



UNIVERSIDAD NACIONAL
de MAR DEL PLATA
.....



FRIEDRICH-ALEXANDER
UNIVERSITÄT
ERLANGEN-NÜRNBERG

MODIFICACIÓN SUPERFICIAL DE ACERO
INOXIDABLE POR DEPOSICIÓN
ELECTROFORÉTICA, CONTENIENDO ZEÍNA Y
VIDRIOS DOPADOS CON COBRE, PARA SU
APLICACIÓN COMO IMPLANTES
QUIRÚRGICOS

CAMILA ALEJANDRA ARANDA

PROYECTO FINAL DE GRADO- INGENIERÍA EN MATERIALES

DIRECTORES: DRA. JOSEFINA BALLARRE Y DR. ALDO BOCACCINI

COLABORADORA: LAURA RAMOS RIVERA

MAR DEL PLATA - AGOSTO 2021



RINFI se desarrolla en forma conjunta entre el INTEMA y la Biblioteca de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Mar del Plata.

Tiene como objetivo recopilar, organizar, gestionar, difundir y preservar documentos digitales en Ingeniería, Ciencia y Tecnología de Materiales y Ciencias Afines.

A través del Acceso Abierto, se pretende aumentar la visibilidad y el impacto de los resultados de la investigación, asumiendo las políticas y cumpliendo con los protocolos y estándares internacionales para la interoperabilidad entre repositorios



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-
NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a Josefina Ballarre. Su apoyo, motivación, dedicación y calidez fueron clave en la finalización del proyecto. Gracias por brindarme los conocimientos y por ayudarme y acompañarme a finalizar el trabajo iniciado en Alemania.

A Silvia Simisson y todos los que forman parte del programa IDEAR que hicieron posible el intercambio con la FAU-Erlangen-Núremberg.

Especial agradecimiento al Profesor Aldo Boccaccini, por abrirme las puertas de su Instituto de Biomateriales en la Universidad Friedrich Alexander y brindarme un tema de investigación. Agradezco su buena predisposición y supervisión junto con Laura Ramos.

A todos los que integran la división de Electroquímica aplicada por generar un ambiente cálido, hacerme sentir cómoda dentro del laboratorio y estar dispuestos a dar una mano cuando fuera necesario. Especialmente gracias a Silvia Ceré por su ayuda con los ensayos electroquímicos y a María Rosa Katunar por sus conocimientos sobre las células.

A Karina Herrera Seiz por los ensayos antibacteriales, Diego Colombo por los ensayos de rugosidad, Juan Ignacio Pastore por el procesamiento digital de imágenes y a Diana Fasce por los espectros de FTIR.

A todos los profesores de la universidad, por la educación brindada.

A mis papás y mi hermana, por brindarme todo su amor y calidez, por escucharme en todo momento y acompañarme en los momentos de mayor estrés.

A Rocío y Martín por todas las experiencias que compartimos, por su amistad, los buenos y los malos momentos, los trabajos, los viajes, por todo.

A Sebastián por su amistad durante todos estos años. A Pancho, Carlos y Lucas, por los lindos momentos que pasamos en los últimos años de la carrera.

A todos, ¡muchas gracias!

Resumen

El acero inoxidable es un material ampliamente utilizado para implantes traumatológicos permanentes, principalmente por su resistencia mecánica y su bajo costo. Sin embargo, no presenta propiedades osteoinductivas que favorezcan la unión del implante al tejido adyacente y es susceptible a la corrosión en medio fisiológico, con la consecuente liberación de iones metálicos al organismo y la disminución de vida útil del implante.

En el presente trabajo se realizaron recubrimientos sobre acero inoxidable por medio de deposición electroforética (EPD), con el objetivo de contrarrestar las problemáticas y limitaciones del metal. Los recubrimientos fueron fabricados con: zeína, un polímero natural y biocompatible que proveyó la plataforma para la incorporación de materiales funcionales; vidrio bioactivo para favorecer la unión del implante al tejido; y cobre, que se incorporó como dopante del biovidrio, para proveer propiedades antibacteriales, angiogénicas y disminuir posibles riesgos de infección. Los recubrimientos fueron caracterizados mediante distintas técnicas que incluyeron microscopía óptica y SEM, procesamiento digital de imágenes, FTIR, perfilometría, ensayos de adhesión y ángulo de contacto. Además, se realizaron ensayos electroquímicos, de viabilidad/proliferación celular, de liberación de cobre y actividad antibacteriana.

Los recubrimientos mostraron buena adhesión al sustrato, aumentaron levemente su rugosidad y redujeron su ángulo de mojado. El análisis FTIR demostró cierta bioactividad de las capas tras 7 días de inmersión en SBF, por la aparición de depósitos relacionados a la hidroxiapatita. Sin embargo, los ensayos electroquímicos realizados tras ese tiempo indicaron una bioactividad baja. Mediante UV-vis se comprobó la liberación de cobre de las capas, aunque los ensayos antibacteriales mostraron una baja actividad antibacterial. No se observaron mejoras en la resistencia a la corrosión de las muestras recubiertas respecto del sustrato en los ensayos electroquímicos. Los ensayos *in vitro* celulares mostraron una gran adhesión y proliferación de las células C2C12 sobre las muestras recubiertas.

Índice

1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 Biomateriales	5
1.2 Vidrios bioactivos	6
1.2.1 Vidrios bioactivos dopados con cobre	9
1.3 Implantes metálicos	10
1.3.1 Acero inoxidable AISI 316L	11
1.4 Zeína	11
1.5 Deposición electroforética (EPD)	13
1.6 Técnicas de caracterización	15
1.6.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDS).	15
1.6.2 Perfilometría	16
1.6.3 Ángulo de contacto (CA)	17
1.6.4 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)	17
1.6.5 Espectroscopia Ultravioleta visible (UV-vis).....	18
1.7 Ensayos electroquímicos	18
1.7.1 Espectroscopia de impedancia electroquímica	19
1.7.2 Curvas de polarización potenciodinámicas	20
1.8 Viabilidad y proliferación celular	21
2. OBJETIVOS	22
3. MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1 Materiales de partida	23
3.1.1 Sustratos metálicos	23
3.1.2 Vidrios bioactivos	23
3.2 Recubrimientos	24
3.2.1 Preparación de sustratos.....	24
3.2.2 Preparación de las suspensiones	24
3.2.3 Deposición electroforética (EPD).....	25
3.3 Inmersión en solución fisiológica simulada (SBF)	25
3.3.1 Preparación de la SBF	25
3.3.2 Inmersión en SBF.....	25
3.4 Caracterización del sustrato y los recubrimientos	26
3.4.1 Microestructura del acero inoxidable	26
3.4.2 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	26

3.4.3	Sección transversal	26
3.4.4	Perfilometría	27
3.4.5	Ángulo de contacto (CA)	27
3.4.6	Tape test	27
3.4.1	Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR-ATR) ..	27
3.4.2	Microscopía óptica	28
3.4.3	Procesamiento digital de imágenes (PDI).....	28
3.5	Ensayos electroquímicos	29
3.5.1	Espectroscopía de Impedancia Electroquímica (EIS)	29
3.5.2	Curvas de polarización potenciodinámicas	29
3.6	Evaluación de actividad antibacterial	30
3.7	Evaluación de liberación de iones <i>in vitro</i>	30
3.8	Evaluación de la viabilidad celular	30
3.8.1	WST-8.....	31
3.8.2	Microscopía de fluorescencia	31
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
4.1	Caracterización del sustrato	32
4.2	Selección de condiciones de deposición.....	33
4.3	Caracterización de los recubrimientos	38
4.3.1	Perfilometría y sección transversal	38
4.3.2	Ángulo de contacto (CA)	41
4.3.3	Tape test	42
4.4	Ensayos <i>in vitro</i>	43
4.4.1	Espectroscopía Infrarroja por Trasformada de Fourier (FTIR-ATR)	43
4.4.2	Microscopía óptica y porosidad	44
4.4.3	Ensayos electroquímicos.....	48
4.5	Ensayos de liberación de cobre y antibacteriales	56
4.6	Evaluación celular <i>in vitro</i>.....	59
5.	CONCLUSIONES	61
6.	TRABAJO A FUTURO	62
7.	REFERENCIAS	63

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Biomateriales

Se define como 'biomaterial' a cualquier sustancia que ha sido diseñada para dirigir, sola o como parte de un sistema complejo, el curso de una terapia o diagnóstico médico, mediante interacciones con componentes de los sistemas biológicos [1].

