

EFFECTO CELULAR DE BIOMATERIALES BIOABSORBIBLES BASE Mg. CONTROL DE LA CORROSIÓN POR NANOPELÍCULAS DE TIMOL

San Martín, Provincia de Buenos Aires, 17 y 18 de Agosto de 2017

M. Bertuola¹; C. A. Grillo¹; M. Fernandez Lorenzo^{1,2}

¹Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), La Plata, Argentina.
mbertuola@inifta.unlp.edu.ar

²Facultad de Ingeniería, UNLP, La Plata, Argentina. cgrillo@inifta.unlp.edu.ar, mmele@inifta.unlp.edu.ar

Tópico: T06. Ciencia y tecnología de superficies. **Categoría:** C3. Estudiante de Posgrado

Resumen

El proceso de biodegradación de biomateriales base Mg induce problemas de biocompatibilidad en el sitio del implante.

En este trabajo se evaluó el efecto celular de Mg y su aleación AZ31 en células de mamíferos. Con el fin de estudiar posibles estrategias de mejora de la biocompatibilidad, se realizaron modificaciones superficiales mediante electropolimerización de timol (TOH) a fin de disminuir la tasa de degradación.

Se llevaron a cabo ensayos de viabilidad celular y de formación de colonias en células de la línea CHO-K1 en la zona adyacente a los discos de Mg y AZ31 mediante tinción con Naranja de Acridina (a 1 y 7 días de incubación, respectivamente). Se encontró una disminución ($p < 0,001$) de células vivas para el Mg y su aleación respecto al control sin discos así como un efecto citotóxico evidenciado por una disminución del número y diámetro de las colonias en las cercanías del Mg ($p \leq 0,001$) y AZ31 ($p \leq 0,01$) respecto al control.

Considerando los resultados obtenidos, se realizaron modificaciones superficiales mediante electropolimerización de TOH sobre AZ31 (poliTOHAZ31) por voltametría cíclica (5 ciclos, 50mV/s) en etanol/agua + Salicilato de sodio(0,5M) + TOH(0,1M). Se estudió la corrosión mediante barridos lineales de potencial y registros de potencial a circuito abierto (OPC/3h) en medio de cultivo (4,8g/L Cl⁻) a 37°C.

Los poliTOHAZ31 presentaron un corrimiento anódico del potencial de corrosión (E_{corr}) de 77mV y un descenso de la corriente de la rama anódica y de la corriente de corrosión de un orden de magnitud. El registro de OPC de poliTOHAZ31 se mantuvo estable durante 3h, mientras que el AZ31 control descendió después de 170min. Contrariamente el poliTOHMg no mostró mejoras significativas en E_{corr} respecto al metal sin tratar.

Podemos concluir que el poliTOH logra controlar la corrosión de AZ31 por lo que podría mejorar su biocompatibilidad, otorgándole un potencial uso como material biodegradable-bioabsorbible.

Palabras clave: Mg, AZ31, Electropolimerización, Timol, Biocompatibilidad

Keywords: Mg, AZ31, Electropolymerization, Thymol, Biocompatibility

1. Introducción

En los últimos años la investigación en materiales biodegradables base Mg ha ido creciendo para aplicaciones en implantes tanto en cirugías cardiovasculares (WE43) y ortopédicas (MgYREZr, Mg puro como tornillos de fijación) [1,2], así como para usos potenciales como *stents* intestinales biodegradables.

Sin embargo, los productos de degradación generados, debido a su alta tasa de corrosión, inducen daños en el tejido circundante al implante. Con el objetivo de disminuir los efectos adversos se han propuesto diversas modificaciones superficiales [3,4].

En este trabajo se evaluó el efecto de la degradación del Mg y su aleación AZ31 en células de la línea CHO-K1. Con el fin de disminuir la tasa de degradación se realizaron modificaciones superficiales mediante electropolimerización de timol (TOH) tal como se había

reportado en trabajos previos para otros metales [5,6].

