades osteocondicionantes de Bioglass[®] y la capacidad de procesamiento a temperatura ambiente de los recubrimientos a base de PCL_S funcionalizadas, ofrecen oportunidades prometedoras para el desarrollo de recubrimientos bioactivos capaces de ser utilizados en implantes, así como también, extender su aplicación en andamios porosos para regeneración de tejido óseo.

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria (FCAI-UNCUYO, Argentina, PIP80020160200439/L018), al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET, Argentina, PIP 0428) y a la Universidad Nacional del Sur (UNS, Argentina, PGI 24/M135) por el apoyo financiero que hizo posible la realización de este trabajo.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] LEE S.H., SHIN H. “Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering”, *Adv. Drug Deliv. Rev.* v 59, pp 339–359, 2007.
- [2] MAVIS B., DEMIRTAS T.T., GÜMÜŞDERELIOĞLU M., *et al.*, “Synthesis, characterization and osteoblastic activity of polycaprolactone nanofibers coated with biomimetic calcium phosphate”, *Acta Biomater.* v 5, pp 3098–3111, 2009.
- [3] YEONG, W.Y., SUDARMADJI, N., YU, H.Y., *et al.*, “Porous polycaprolactone scaffold for cardiac tissue engineering fabricated by selective laser sintering”, *Acta Biomater.* v. 6, pp 2028–2034, 2010.
- [4] CLAVIJO S., MEMBRIVES F., QUIROGA G., *et al.*, “Electrophoretic deposition of chitosan/bioglass® and chitosan/bioglass®/TiO₂ composite coatings for bioimplants”, *Ceram. Int.* v 42, pp 14206–14213, 2016.
- [5] FILHO O.P., LATORRE G.P., HENCH L.L., “Effect of crystallization on apatite-layer formation of bioactive glass 45S5”, *J. Biomed. Mater. Res.*, v 30, pp 509–514, 1996.
- [6] MOTA, C., PUPPI, D., DINUCCI, D., *et al.*, “Dual-scale polymeric constructs as scaffolds for tissue engineering”, *Materials (basel).* v 4, pp 527–542, 2011.
- [7] PUPPI, D., CHIELLINI, F., PIRAS, A.M., *et al.*, “Polymeric materials for bone and cartilage repair”, *Prog. Polym. Sci.* v 35, pp 403–440, 2010.
- [8] YANG, Y., MICHALCZYK, C., SINGER, F., *et al.*, “In vitro study of polycaprolactone/bioactive glass composite coatings on corrosion and bioactivity of pure mg”, *Appl. Surf. Sci.* v 355, pp 832–841, 2015.
- [9] ROETHER, J.A., BOCCACCINI, A.R., HENCH, L.L., *et al.*, “Development and in vitro characterisation of novel bioresorbable and bioactive composite materials based on polylactide foams and Bioglass® for tissue engineering applications”, *Biomaterials.*, v 23, pp 3871–3878, 2002.
- [10] CHEN Q., CORDERO-ARIAS L., ROETHER J.A., *et al.*, “Alginate/Bioglass® composite coatings on stainless steel deposited by direct current and alternating current electrophoretic deposition”, *Surf. Coatings Technol.* v 233, pp 49–56, 2013.
- [11] HAIDER, A., GUPTA, K.C., KANG, I.-K. “Morphological effects of HA on the cell compatibility of electrospun HA/PLGA composite nanofiber scaffolds”, *Biomed Res. Int.*, v.2014, 2014.
- [12] SANTILLÁN, M.J., QUARANTA, N.E., BOCCACCINI, A.R., “Titania and titania–silver nanocomposite coatings grown by electrophoretic deposition from aqueous suspensions”, *Surf. Coatings Technol.* v 205, pp. 2562–2571, 2010.
- [13] HENCH, L.L., XYNOS, I.D., POLAK, J.M. “Bioactive glasses for in situ tissue regeneration”, *Journal Of Biomaterials Science*, v 15, n. 4, pp 543-562, 2004
- [14] BOCCACCINI, A.R., KEIM, S., MA R., *et al.*, “Electrophoretic deposition of biomaterials”, *J. R. Soc. Interface.* v 7, n. 5, pp S581–S613, 2010.
- [15] CORDERO-ARIAS L., CABANAS-POLO S., GOUDOURI O.M., *et al.*, “Electrophoretic deposition of ZnO/alginate and ZnO-bioactive glass/alginate composite coatings for antimicrobial applications”, *Mater. Sci. Eng. C.* v 55, pp 137–144, 2015.
- [16] NASEF, M.M., NALLAPPAN, M., UJANG, Z., “Polymer-based chelating adsorbents for the selective removal of boron from water and wastewater: A review”, *React. Funct. Polym.* v 85, pp 54–68, 2015.
- [17] YAZDIMAMAGHANI, M., RAZAVI, M., VASHAEE, D., *et al.*, “Significant degradability enhancement in multilayer coating of polycaprolactone-bioactive glass/gelatin-bioactive glass on magnesium scaffold for tissue engineering applications”, *Appl. Surf. Sci.* v 338, pp 137–145, 2015.
- [18] ZHAO J., GUO L.Y., YANG X.B., WENG J., “Preparation of bioactive porous HA/PCL composite

scaffolds”, *Appl. Surf. Sci.* v 255, pp 2942–2946, 2008.