Los biomateriales pueden adoptar la forma de implantes (implantes dentales, traumatológicos, válvulas cardíacas, lentes intraoculares, ligamentos, injertos vasculares, etc.) o de dispositivos médicos (corazones artificiales, biosensores, marcapasos, etc.). Se utilizan para reemplazar o mejorar la función de aquellos tejidos u órganos que han sido dañados o han sufrido degeneración, con el objetivo de mejorar la calidad de vida de los pacientes.

Para cualquier aplicación, un biomaterial dado debe permitir un uso suficientemente prolongado sin perder su función prevista o que el organismo huésped lo rechace. Para lograrlo, el diseño y la selección de biomateriales debe tener en cuenta múltiples propiedades (mecánicas, físicas, químicas y biológicas) y requisitos que dependerán del contexto específico, así como del historial médico del paciente [2].

Los biomateriales deben ser biocompatibles, entendiendo como biocompatibilidad la capacidad de un material para funcionar con una respuesta adecuada del organismo huésped en una aplicación específica [1]. Esto significa que su presencia no puede provocar efectos adversos o nocivos localmente (en el área de implantación), ni en otros órganos o tejidos [3]. En caso de utilizar materiales que se degradarán dentro del organismo, se debe asegurar que los compuestos liberados serán biocompatibles [2].

Algunos materiales presentan además propiedades bioactivas, es decir generan una respuesta beneficiosa del cuerpo, promoviendo la unión al tejido que los rodea [4].

En el desarrollo de biomateriales, es de vital importancia la interfaz entre el tejido biológico y el material implantado. El estudio de diversas interfaces (implante-hueso, implante-sangre, etc.), así como estudios *in vitro* de adhesión y proliferación celular de diferentes biomateriales, ha demostrado que los sistemas biológicos tienen la habilidad de reconocer detalles a nivel molecular [5]. Entre las propiedades físico-químicas superficiales que afectan a la respuesta celular, se encuentran: la mojabilidad, la energía superficial, la rugosidad, la composición química, la carga eléctrica superficial y la morfología [5].

Kasemo y col. [6] describieron la secuencia de eventos que se producen tras la inserción de un material en el interior del cuerpo humano:

1) Las moléculas de agua son las primeras que alcanzan la superficie, la interacción entre ambas depende de la mojabilidad de la superficie. Si es hidrofílica, las moléculas de H₂O se disocian y forman superficies terminadas en grupos OH⁻. Si es hidrofóbica se unen débilmente a la superficie sin llegar a disociarse.

2) Los iones presentes en el medio biológico, (tales como Na⁺ y Cl⁻), se incorporan a la capa de agua como iones hidratados, formando una doble capa cuyo grosor depende de las propiedades electrostáticas entre el medio y la superficie del implante.

3) Las proteínas son adsorbidas y/o desorbidas por la superficie dependiendo de las propiedades electrostáticas establecidas con la capa de agua.

4) Finalmente, la respuesta implante-célula dependerá, en gran medida, del tipo de proteínas presentes y su distribución. El resultado de esta interacción puede ser la integración del implante o bien su encapsulamiento con una capa fibrosa.

Esta secuencia de procesos [6], [5] en la interfaz implante/tejido evidencia la relación directa que existe entre las propiedades de la superficie del material y la respuesta celular.

Para la producción de biomateriales, se utilizan metales, cerámicos, polímeros y materiales compuestos. La necesidad de encontrar el más adecuado para cada caso, hace que la elección del material esté directamente relacionada con sus propiedades, procesabilidad, costo y disponibilidad.

1.2 Vidrios bioactivos

En 1969, Hench junto con colaboradores, encontraron que algunos vidrios compuestos por SiO₂, Na₂O, CaO y P₂O₅, en proporciones específicas, tenían una excelente biocompatibilidad con el hueso natural y podían formar un enlace químico con él [33]. Su principal descubrimiento fue el vidrio 45S5 Bioglass®, que comenzó a ser comercializado en 1985. Desde entonces se denominó como vidrio bioactivo (también llamados biovidrios) a “aquel que provoca una respuesta biológica específica en la interfaz del material que da como resultado la formación de un enlace entre los tejidos y el material” [4].

El mecanismo de unión ósea se atribuye a la formación de una capa de hidroxicarbonato de apatita o hidroxiapatita carbonatada (HCA) en la superficie del vidrio, después de su disolución inicial. El HCA es similar al mineral óseo y se infiere que interactúa con las fibrillas de colágeno para integrarse (unirse) con el hueso. Las etapas propuestas para la formación de HCA, ya sea en fluidos corporales *in vivo* o en fluidos corporales simulados (SBF) *in vitro*, se muestran en la *Figura 1*, y son [7]:

1. Formación de enlaces silanol (Si-OH) en la superficie del vidrio debido a un rápido intercambio catiónico de Na^+ y/o Ca^{2+} con H^+ del medio. Aumento del pH y creación de zonas ricas en sílice.
2. Rompimiento de los enlaces Si-O-Si por un pH local alto. Pérdida de sílice soluble en forma de $\text{Si}(\text{OH})_4$ y aumento de silanoles en la interface vidrio/solución.
3. Condensación de grupos Si-OH cerca de la superficie del vidrio y formación de una capa rica en sílice.
4. Migración de los grupos Ca^{2+} y PO_4^{3-} a la superficie a través de la capa rica en sílice. Formación de una película rica en $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ amorfo sobre la capa rica en sílice.
5. Incorporación de hidroxilos y carbonatos de la solución y cristalización de la película de $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ en HCA.

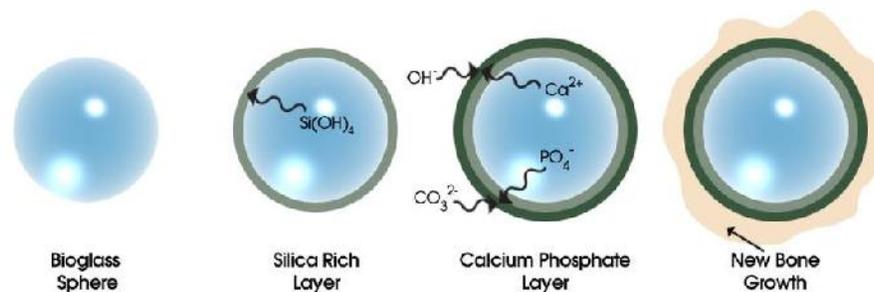


Figura 1. Etapas propuestas para la formación de HCA en vidrios bioactivos.

Una vez que se ha formado la capa de HCA, la unión del hueso implica la adsorción de proteínas, incorporación de fibrillas de colágeno, unión de las células progenitoras óseas, diferenciación celular y excreción de la matriz extracelular ósea, seguida de su mineralización [7].

La bioactividad de un vidrio y su capacidad para estimular la regeneración ósea a nivel celular, dependerá de su velocidad de disolución y formación de la capa de HCA. Estos parámetros pueden controlarse mediante la composición y estructura atómica del vidrio [7].

Los vidrios bioactivos de silicato están formados por tetraedros de sílice conectados por oxígenos puente (ver *Figura 2*). El silicio actúa como átomo formador de red, dando a la estructura de vidrio estabilidad química. Los modificadores de red, como el sodio y el calcio, forman enlaces de oxígeno no puente que interrumpen la red. La velocidad de reacción bioactiva con el medio y la posibilidad de reabsorción del material, estarán dadas por la relación entre oxígenos puente y oxígenos no puente presentes en el vidrio. Es decir, a menor concentración de SiO_2 en el vidrio bioactivo

y mayor cantidad de Na_2O o CaO , la estabilidad química disminuye y la tasa de reactividad aumenta [7], [8].

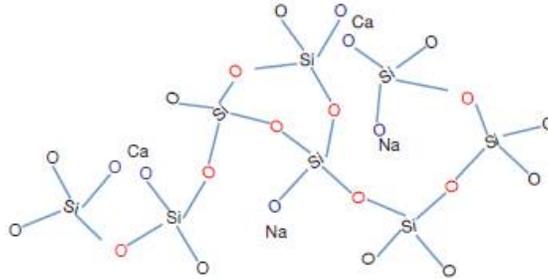


Figura 2. Estructura de vidrios de silicato. Oxígenos puente (rojos) estabilizan el material, oxígenos no puente (negros) facilitan la disolución en medio biológico.