2. Metodología

2.1. Ensayos biológicos

La viabilidad celular de los cultivos de la línea celular CHO-K1 en contacto directo con los discos metálicos de Mg y AZ31 (diámetro 9 mm) se evaluó mediante tinción con Naranja de Acridina (NA). Para este ensayo, se sembraron 1×10^6 células en placas de Petri y se cultivaron a 37°C en atmósfera húmeda con 5% CO₂ por 24h. Luego, en el centro de cada placa, se agregaron los discos metálicos de AZ31 y Mg y se reemplazó el medio de cultivo por uno fresco. Los cultivos celulares se observaron mediante un microscopio de epifluorescencia (Olympus BX51, Olympus Corp., Tokyo, Japón) luego de 24h de incubación. Se calculó la densidad

celular en función de la distancia a los discos metálicos (Zona A ≤ 15 mm; Zona B ≥ 15 mm) utilizando las fotomicrografías adquiridas mediante el software Image-ProPlus. Paralelamente, se realizó el ensayo clonogénico en forma similar a lo realizado previamente [7,8] a fin de evaluar el efecto sobre el número y diámetro de colonias de las células en contacto con los materiales luego de 7 días de incubación. Se utilizaron las mismas células cultivadas en cubreobjetos de vidrio como control de células.

2. 2. Electropolimerización de TOH sobre AZ31 y Mg

Se realizaron modificaciones superficiales mediante electropolimerización de TOH. Para ello se utilizó una celda electroquímica de tres electrodos utilizando un electrodo de lámina de platino como contraelectrodo, un electrodo de calomel saturado (ECS) como referencia y discos de AZ31 y Mg (9 mm de diámetro y 1,5 mm de espesor) como electrodos de trabajo. La polimerización se realizó mediante voltametría cíclica, en el caso de la aleación AZ31 se llevaron a cabo un total de 5 ciclos, a una velocidad de barrido de 50 mV/s, entre -0,5 V y 1,5 V mientras que para los de Mg fue entre 0,3 V y 1,0 V y un total de 10 ciclos, obteniendo así el poliTOHAZ31 y poliTOHMg, respectivamente. Como electrolito se utilizó una solución de etanol 30 % en agua milliQ con 0,5 mol/L de Salicilato de Sodio y 0,1 mol/L de TOH. Estas condiciones se consideraron óptimas en cuanto al estado de las superficies resultantes como así también a su desempeño en una solución corrosiva de iones Cl⁻.

2. 3. Ensayos de corrosión en medio de cultivo celular

Los ensayos de corrosión se realizaron en medio de cultivo celular (adicionado con 10% de suero fetal bovino) a 37°C como electrolito. Se registraron barridos lineales de potencial comenzando desde -1,8 V hasta -0,8 V a 1 mV/s con un límite de densidad de corriente de 5 mA. Se registró también el potencial a circuito abierto (OPC) durante 3 horas y se observó la superficie antes y después de los tratamientos de inmersión mediante microscopía óptica con el objetivo metalográfico (40X). Se utilizaron como control electrodos de Mg y AZ31 sin recubrimiento.

3. Resultados

3. 1. Ensayos biológicos

El ensayo de viabilidad celular a 24h en presencia de discos de AZ31 y Mg evidenciaron una disminución significativa ($p \leq 0,001$) del número de células vivas en ambas regiones A (cerca al disco) y B (lejana) (Fig. 1A). Por otro lado, el ensayo de formación de colonias en presencia de discos de Mg evidenció una disminución significativa en el diámetro de las colonias en ambas zonas (diámetros de colonias como % de control en Zona A: $22,40 \pm 6,89$ %, en Zona B: $75,34 \pm 11,50$ %, $p \leq 0,001$), y un menor número de colonias en la Zona A con respecto a la zona B. En presencia de AZ31 la disminución en el número y diámetro de colonias resultó en un promedio de tan sólo 10 % respecto al control de células ($p \leq 0,01$) (Fig. 1B) indicando una mejor biocompatibilidad para la aleación.

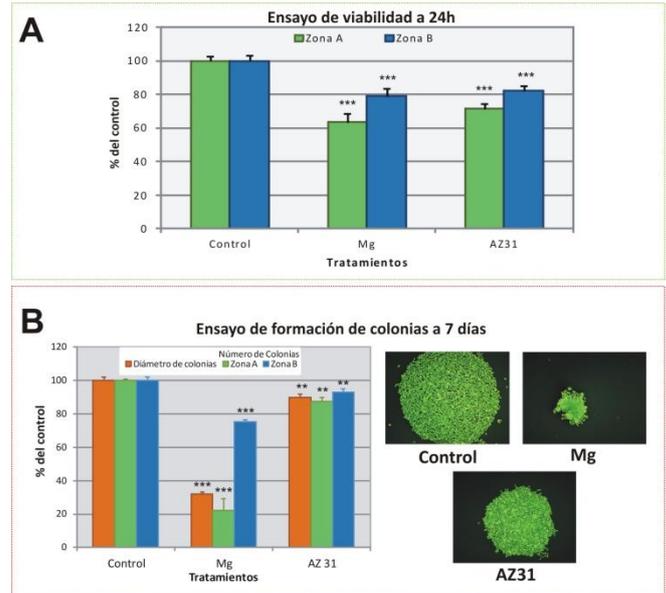


Figura 1. A) Ensayo de viabilidad de células CHO-K1 a 24h; B) ensayo de formación de colonias a 7 días.