[19] GHASEMI-MOBARAKEH, L., PRABHAKARAN, M.P, MORSHED, M., *et al.*, “Bio-functionalized PCL nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering”, *Mater. Sci. Eng. C.* v 30, pp 1129–1136, 2010.

[20] JONES J.R., “Review of bioactive glass: from Hench to hybrids”, *Acta Biomater.* v 9, pp 4457–86, 2013.

[21] XYNOS, I.D., EDGAR, A.J., BUTTERY, L.D.K., *et al.*, “Ionic products of bioactive glass dissolution increase proliferation of human osteoblasts and induce insulin-like growth factor II mRNA expression and protein synthesis”, *Biochem. Bioph. Res. Co.* v 276, pp 461-465, 2000.

[22] CAO, W., HENCH, L. L. “Bioactive materials”, *Ceram. Int.* v 22, pp 493–507, 1996.

[23] CHEN, Q., CABANAS-POLO, S., GOUDOURI, O.M., *et al.*, “Electrophoretic co-deposition of polyvinyl alcohol (PVA) reinforced alginate-Bioglass® composite coating on stainless steel: Mechanical properties and in-vitro bioactivity assessment”, *Mater. Sci. Eng. C.* v 40, pp 55–64, 2014.

[24] QIAN J., KANG Y., WEI Z., ZHANG W., “Fabrication and characterization of biomorphic 45S5 bioglass scaffold from sugarcane”, *Mater. Sci. Eng. C.* v 29, pp 1361–1364, 2009.

[25] ZHANG, Z., JIANG, T., MA, K., *et al.*, “Low temperature electrophoretic deposition of porous chitosan-silk fibroin composite coating for titanium biofunctionalization”, *J. Mater. Chem.* v 21, pp 7705 -7713, 2011.

[26] PISHBIN, F., MOURIÑO, V., GILCHRIST, J.B., *et al.*, “Single-step electrochemical deposition of antimicrobial orthopaedic coatings based on a bioactive glass/chitosan/nano-silver composite system”, *Acta Biomaterialia.* v 9, n. 7, pp 7469–7479, 2013.

[27] CORMACK, A.N., TILOCCA, A., “Structure and biological activity of glasses and ceramics”, *Phil. Trans. R. Soc. A.* v 370, pp 1271–1280, 2012.

[28] NINAGO M.D., SATTI A.J., CIOLINO A.E., *et al.*, “Influence of amorphous block on the thermal behavior of well-defined block copolymers based on ϵ -caprolactone”, *J. Therm. Anal. Calorim.* v 112, pp 1277–1287, 2013.

[29] NINAGO, M.D., LÓPEZ, O.V., LENCINA, M.M.S., *et al.*, “Enhancement of thermoplastic starch final properties by blending with poly(ϵ -caprolactone)”, *Carbohydr. Polym.* v 134, pp 205–212, 2015.

[30] NINAGO, M.D., CIOLINO, A.E., VILLAR, M.A., *et al.*, “Thermal characterization of “comb-like” block copolymers based on PCL obtained by combining ROP and RAFT polymerizations”, *Macromol. Symp.* v 368, pp 84-92, 2016.

[31] SEUSS, S., HEINLOTH, M., BOCCACCINI, A.R., “Development of bioactive composite coatings based on combination of PEEK, bioactive glass and Ag nanoparticles with antibacterial properties”, *Surf. Coatings Technol.* v 301, pp 100–105, 2016.

[32] MIOLA, M., VERNÉ, E., CIRALDO, F.E., *et al.*, “Electrophoretic Deposition of Chitosan/45S5 Bioactive Glass Composite Coatings Doped with Zn and Sr”, *Front. Bioeng. Biotechnol.* v 3, pp 1–13, 2015.

[33] RAYNAUD, S., CHAMPION, E., BERNACHE-ASSOLLANT, D., *et al.*, “Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterisation and thermal stability of powders”, *Biomaterials.* v 23, pp 1065–1072, 2002.

[34] MILOVAC, D., GAMBOA-MARTÍNEZ, T.C., IVANKOVIC, M., *et al.*, “PCL-coated hydroxyapatite scaffold derived from cuttlefish bone: In vitro cell culture studies”, *Mater. Sci. Eng. C.*, v 42, pp 264–272, 2014.

[35] KOKUBO T., TAKADAMA H., “How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?”, *Biomaterials.* v 27, pp 2907–2915, 2006.