En la Figura 3 se presenta un diagrama de fase ternario SiO_2 - CaO - Na_2O con un valor fijo de 6% en peso de P_2O_5 , que muestra los límites de bioactividad para distintas composiciones de vidrio [9]. Los materiales de clase A son osteoprodutivos y osteoconductivos, poseen una superficie bioactiva, que puede ser colonizada por células madre osteogénicas debido a que el material induce respuestas tanto intracelulares como extracelulares. Tienen la capacidad de unirse tanto a huesos como a tejidos conductivos blandos. Un ejemplo de material clase A es el 45S5 Bioglass®. Los vidrios de clase B son osteoconductores y proporcionan una superficie biocompatible para la migración ósea. Las composiciones de la región C, que poseen un alto contenido de sílice, son químicamente estables y se comportan como materiales inertes. Las composiciones de la región D son degradables dentro del cuerpo y pueden reabsorberse en 10 a 30 días. Finalmente, los materiales de clase E tienen altas proporciones de $(\text{Na}_2\text{O}+\text{CaO}) / \text{SiO}_2$ y, por lo tanto, desvitrifican o producen vidrios no prácticos con un rango de trabajabilidad muy corto [4], [9], [8].

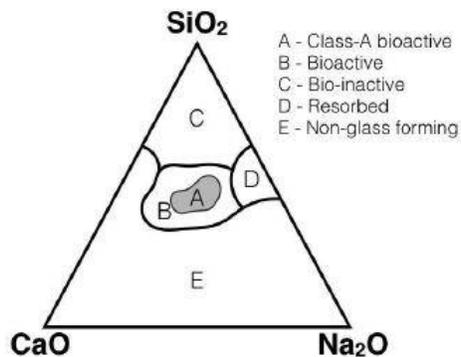


Figura 3. Diagrama ternario de vidrios con distintos niveles de bioactividad [9].

Se pueden agregar muchos aditivos, incluidos MgO , K_2O , B_2O_3 , Al_2O_3 , Zr_2O_3 , CaF_2 y Ta_2O_5 al vidrio bioactivo para mejorar sus propiedades mecánicas y térmicas o para mejorar su rango de trabajabilidad. Sin embargo, una condición de frontera que limite la modificación de la composición del vidrio será la propiedad de bioactividad [8].

En la actualidad existen varios tipos de vidrios bioactivos, que incluyen: los silicatos convencionales, vidrios a base de fosfato; y vidrios a base de borato.

La mayoría de los materiales cerámicos, poliméricos y metálicos utilizados para fabricar implantes no son bioactivos, y la respuesta tisular tras su implantación suele ser una encapsulación fibrosa. El tejido fibroso formado impide la integración del implante con el hueso, debilitando la unión entre ambas superficies. Por esta razón, la creación de superficies bioactivas, a través de la generación de recubrimientos con materiales vítreos, cerámicos o poliméricos, es una alternativa ampliamente utilizada para mejorar la fijación biológica de los implantes, ya que no conlleva la fibro-encapsulación. Además, permite que las células óseas se adhieran y formen una matriz ósea sobre la superficie del implante [8], [5].

1.2.1 Vidrios bioactivos dopados con cobre

En las últimas décadas, se han realizado esfuerzos para mejorar el rendimiento biológico de los vidrios bioactivos y las cerámicas mediante la incorporación de iones metálicos en la matriz del vidrio. Tras la disolución de la matriz inorgánica, estos iones se liberan e inducen efectos terapéuticos adicionales en el entorno fisiológico [10].

Para este propósito, el cobre es un candidato de gran interés ya que es conocido por ser un fuerte agente antibacteriano y tener un efecto anginogénico [11]. Se ha demostrado que promueve el crecimiento de células endoteliales humanas y conduce a una diferenciación mejorada de células madre mesenquimales (MSC) en el linaje de la médula ósea [12].

El mecanismo antibacteriano del cobre es complejo y no se comprende en su totalidad. La secuencia que se ha propuesto incluye 4 pasos [13]:

1. Los iones de cobre se desprenden de la superficie, penetran a la célula bacteriana y dañan la membrana citoplasmática.
2. La ruptura de la membrana citoplasmática favorece la entrada de iones cobre, lo que conduce a disfunción de la membrana y aumento del estrés oxidativo.
3. A nivel de citoplasma se produce alteración de la síntesis proteica y daño funcional de enzimas esenciales.
4. Muerte celular y degradación del ADN bacteriano.

Se debe tener en cuenta que exceder las concentraciones óptimas de iones de cobre en el organismo puede resultar en citotoxicidad debido a la generación de especies de radicales libres, y conlleva el riesgo de enfermedades neurodegenerativas. Por lo tanto, el dopaje de vidrios bioactivos con pequeñas cantidades de cobre proporciona un enfoque prometedor para la liberación de iones controlada y sostenida [14].

1.3 Implantes metálicos

Los metales y sus aleaciones son ampliamente empleados en aplicaciones biomédicas por su biocompatibilidad, buena resistencia mecánica y tenacidad a la fractura, su resistencia a la corrosión y costo razonable [15].

Actualmente, los más utilizados para implantes permanentes son: titanio y sus aleaciones, cromo-cobalto y acero inoxidable. Además, se está evaluando el uso de metales como hierro, zinc y magnesio para implantes temporales en los que, una vez completada su función, se degradan de forma natural en el organismo [3]. Los metales nobles como el oro, la plata y el platino también se utilizan como biomateriales. Su alto costo, alta densidad y resistencia insuficiente hacen que su uso sea extremadamente restringido en el panorama actual de biomateriales en comparación con los metales descritos anteriormente [3].

Uno de los principales problemas de los implantes metálicos permanentes es la liberación de iones por procesos de corrosión o desgaste. Los iones metálicos pueden acumularse en los tejidos cercanos o ser transportados a otras partes del organismo y generar efectos adversos en la salud del paciente, haciéndolos no biocompatibles. La liberación de iones ha sido asociada con necrosis de los tejidos, osteólisis, reacciones alérgicas, acumulación de iones en sitios remotos, inflamación, etc. [2], [16], [17].

Por otro lado, el desgaste o corrosión del implante también reduce su vida útil, puede hacerlo más frágil y susceptible a fracturas o fallas mecánicas, y hacer que el paciente requiera una segunda cirugía. Los procesos de corrosión que prevalecen en biomedicina son por fatiga, fricción o rozamiento (fretting), picaduras/crevice y desgaste [18].

El diseño inadecuado del implante, su degradación/corrosión no deseada y/o el desarrollo de una reacción adversa en el tejido del huésped provocarán la falla del implante.

1.3.1 Acero inoxidable AISI 316L

Los aceros inoxidables se utilizan principalmente en implantología debido a su bajo costo, facilidad de conformado y maquinado, resistencia a la corrosión y gran disponibilidad [15], [18]. El más utilizado en aplicaciones médicas es el acero austenítico AISI 316L, una aleación en base hierro que contiene cromo, níquel y molibdeno como sus principales aleantes. La letra “L” hace referencia al bajo contenido de carbono (“low carbon”) en su composición, lo que es deseable porque reduce el riesgo de precipitación de carburos de cromo durante la fabricación del acero, que da lugar a la sensibilización por cromo y corrosión intergranular [19].

La concentración de cromo en los aceros inoxidables debe ser superior al 12% para que se forme una película pasiva de óxido de cromo en todo el material, la cual evita la propagación del oxígeno por el resto de la aleación y le proporciona resistencia a la corrosión [19]. El níquel estabiliza la fase γ -austenita a temperatura ambiente y mejora la resistencia a la corrosión (aunque la estabilidad de esta fase depende también del contenido de cromo). Además, la presencia de otros aleantes como molibdeno y nitrógeno mejoran la resistencia a la corrosión localizada del acero [18].

Sin embargo, se debe considerar que el medio fisiológico del paciente representa un medio hostil para el metal (presencia de cloruros, temperatura, etc.) y favorece su corrosión. Entre las causas más comunes de fallas de implantes de 316L se destacan: corrosión por picadura/crevice y fatiga [18]. Como se mencionó anteriormente, la corrosión reduce la vida útil del implante y libera iones metálicos que causan efectos indeseados.