3. 2. Electropolimerización de TOH sobre AZ31 y Mg

Los registros de la densidad de corriente (j /mA cm^{-2}) en función del potencial (E vs ECS/mV) en presencia de poliTOH mostraron un descenso de la densidad de corriente luego del primer ciclo en AZ31 y Mg, como se observa en la Fig. 2, siendo $46,96 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ y $959,55 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ al finalizar el último ciclo, respectivamente. En ambos materiales se nota un pico correspondiente a la oxidación reversible de salicilato de sodio (AZ31: 380 mV; Mg: 620 mV). Cuando el TOH está presente en el electrolito, en el caso de AZ31 se observa un segundo pico de oxidación a 1250 mV que corresponde a la oxidación de TOH, mientras que en el caso de Mg se observa que la corriente crece a partir de 900 mV.

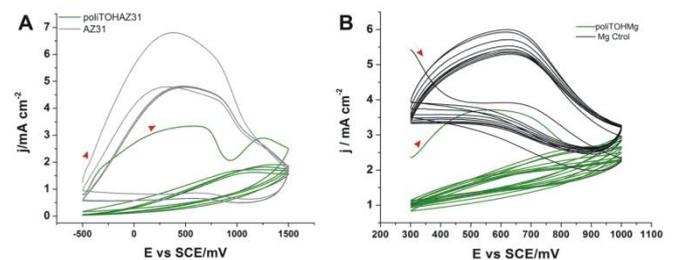


Figura 2. Registros de densidad de corriente obtenidos durante la polimerización de TOH (verde) sobre AZ31 (A) y Mg (B). Las flechas rojas indican el sentido de la polarización.

3.3 Ensayos de corrosión en medio de cultivo celular

Los barridos lineales de potencial realizados con poliTOHAZ31 (Fig. 3A) presentaron un corrimiento del potencial de corrosión (E_{corr}) de 77 mV en sentido anódico, siendo $-1576,8 \pm 13,7$ mV para poliTOHAZ31 y $-1653,8 \pm 20,6$ mV para AZ31 sin tratar. Se observa además, un descenso de la rama anódica que lleva a una densidad de corriente de corrosión (I_{corr}) de $3,04 \pm 0,43 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ significativamente menor que la sin tratar de $22,18 \pm 1,68 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Sin embargo, el poliTOHMg no mostró mejoras

significativas en E_{corr} o I_{corr} respecto al Mg sin tratar (Fig. 3B).

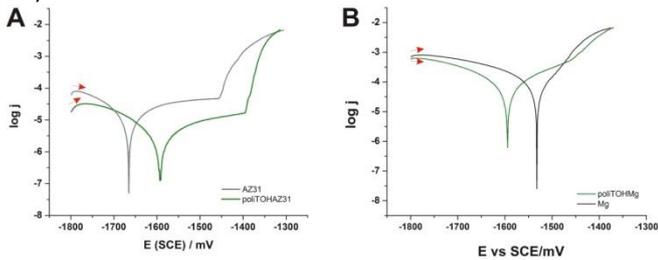


Figura 3. Barridos lineales de potencial registrados para los tratamientos sobre AZ31 (A) y Mg (B) en DMEM a 37°C. Las flechas rojas indican el sentido de la polarización.

El registro de OPC de poliTOHAZ31 se mantuvo estable durante 3 h (10800 s) y no se observó liberación de hidrógeno en la superficie, mientras que el AZ31 sin tratar después de 1000s sufrió una drástica caída de potencial que daría cuenta del ataque localizado (Fig. 4A, Fig. 5).

En el caso del tratamiento sobre Mg, el poliTOHMg presentó una ruptura de la pasividad a 6000 s de inmersión en medio de cultivo celular, seguida de la corrosión por picado con presencia de burbujas en la superficie (flechas rojas en la Fig. 5), similar al control de Mg sin tratar (Fig. 4B, Fig. 5).