[36] SUN, H., MEI, L., SONG C., *et al.*, “The in vivo degradation, absorption and excretion of PCL-based implant”, *Biomaterials.* v 27, pp 1735–40, 2006.

[37] NINAGO, M.D., FREITAS, A.G.O, HANAZUMI, V., *et al.*, “Synthesis of Grafted Block Copolymers Based on ϵ -Caprolactone: Influence of Branches on Their Thermal Behavior”, *Macromol. Chem. Phys.* v 216, pp 2331–2343, 2015.

- [38] YAM, W.Y., ISMAIL, J., KAMMER, H.W., *et al.*, “Polymer blends of poly(ϵ -caprolactone) and poly(vinyl methyl ether) - Thermal properties and morphology”, *Polymer (Guildf)*. v 40, pp 5545–5552, 1999.
- [39] LIU, W., DONG, C.M., “Versatile strategy for the synthesis of hyperbranched poly(ϵ - caprolactone)s and polypseudorotaxanes thereof”, *Macromolecules*. v 43, pp 8447–8455, 2010.
- [40] GUANG-MEI, C., TIE-MEI, Z., LEI, C., *et al.*, “Crystallization properties of polycaprolactone induced by different hydroxyapatite nano-particles”, *Asian J. Chem.*, v 22, pp 5902–5912, 2010.
- [41] PASHAEIYAN, M., BAHARI, A., “Nano structural properties of stainless steel for Ultra high vacuum chambers”, *Int.J. ChemTech Res.* v 3, pp 403–407. 2011.
- [42] ZHITOMIRSKY, D., ROETHER, J.A., BOCCACCINI, A.R., *et al.*, “Electrophoretic deposition of bioactive glass/polymer composite coatings with and without HA nanoparticle inclusions for biomedical applications”, *J. Mater. Process. Technol.* v 209, pp 1853–1860, 2009.
- [43] BAHNIUK, M.S., PIRAYESH, H., SINGH, H.D., *et al.*, “Unsworth, Bioactive glass 45S5 powders: Effect of synthesis route and resultant surface chemistry and crystallinity on protein adsorption from human plasma”, *Biointerphases*, v 7, pp 1–15, 2010.
- [44] CORDERO-ARIAS L., CABANAS-POLO S., GOUDOURI O.M., *et al.*, “Electrophoretic deposition of ZnO/alginate and ZnO-bioactive glass/alginate composite coatings for antimicrobial applications”, *Mater. Sci. Eng. C.*, v 55, pp 137–144, 2015.
- [45] ROOHANI-ESFAHANI, S.I., LU, Z.F., LI, J.J., *et al.*, “Effect of self-assembled nanofibrous silk/polycaprolactone layer on the osteoconductivity and mechanical properties of biphasic calcium phosphate scaffolds”, *Acta Biomater.* v 8, pp. 302–312, 2010.
- [46] CORRAL NUÑEZ, C., COVARRUBIAS, C., FERNANDEZ, E., *et al.*, “Enhanced bioactive properties of Biodentine™ modified with bioactive glass nanoparticles”, *J. Appl. Oral Sci.*, v 25, pp 177-185, 2016.
- [47] ROGINA, A., RESSLER, A., MATIĆ, I., *et al.*, “Cellular hydrogels based on pH-responsive chitosan-hydroxyapatite system”, *Carbohydr. Polym.* v 166, pp173-181, 2017.
- [48] VICHERY, C., NEDELEC, J.M., “Bioactive Glass Nanoparticles: From Synthesis to Materials Design for Biomedical Applications”, *Materials*, v 9, pp 1-17, 2016.
- [49] GUNAWIDJAJA, P.N., LO, A.Y. H., IZQUIERDO-BARBA, I., *et al.*, “Biomimetic Apatite Mineralization Mechanisms of Mesoporous Bioactive Glasses as Probed by Multinuclear ^{31}P , ^{29}Si , ^{23}Na and ^{13}C Solid-State NMR”, *J. Phys. Chem. C.*, v 114, pp 19345–19356, 2010.
- [50] LATIFI, S.M., FATHI, M., SHARIFNABI, A., *et al.*, “In vitro characterisation of a sol–gel derived in situ silica-coated silicate and carbonate co-doped hydroxyapatite nanopowder for bone grafting”, *Mater. Sci. Eng. C.* v 75, pp 272-278, 2017.
- [51] SADAT-SHOJAI, M., KHORASANI, M.T., DINPANAH-KHOSHDARGI, D., *et al.*, “Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite in diverse structures”, *Acta Biomater.* v 9, pp 7591-7621, 2013.
- [52] HUANG, W., DAY, D.E., KITTIRATANAPIBOON, K., *et al.*, “Kinetics and mechanisms of the conversion of silicate (45S5), borate, and borosilicate glasses to hydroxyapatite in dilute phosphate solutions”, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, v 17, pp 583–596, 2006.