Además, debe tenerse en cuenta que las concentraciones de oxígeno y los valores del pH del organismo pueden estar sujetos a cambios, y un implante que funciona bien en un estado del cuerpo puede experimentar un nivel indeseable de corrosión en otro. Bajos niveles de oxígeno no permiten mantener ni desarrollar la película de óxido pasivo que proteja al implante, lo que acelera su corrosión. Los fluidos corporales tienen un pH cercano a 7.2-7.4 a 37 °C y 1 atmósfera de presión, pero por ejemplo durante la cirugía o una lesión puede haber una irritación que haga que el pH descienda a 3-4 por secreciones de las células inflamatorias, favoreciendo la corrosión del implante [20].

1.4 Zeína

Los polímeros naturales basados en proteínas han ganado gran interés en aplicaciones biomédicas debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad y a su procesabilidad [21]. Se los clasifica en biopolímeros basados en proteínas de origen animal o de origen vegetal, dentro de estos últimos se encuentra la zeína.

La zeína es una de las principales proteínas de almacenamiento del maíz, fue descubierta por John Gorham en 1821 [22]. Su producción se comercializó en 1939

y desde entonces ha sido investigada ampliamente como un excelente candidato de polímeros ecológicos en varias aplicaciones [23].

El maíz contiene varios tipos de proteínas que, basados en su solubilidad, se clasifican en cuatro grupos: albúminas (solubles en agua), globulinas (solubles en solución salina acuosa), prolaminas (insolubles en agua y 70% solubles en alcohol) y glutelinas (insolubles en agua y alcohol) [24]. La zeína pertenece a la clase de prolaminas, es separada del endospermo del maíz y representa alrededor del 80% de las proteínas presentes en él [25].

Según la solubilidad y la masa molar, se distinguen cuatro grupos: α -, β -, γ - y δ -zeína. En el proceso de extracción comercial se obtiene en mayores cantidades la fracción de α -zeína (es aproximadamente el 80% del total de prolamina presente en el maíz) y su masa molar está en el rango de 20-25 kDa [24], [26].

Todos los grupos de la zeína están compuestos por aminoácidos neutrales e hidrofóbicos, como leucina (20%), prolina (10%) y alanina (10%) y contienen además gran cantidad de aminoácidos polares e hidrófilos, como la glutamina (21-26%) [26]. La presencia de ambos tipos de aminoácidos hace que la proteína sea anfifílica, de modo que posee tanto propiedades hidrofílicas como hidrofóbicas [24].

En la Figura 4 se presentan dos modelos de estructura tridimensional propuestos para la α -zeína. En ambos casos se considera que la estructura está formada por segmentos helicoidales hidrofóbicos, plegados entre sí de manera antiparalela, estabilizados por enlaces hidrógeno y unidos en la parte superior e inferior por regiones polares ricas en glutamina [26]. Argos [27] propuso que existen 9 unidades repetitivas que forman una estructura elipsoidal (Figura 4a), mientras que Matsushima [28] propuso junto con un grupo de colaboradores que la estructura estaba formada por 10 u 11 segmentos helicoidales dispuestos como se muestra en la Figura 4b.

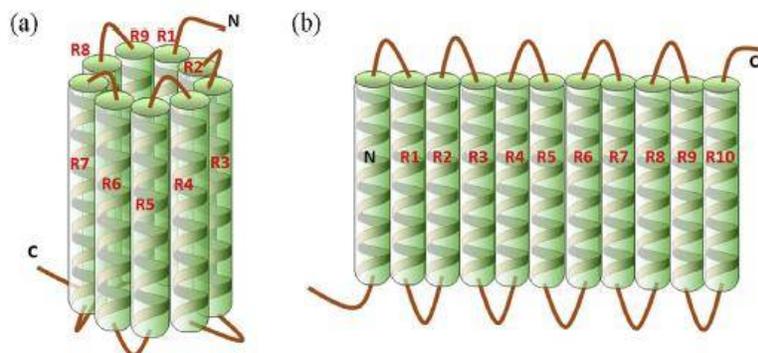


Figura 4. Estructuras tridimensionales de la α -zeína propuestas por: (a) Argón y (b) Matsushima [26].

Debido a su peso molecular, grado de polimerización y estructura química, la zeína exhibe buenas propiedades para la formación de films [24]. Además, dada su facilidad de procesamiento se pueden fabricar láminas, fibras, microesferas y nanopartículas de zeína [21].

Al ser biodegradable, biocompatible, provenir de fuentes renovables y poseer propiedades de material barrera (baja permeabilidad al vapor de agua, grasas, aceites, etc.) es utilizada en múltiples rubros, incluyendo el farmacéutico, alimenticio, textil y en el campo biomédico. [24].

En general se incorporan plastificadores junto con la zeína para reducir su fragilidad, aunque si se usan en gran cantidad pueden perjudicar sus propiedades de barrera [29]. El más utilizado es el glicerol que también es un producto natural, biodegradable y no tóxico [30].

La naturaleza anfifílica de la zeína hace que sea muy versátil para unirse con polímeros hidrófilos e hidrófobos y modificar las propiedades de los componentes individuales [24].

En la biomedicina, se la suele utilizar en ingeniería de tejidos junto con materiales inorgánicos que tienen un impacto positivo en las propiedades hidrófilas de las matrices de zeína, e inducen un entorno adecuado para la adhesión y proliferación celular [21]. Además, según los materiales añadidos, la zeína puede adquirir nuevas funcionalidades como propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antibacteriales, etc. [21].

Su estructura en espiral permite cargar suficiente cantidad de fármaco para ser utilizada en implantes de liberación sostenida [31].

Dentro de las potenciales aplicaciones de la zeína se destacan: liberación controlada de fármacos, apósitos para heridas, dispositivos nanofluídicos, superficies adhesivas celulares, recubrimientos antibacterianos e ingeniería de tejidos [32]. En donde la biocompatibilidad, biodegradabilidad y relativa hidrofiliidad aparecen como factores clave.

1.5 Deposición electroforética (EPD)

La deposición electroforética es una técnica mediante la cual se generan recubrimientos a partir de suspensiones coloidales o soluciones de macromoléculas.

Para realizar una deposición electroforética se necesita una celda conformada por dos electrodos de trabajo (el sustrato y el contra-electrodo), la suspensión coloidal o solución de macromoléculas y una fuente de alimentación que puede ser corriente

continua (DC) o alterna (AC) (Ver *Figura 5*). En el proceso de EPD las partículas se mueven a través de la suspensión coloidal debido a la aplicación de un campo eléctrico y se depositan en el sustrato conductor que tiene una carga opuesta a la de las partículas.

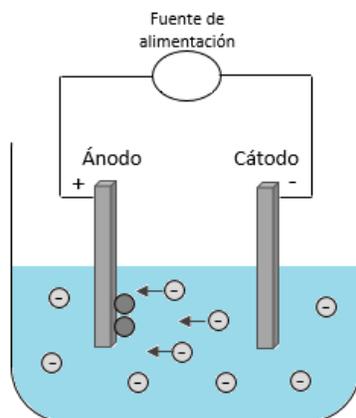


Figura 5. Dibujo esquemático del proceso de deposición electroforética.

Para que la deposición ocurra correctamente, se requiere en primer lugar que la suspensión sea estable; las partículas o macromoléculas deben estar dispersas y poder moverse libre e independientemente. Debido a que la estabilidad solo es necesaria durante la deposición (que suele durar pocos minutos), diversos mecanismos de estabilización pueden ser utilizados, como por ejemplo baja concentración de partículas, depleción de polímeros, copolímeros en bloque, adsorción de homo-polímeros, etc. [33].

Por otro lado, las partículas o macromoléculas deben adquirir carga superficial, lo que dependerá del equilibrio electroquímico del solvente. Una vez cargadas migrarán electroforéticamente, bajo la influencia del campo eléctrico, hacia el electrodo de carga opuesta. Por último, se depositarán en el electrodo formando el recubrimiento. Debido a que existen diversos mecanismos tanto para la estabilización como para la desestabilización de las partículas, no hay un mecanismo único de EPD.

Hay una serie de factores que influyen y deben ser considerados al realizar una deposición electroforética, se los divide en dos grupos: los parámetros de la suspensión y los del proceso. Los primeros incluyen: tamaño de partícula, potencial z , constante dieléctrica, viscosidad, concentración de sólidos, conductividad y estabilidad de la suspensión. Una vez que esos parámetros se fijaron, se procede a definir los parámetros relacionados con el proceso, que incluyen: tiempo de deposición, corriente o voltaje aplicado y conductividad del sustrato [34].