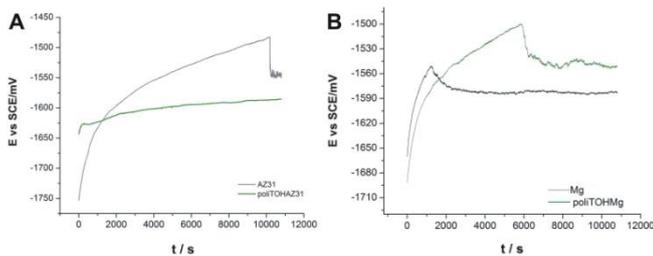


Figura 4. Registro de OPC en medio de cultivo celular a 37°C durante 3h para tratamientos sobre AZ31(A) y Mg (B).

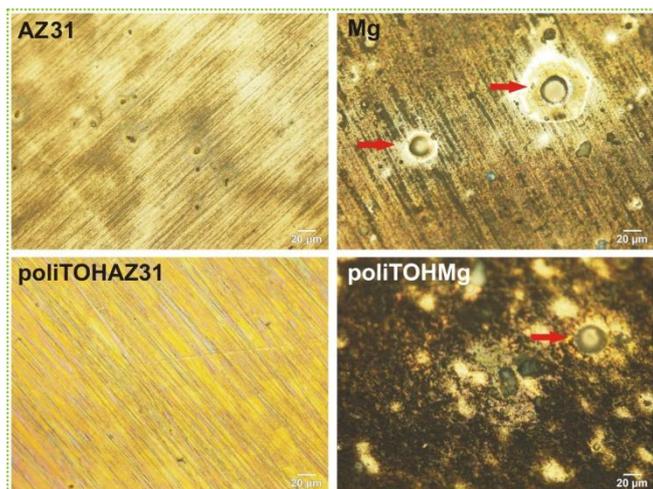


Figura 5. Fotomicrografías de los materiales luego de 3 horas de inmersión en medio de cultivo celular a 37°C.

Los resultados indican que el poliTOHAZ31 tiene un efecto inhibitorio de la corrosión del material. Sin embargo, el recubrimiento generado sobre Mg no logra dicho efecto probablemente debido a la gran reactividad de la superficie.

4. Conclusiones

Los resultados de viabilidad celular evidencian un fuerte efecto citotóxico en el caso de Mg, debido a cambios locales de pH, liberación de burbujas de hidrógeno y alta concentración de iones Mg^{+2} relacionados con la alta tasa de corrosión. Se observó además una disminución en la viabilidad y en el número y diámetro de colonias para AZ31. Los resultados obtenidos indican que los recubrimientos generados sobre los materiales presentaron una reducción de la corrosión para las muestras de AZ31 mientras que dicho efecto no se observó para el Mg.

Es de esperar que la reducción en la velocidad de corrosión mejore la biocompatibilidad de los materiales estudiados. Como perspectiva futura se analizará la posible mejora de la biocompatibilidad mediante la evaluación del efecto celular del poliTOHAZ31 frente al metal sin tratar.

Agradecimientos

ANPCyT-CONICET, UNLP (11/1163), ANPCyT (PICT 2012-1795).

Referencias

- [1] D. Zhao, F. Witte, F. Lu, J. Wang, J. Li, L. Qin, *Biomaterials*. **112** (2017) 287–302.
- [2] X. Li, X. Liu, S. Wu, K.W.K. Yeung, Y. Zheng, P.K. Chu, *Acta Biomater.* **45** (2016) 2–30.
- [3] V. Wagener, A. Schilling, A. Mainka, D. Hennig, R. Gerum, M.L. Kelch, et al., *ACS Appl. Mater. Interfaces*. **8** (2016) 11998–12006.
- [4] P. Tian, X. Liu, C. Ding, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. **128** (2015) 44–54.
- [5] M. Bertuola, C.A. Grillo, M.A. Fernández Lorenzo, J. Hazard. *Mater.* **313** (2016) 262–271.
- [6] M. Bertuola, D. Pissinis, A. Rubert, E. Prieto, M.A. Fernández Lorenzo, *Electrochim. Acta*. **215** (2016) 289–297.
- [7] N.A.P. Franken, H.M. Rodermond, J. Stap, J. Haveman, C. van Bree, *Nat. Protoc.* **1** (2006) 2315–9. doi:10.1038/nprot.2006.339.
- [8] C.A. Grillo, M. V. Mirífico, M.L. Morales, M.A. Reigosa, M.A. Fernández Lorenzo, *J. Hazard. Mater.* **170** (2009) 1173–8.