Las deposiciones pueden realizarse a voltaje constante o a corriente constante. En el primer caso, el potencial entre los electrodos se mantiene constante, pero al

aumentar la deposición, aumenta también la resistencia eléctrica. Por lo tanto, el potencial que induce la electroforesis disminuye y el movimiento de partículas también. En cambio, en EPD a corriente constante, el potencial que induce la electroforesis se mantiene durante el proceso porque al aumentar la resistencia eléctrica con la deposición, aumenta también la caída de potencial entre los electrodos. Por lo tanto, se evita la deposición limitada y los problemas de velocidad de deposición [35]. Se ha reportado que las deposiciones a corriente constante son más eficientes y proveen un mejor control del proceso que aquellas a voltaje constante [33], [36].

Este proceso permite la deposición de una amplia variedad de materiales como polímeros, cerámicos, metales y materiales compuestos [37], [32]. Además, requiere un equipamiento simple, de bajo costo, con tiempos de procesamiento relativamente bajos [32], [33].

Es una técnica de interés para aplicaciones biomédicas debido a la alta pureza de los depósitos generados y la deposición uniforme que se logra sobre sustratos de formas complejas o materiales porosos (como scaffolds) [37], [38]. Es importante para la ingeniería de tejidos y la fabricación de implantes porque permite la deposición de biopolímeros, proteínas y enzimas que son críticos para el desarrollo de recubrimientos con funcionalidad mejorada [37]. Esto se debe a que su deposición provee una plataforma para la incorporación de materiales funcionales como: agentes antimicrobiales, biocerámicos, vidrios bioactivos y drogas [37], [39]. Al ser un procesamiento que se realiza a temperatura ambiente, se pueden depositar proteínas y biomoléculas sin alterar su estructura [39].

1.6 Técnicas de caracterización

1.6.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDS).

La microscopía SEM es una técnica indispensable para la caracterización de los materiales, permite obtener imágenes de alta resolución de la superficie de las muestras, proporcionando información sobre su topografía. Consiste de microscopio electrónico de barrido que posee un filamento emisor de electrones que son acelerados y focalizados mediante una serie de lentes electrónicas sobre la muestra a analizar. Las señales originadas por la interacción entre el haz de electrones y la muestra, son registradas por detectores, para ser luego procesadas y visualizadas en el sistema final de observación (monitor o pantalla de computadora).

Por otro lado, la espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDS) es una técnica que permite la caracterización química/análisis elemental de materiales. Si se adosa un sistema EDS al microscopio electrónico de barrido, se pueden analizar los rayos X característicos que son emitidos por la muestra tras ser alcanzada por el haz de electrones de alta energía e identificar así los elementos que la componen.

1.6.2 Perfilometría

Un perfilómetro es un dispositivo que permite medir la rugosidad o perfil de una superficie. Un pin captador entra en contacto con la muestra y le transmite a un amplificador las irregularidades superficiales detectadas. En un ensayo de perfilometría se determinan además diferentes parámetros de la rugosidad superficial. Los más comúnmente utilizados son:

- Rugosidad media aritmética (R_a): definido como la media aritmética de los valores absolutos de las coordenadas de los puntos del perfil de rugosidad, en relación a la línea media dentro de la longitud de medición (L_m). Entendiendo línea media como la línea localizada en la parte media del perfil de rugosidad, de modo que la suma de las áreas por encima de ella sea exactamente igual a la suma de las áreas que están por debajo (ver Figura 6).

$$R_a = \frac{1}{L_m} \int_0^{L_m} |y| dx$$

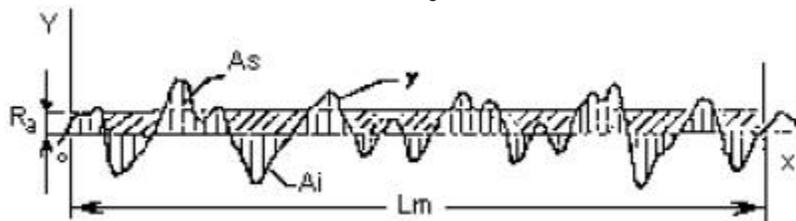


Figura 6. Representación de los parámetros utilizados en el cálculo de R_a [40].

- Rugosidad media (R_z): Es la media aritmética de los valores de rugosidad parcial Z_i correspondientes a cada uno de los cinco módulos integrantes de la longitud de medición (ver Figura 7). Se calcula según:

$$R_z = \frac{1}{5} (Z_1 + Z_2 + Z_3 + Z_4 + Z_5)$$

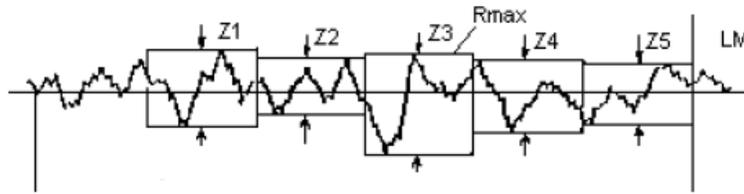


Figura 7. Representación de los parámetros utilizados en el cálculo de Rz [40].

En aplicaciones biomédicas, la rugosidad es un factor importante a considerar, debido a que influye en el comportamiento celular, la adhesión de bacterias y en la velocidad y la calidad de formación de nuevos tejidos que puedan estar en contacto estrecho con el implante. Una mayor rugosidad facilita el anclaje del hueso al implante, aunque también podría generar procesos inflamatorios indeseados. Si está en el rango de micrones o nanómetros mejora la adsorción de proteínas y la adhesión celular [41].

1.6.3 Ángulo de contacto (CA)

La mojabilidad de un material influye en la adhesión de proteínas y células sobre su superficie [42]. Una de las formas de medir la mojabilidad es por medio de ensayos de ángulo de contacto. Para ello, se deposita una gota de un líquido sobre la superficie del material a estudiar. La imagen de la gota se proyecta sobre el objetivo de un microscopio y con ayuda de un goniómetro se obtiene el ángulo de contacto.

1.6.4 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

En esta técnica se utiliza un espectrofotómetro que emite un haz de luz infrarroja desde una fuente de cuerpo negro incandescente. El haz pasa a través de un interferómetro donde tiene lugar una codificación espectral. La recombinación de haces con diferentes longitudes de trayectoria en el interferómetro crea una interferencia constructiva y destructiva denominada interferograma. El haz pasa por la muestra, que absorbe frecuencias específicas de energía. Luego, el detector mide la señal de interferograma para todas las frecuencias simultáneamente. Finalmente, mediante la transformada de Fourier se convierte la salida del detector en un espectro interpretable, que proporciona información de los grupos funcionales presentes en el material y permite asociarlos con compuestos.

Además, mediante FTIR se puede estudiar la cinética de algunas reacciones e identificar, por ejemplo, si ocurre la deposición de hidroxapatita o depósitos relacionados con ella tras la inmersión del material en solución biológica simulada.

1.6.5 Espectroscopia Ultravioleta visible (UV-vis)

Esta técnica implica la espectroscopia de fotones en la región de radiación ultravioleta-visible. El espectrofotómetro mide la intensidad de luz que pasa a través de una muestra (I), y la compara con la intensidad de luz antes de pasar a través de la muestra (I_0). Utiliza la luz en los rangos visible y adyacentes (el ultravioleta (UV) cercano e infrarrojo cercano). En esta región del espectro electromagnético, las moléculas se someten a transiciones electrónicas. La espectrometría de absorción mide transiciones desde el estado basal al estado excitado.

Las longitudes de onda de los picos de absorción pueden correlacionarse con los tipos de enlace en una determinada molécula, y son valiosos para determinar los grupos funcionales presentes en ella.

La ley de Beer-Lambert establece que la absorbancia (A) de una solución es directamente proporcional a la concentración de la solución:

$$A = \log \frac{I}{I_0} = \epsilon c L$$

Donde L es la longitud de ruta a través de la muestra y c la concentración de las especies absorbentes. Para cada especie y longitud de onda, ϵ es una constante conocida como absorptividad molar o coeficiente de extinción. Por tanto, la espectrometría UV/VIS puede usarse para determinar la concentración de una solución. Para ello, es necesario saber con qué rapidez cambia la absorbancia con la concentración. Esto puede ser obtenido a partir de referencias, o se lo puede determinar a partir de una curva de calibración, para mayor exactitud.

La espectrometría UV/Vis se utiliza habitualmente en la determinación cuantitativa de soluciones de iones metálicos de transición y compuestos orgánicos muy conjugados [43].

1.7 Ensayos electroquímicos

El conocimiento y evaluación del proceso corrosivo que tiene lugar en los distintos biomateriales dentro del organismo es un factor esencial en el diseño de implantes, no sólo para aumentar su durabilidad sino para minimizar la posible liberación de iones metálicos [44].

Los ensayos electroquímicos son ampliamente utilizados para caracterizar el comportamiento a la corrosión de los materiales. Permiten evaluar de forma acelerada la respuesta del material en un entorno fisiológico. Además, en el caso de pinturas o recubrimientos, los ensayos electroquímicos ayudan a dictaminar su resistencia o degradabilidad.

La celda electroquímica está formada por tres electrodos (el de trabajo, el de referencia y un contraelectrodo) sumergidos en una solución biológica simulada, que es mantenida a 37 °C. La unidad de medición electroquímica permite cambiar el potencial de la muestra en la solución de manera controlada y registrar la corriente que fluye a medida que se polariza la muestra.

Dentro de los ensayos electroquímicos realizados en biomedicina, se destacan: la espectroscopia de impedancia electroquímica y las curvas de polarización potenciodinámicas.

1.7.1 Espectroscopia de impedancia electroquímica

En esta técnica, se aplica una perturbación senoidal de voltaje con una amplitud del orden de los milivoltios, se varía la frecuencia, y se mide la corriente que circula por el circuito formado. El equipo procesa las mediciones de potencial y corriente en el tiempo, dando como resultado una serie de valores de impedancia correspondientes a cada frecuencia estudiada:

$$Z(\omega) = \frac{E(t)}{I(t)} = \frac{E_0 \sin(\omega t)}{I_0 \sin(\omega t + \theta)} = Z_0 \frac{\sin(\omega t)}{\sin(\omega t + \theta)}$$

donde E_0 e I_0 son las amplitudes de las señales de potencial y corriente, ω es la frecuencia radial y θ es el ángulo de fase entre $E(t)$ y $I(t)$.

La impedancia, a su vez, puede ser expresada en términos de una parte real y una parte imaginaria según:

$$Z(\omega) = \frac{E(t)}{I(t)} = \frac{E_0 \exp(j\omega t)}{I_0 \exp(j\omega t - \theta)} = Z_0 \exp(j\theta) = Z' + Z''j$$

Existen dos representaciones gráficas de los resultados obtenidos:

- 1) Diagrama de Nyquist: se representa la parte imaginaria multiplicada por -1 ($-Z''$) vs la parte real (Z').
- 2) Diagramas de Bode: se representan el logaritmo del módulo de la impedancia ($\log |Z|$) y el desfase (θ) en función del logaritmo de la frecuencia ($\log \omega$).

En muchos materiales y sistemas electroquímicos la impedancia varía con la frecuencia del potencial aplicado en una forma que está relacionada con las propiedades de dichos materiales. Esto se debe a la estructura física del material, a los procesos electroquímicos que tengan lugar, o a una combinación de ambos.

Por consiguiente, si se hace una medida de impedancias en un rango de frecuencias adecuado, es posible relacionar los resultados con las propiedades físicas y químicas de los materiales y sistemas electroquímicos [45]. La interpretación del espectro de impedancias requiere la selección de un modelo eléctrico apropiado que se ajuste a los datos experimentales.

La principal diferencia con el resto de técnicas electroquímicas es que la perturbación del sistema a estudiar se realiza mediante corriente alterna en lugar de continua. La mayor ventaja es la posibilidad de medir procesos separados que ocurren en el mismo material en función de la constante de tiempo de cada uno de ellos, y obtener valores como el de la resistencia del recubrimiento. Esto hace que sea una técnica muy utilizada para la evaluación de recubrimientos protectores, ya que proporciona información adicional a la obtenida por técnicas basadas en corriente continua. Además, es un método no destructivo, ya que habitualmente se aplica una pequeña perturbación (± 10 mV respecto del potencial de corrosión) [46].

1.7.2 Curvas de polarización potenciodinámicas

Se obtienen mediante un ensayo destructivo que consiste en el registro de la intensidad de corriente que circula a través del sistema electroquímico de trabajo, cuando se impone sobre él un barrido de potenciales. La velocidad del barrido de potenciales ha de ser lo suficientemente lenta como para permitir el intercambio de cargas que se produce en la interface del material. Para una mayor comprensión del comportamiento, suele invertirse el barrido luego de alcanzar un potencial o corriente determinados. En las curvas obtenidas mediante esta técnica es posible identificar el potencial de corrosión, potencial de picado o de ruptura, procesos de pasivación y transpasivación (ver *Figura 8*).

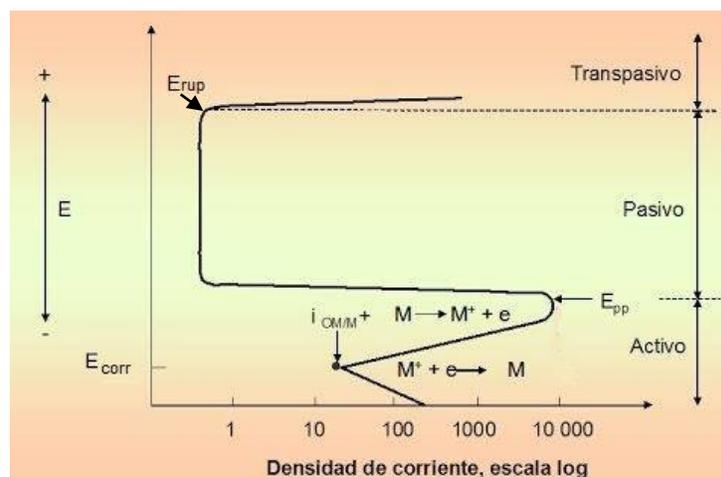


Figura 8. Representación de una curva de polarización de un metal que presenta un rango de pasividad.

1.8 Viabilidad y proliferación celular

La viabilidad celular es una medida de la proporción de células vivas sanas dentro de una población.

La proliferación celular hace referencia a un aumento en el número de células debido a la división celular (citocinesis), que ocurre como el paso final del ciclo celular. Las células sanas proliferan activamente, mientras que las células detenidas, senescentes o muertas no lo hacen.

Los ensayos de viabilidad y proliferación celular de un biomaterial son de suma importancia para la reparación de tejidos. Pueden proporcionar información relevante sobre la idoneidad de las modificaciones de la superficie, la arquitectura tridimensional, el transporte de oxígeno, la compatibilidad del producto de degradación y muchos otros aspectos del material o la estructura. Favorecer la adhesión y proliferación celular resulta imprescindible para lograr una integración con el tejido huésped. Para evaluar estos factores, en primer lugar, se realizan ensayos *in vitro* mediante cultivos celulares y posteriormente se procede a estudiar implantes en animales.

Los cultivos de células pueden definirse como en un sistema formado por células provenientes de un órgano o un tejido, normal o tumoral, mantenidas en medios de cultivo de composición química definida y en condiciones de temperatura, pH, aireación y humedad controladas. De esta forma se asegura su supervivencia y multiplicación, manteniendo todas sus funciones metabólicas de una manera semejante a las que tenían en el huésped.

En general, los ensayos de viabilidad celular proporcionan una lectura de la salud celular mediante la medición de la actividad metabólica, el contenido de adenosín trifosfato (ATP) o la integridad de la membrana celular. Los ensayos de proliferación celular pueden controlar el número de células a lo largo del tiempo, el número de divisiones celulares, la actividad metabólica o la síntesis de ADN. El recuento de células usando tintes de viabilidad como azul tripán o Calceína-AM puede proporcionar tanto la tasa de proliferación como el porcentaje de células viables [47], [48], [49].

2. OBJETIVOS

El presente trabajo tiene como objetivo general obtener, mediante deposición electroforética, recubrimientos a base de zeína y biovidrio sobre acero de uso quirúrgico, para ser utilizado en implantes permanentes. Se espera que el recubrimiento tenga características biocompatibles, bioactivas y antibacteriales y que no modifique negativamente la resistencia a la corrosión del acero.

Los objetivos específicos del trabajo son:

- Optimizar los parámetros de EPD para generar recubrimientos homogéneos, continuos y sin defectos.
- Caracterizar la superficie de las muestras mediante distintas técnicas.
- Estudiar la respuesta *in vitro* inorgánica de los recubrimientos mediante inmersión en solución fisiológica simulada (SBF) por diversas técnicas.
- Analizar la respuesta a la corrosión de los materiales generados mediante ensayos electroquímicos en condiciones simuladas.
- Estudiar la liberación de iones *in vitro* de los recubrimientos que contienen biovidrio dopado con cobre, y evaluar su performance antibacteriana.
- Evaluar la viabilidad/proliferación celular en los recubrimientos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales de partida

3.1.1 Sustratos metálicos

Se utilizó acero inoxidable AISI 316L (ThyssenKrupp AG, Essen, Alemania) de 0.2 mm de espesor como sustrato. Su composición se detalla en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición química del acero inoxidable AISI 316L en porcentaje en peso.

C	Si	Mn	P	S	N	Cr	Mo	Ni	Fe
≤0.030	≤1.00	≤2.00	≤0.045	≤0.015	≤0.11	16.50-18.50	2.00-2.50	10.00-13.00	balance

Para los ensayos biológicos se emplearon discos de acero inoxidable AISI 316L (Advent Research Materials, Inglaterra) de 1.25 cm de diámetro.

3.1.2 Vidrios bioactivos

Se utilizaron dos vidrios bioactivos: 45S5 y 45S5 dopado con cobre, de aquí en adelante serán nombrados como BG y BG-Cu respectivamente. Sus composiciones se encuentran detalladas en la Tabla 2.

Tabla 2. Composiciones de los vidrios bioactivos en porcentaje en peso.

	SiO ₂	Na ₂ O	CaO	P ₂ O ₅	CuO
BG	45.0	24.5	24.5	6.0	0.0
BG-Cu	45.0	24.5	22.0	6.0	2.5

El vidrio bioactivo 45S5 BG con un tamaño medio de partícula de 2 µm fue comprado en Schott AG (Alemania).

Para obtener el vidrio bioactivo 45S5 BG dopado con cobre se procedió según bibliografía [10]. Se mezcló óxido de silicio (SiO₂), carbonato de sodio (Na₂CO₃) y carbonato de calcio (CaCO₃) provenientes de Merck, Darmstadt, Alemania con fosfato tricálcico (Ca₃(PO₄)₂) y carbonato de cobre (CuCO₃.Cu(OH)₂) provenientes de Sigma-Aldrich, Alemania. Se fundió y homogeneizó la mezcla a 1450 °C durante 45 min en un crisol de platino. Posteriormente se realizó un fritado, se trituro el vidrio

obtenido en una trituradora de mandíbula y se lo molió en un molino planetario hasta obtener un tamaño final de partícula de $d_{50} = 5 \mu\text{m}$. Debe destacarse que la distribución de tamaño de partícula obtenida para este biovidrio es mucho más ancha que la correspondiente al biovidrio BG.

3.2 Recubrimientos

3.2.1 Preparación de sustratos

Se cortó el acero inoxidable AISI 316L en muestras de 30 x 15 mm.

Para asegurar que la superficie de los sustratos estuviera limpia se los sumergió en acetona durante 10 minutos en ultrasonido y posteriormente se los secó con aire comprimido.

3.2.2 Preparación de las suspensiones

Tres suspensiones distintas fueron utilizadas para recubrir los sustratos metálicos: 1) solución de zeína, 2) suspensión de BG, 3) suspensión de BG-Cu.

Solución de zeína

Se preparó una solución de glicerol (Sigma-Aldrich, Alemania), etanol con 99% de pureza (Merk KGaA, Darmstadt, Alemania) y agua. Se agregó zeína (Z3625) en polvo (Sigma-Aldrich, Alemania) en las cantidades indicadas en la *Tabla 3*. Finalmente se agitó la mezcla por medio de un agitador y buzo magnético hasta alcanzar la disolución total de la zeína.

Tabla 3. Composición de la solución en porcentaje en peso.

Etanol	Agua	Zeína	Glicerol
64	25	10	1

Suspensión de BG y BG-Cu

A la solución de zeína se le añadieron 10 g/L de vidrio bioactivo o vidrio bioactivo dopado con cobre para obtener las suspensiones de BG y BG-Cu respectivamente. Se continuó agitando la mezcla en el agitador con buzo magnético durante 5 min para lograr una dispersión homogénea de las partículas. Las suspensiones obtenidas fueron colocadas en un baño ultrasónico durante 10 min.

3.2.3 Deposición electroforética (EPD)

Los recubrimientos fueron obtenidos mediante la técnica de deposición electroforética (EPD) a corriente constante. Los electrodos fueron colocados con una separación de 10 mm y sumergidos en una de las tres suspensiones mencionadas anteriormente. El área de deposición en todos los casos fue de 15 x 15 mm². Una misma suspensión se utilizó para recubrir dos o tres muestras.

Con el objetivo de obtener recubrimientos de mayor espesor, menor porosidad y con la menor cantidad de fisuras posibles, se estudiaron sistemas a distintas corrientes y tiempos de deposición.

Los sustratos fueron pesados antes y después de realizar la EPD.

3.3 Inmersión en solución fisiológica simulada (SBF)

3.3.1 Preparación de la SBF

En primer lugar, se colocaron 250 ml de agua destilada en un matraz y se añadió 1 ml de ácido clorhídrico concentrado. Luego se agregaron los reactivos mencionados en la *Tabla 4* en el orden y las cantidades indicadas.

Tabla 4. Cantidad de reactivos en gramos para obtener un volumen final de 1L de SBF.

NaCl	KCl	CaCl ₂ .2H ₂ O	MgCl ₂ .6H ₂ O	K ₂ HPO ₄	NaHCO ₃	TRIS*
8.053	0.224	0.368	0.305	0.174	0.353	6.057

*tris(hidroximetil)aminometano

Finalmente se adicionó ácido clorhídrico concentrado hasta obtener una solución con un pH de 7.3 ± 0.05 y se agregó agua destilada hasta llegar a un volumen final de 1 litro.

3.3.2 Inmersión en SBF

Las muestras fueron cortadas en 15 x 15 mm. Se colocó una cinta polimérica aislante sobre la cara no recubierta de las muestras, de modo que solo el recubrimiento estuviera en contacto con la solución. De acuerdo con la norma ISO 23317:2007(E) ("Implants for surgery-In vitro evaluation for apatite-forming ability of implant materials") se sumergió cada muestra en 22.5 ml de SBF y se las dejó en una estufa a 37 °C durante 3 y 7 días.

3.4 Caracterización del sustrato y los recubrimientos

3.4.1 Microestructura del acero inoxidable

Se utilizó Vilella como reactivo de ataque para revelar la microestructura del acero inoxidable AISI 316L. Su composición se encuentra detallada en la *Tabla 5*.

La muestra fue sumergida en el reactivo durante 4 min y posteriormente enjuagada con agua destilada. Una vez seca se la observó en el microscopio óptico Leica DMI3000 M.

Tabla 5. Composición del reactivo de ataque Vilella.

Ácido pícrico	Ácido clorhídrico	Etanol
1 g	5 ml	100 ml

3.4.2 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Para evaluar la morfología superficial de los tres tipos de recubrimientos se realizó una microscopía electrónica de barrido (SEM). Se buscó identificar bajo qué condiciones (tiempo-corriente) las deposiciones obtenidas presentaban menos fisuras y/o defectos.

Para hacer conductivas las muestras, se las pulverizó con oro en atmósfera de argón utilizando un Sputter Coater (Q150T, Quorum Technologies Ltd., Darmstadt, Alemania). Luego, se las observó mediante microscopía SEM (Auriga 0750 Zeiss, Jenna, Alemania). Además, para asegurar la presencia de las partículas de biovidrio en los recubrimientos, se realizó un análisis de espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDS) con el espectrómetro LEO 435VP, Carl Zeiss AG.

3.4.3 Sección transversal

Con el objetivo de observar la sección transversal de los distintos recubrimientos y poder estimar su espesor, muestras de cada condición fueron incluidas en resina epoxi. Una vez endurecida la resina, fueron cortadas y pulidas hasta granulometría 2000 para luego ser observadas en el microscopio óptico Leica DMI3000 M. Finalmente, se utilizó la herramienta ImageJ para tomar las medidas de espesor.

3.4.4 Perfilometría

Se midió la rugosidad de los recubrimientos utilizando el rugosímetro Surtronic 3+ de Taylor-Hobson, con una aproximación de 0.01 μm . Se realizó un barrido lineal de 4mm de longitud, tomando 8000 puntos.

Por otro lado, se midió la altura del escalón formado en la muestra, que divide el sustrato desnudo del sustrato recubierto, para determinar su espesor.

3.4.5 Ángulo de contacto (CA)

Se utilizó un goniómetro Ramé-Hart 100-25-A para calcular el ángulo de contacto de los recubrimientos. En cada muestra se depositó agua destilada y se tomaron 10 mediciones por segundo del ángulo de contacto. El procedimiento se repitió varias veces por cada muestra.

3.4.6 Tape test

El nivel de adhesión de los distintos recubrimientos se evaluó cualitativamente mediante el ensayo tape test, de acuerdo a lo establecido en la norma ASTM D3359-09 (Standard Test Methods for Measuring Adhesion by Tape Test). Se siguieron los lineamientos propuestos para el método B, utilizado para recubrimientos de espesores menores a 125 μm .

Sobre cada muestra se realizó con un bisturí una cuadrícula de seis líneas paralelas en ambas direcciones, distanciadas 1 mm entre sí. Se aplicó una cinta Doble A C903 por encima ejerciendo presión suavemente. Luego de 90 ± 30 segundos se la retiró rápidamente formando un ángulo cercano a 180° respecto de la muestra.

Mediante inspección visual y por medio del microscopio óptico se observó la superficie luego de la remoción de la cinta. Se la comparó con las imágenes presentes en la norma para evaluar el nivel de daño del recubrimiento y poder clasificar su nivel de adhesión.

3.4.1 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR-ATR)

Para obtener los espectros FTIR de los distintos recubrimientos, se realizó un barrido de 400 a 4000 cm^{-1} en el espectrómetro Nicolet 6700 (Thermo Scientific, EE.UU.). Se ensayaron las muestras luego de 0, 3 y 7 días de inmersión en SBF a 37°C .

3.4.2 Microscopía óptica

Los recubrimientos obtenidos mediante las distintas condiciones estudiadas fueron observados y fotografiados con un microscopio óptico (Leica DMI3000 M). Se tomaron imágenes de las muestras sin inmersión y tras 3 y 7 días de inmersión en SBF a 37 °C.

3.4.3 Procesamiento digital de imágenes (PDI)

Mediante técnicas de procesamiento digital de imágenes se midió el área cubierta en las muestras recubiertas con zeína y se caracterizaron los poros presentes. Para ello, en primer lugar, se aplicó la técnica de realce denominada “estiramiento de contraste”, la cual permitió mejorar aspectos relacionados al contraste, ruido, distorsiones, luminosidad y falta de nitidez [50], [51]. A la imagen resultante se le realizó un umbralamiento con un valor umbral “u” [52], definido por el método de Otsu, el cual permitió obtener el mayor porcentaje de los poros del recubrimiento en la imagen binaria de salida.

Luego, se llevó a cabo un filtrado de los objetos de interés e identificación sobre la imagen binaria obtenida previamente. Para eliminar el ruido, producto de la binarización, sin alterar la forma de los poros se aplicaron en forma secuencial los operadores morfológicos “area opening” y “area closing” [53], [54]. Cada componente conectada, que se corresponde con las zonas descubiertas de la imagen, fue identificada por su centro de masa [50] y se la etiquetó con un valor entero.

Finalmente, se procedió a la caracterización y estimación de parámetros de forma y análisis de la distribución de tamaño. Se midieron los diámetros máximos (eje mayor) y mínimos (eje menor) de cada poro presentes en la imagen binaria (ver *Figura 9*). La longitud del eje mayor se encuentra calculando la distancia de píxeles entre cada combinación de píxeles de borde en el límite de la elipse y encontrando el par $((x_1, y_1)$ y $(x_2, y_2))$ con la longitud máxima. Con esta información fue posible determinar el factor de forma que caracteriza la esfericidad y obtener el histograma correspondiente a la distribución de tamaño de los mismos considerando el diámetro máximo. El proceso se repitió con imágenes de diferentes muestras. La distribución del tamaño de las zonas descubiertas se define como la función discreta:

$$p(d_k) = n_k$$

donde d_k es el k -ésimo diámetro medido y n_k es el número de partículas con ese eje mayor.

De forma similar, a partir del área de cada una de las zonas descubiertas se determinó el porcentaje de área cubierta.

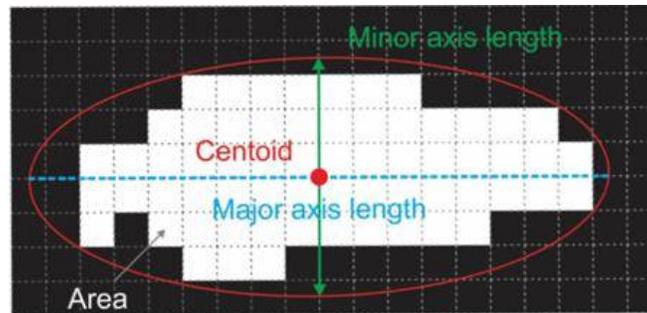


Figura 9. Medición de diámetros máximo y mínimo de los poros presentes en el recubrimiento de zeína.

3.5 Ensayos electroquímicos

Para evaluar si la presencia de los recubrimientos modifica la resistencia a la corrosión del sustrato metálico, se llevaron a cabo ensayos electroquímicos en las unidades electroquímicas Solartron 1280 (UK) y Gamry Instruments Reference 600 (EE.UU.).

Se ensayaron muestras luego de 0 y 7 días de inmersión en SBF a 37 °C. Se utilizó una celda de vidrio que contenía: un electrodo de referencia de Calomel Saturado (SCE), un contraelectrodo de platino y una muestra sumergidos en SBF a 37 °C. La muestra a su vez se encontraba dentro de una celda de polioximetileno con un área expuesta de 0.78 cm².

En primer lugar, se midió el potencial a circuito abierto (OCP) hasta su estabilización, luego se realizó la espectroscopía de impedancia y finalmente la curva de polarización potenciodinámica.

3.5.1 Espectroscopía de Impedancia Electroquímica (EIS)

Se realizó un barrido de frecuencias de 20 kHz a 0.05 Hz, modulando el potencial ± 15 mV respecto del potencial de corrosión medido en OCP. Las curvas obtenidas fueron modeladas con circuitos eléctricos equivalentes mediante el software ZView.

3.5.2 Curvas de polarización potenciodinámicas

Se volvió a medir el potencial de circuito abierto hasta su estabilización. Luego se procedió a obtener las curvas de polarización. Se partió de un potencial 0.15 V debajo del potencial de corrosión hasta llegar a 1 V, empleando una velocidad de barrido de 2 mV/s. Al alcanzar el potencial máximo fijado, el barrido de potenciales se invirtió para completar la curva.

3.6 Evaluación de actividad antibacterial

Se esterilizaron muestras recubiertas con zeína-BG y zeína-BG-Cu mediante UV durante 30 minutos de cada lado. Los ensayos se realizaron por duplicado.

Para los ensayos antibacteriales se utilizaron dos cepas celulares: una gram positiva (*Staphylococcus aureus*) y otra gram negativa (*Escherichia coli*). Se colocaron los cultivos de *E.coli* y *S.aureus* en medio Luria-Bertani (LB) y se diluyeron en LB diluido 1/5 de modo de tener una densidad óptica (OD) inicial igual a 0,015. Se traspasaron 2 ml de estas diluciones a tubos Falcon (estériles) de 45 ml. Cada muestra fue colocada en uno de los tubos de modo de quedar semi-sumergida en el medio con bacterias. Se incubaron a 37°C con agitación y se midió la OD luego de 0, 3, 4, 5, 24 y 48 horas. Al finalizar ese tiempo, se descartó el cultivo remanente, se lavaron los tubos y materiales con agua destilada y se agregaron 3 ml de solución de cristal violeta 0,1% para teñir biofilm. Se incubó los materiales durante 10 min, se los lavó y fotografió. Finalmente, se disolvió el cristal violeta retenido con acético 30% y se midió su absorbancia.

3.7 Evaluación de liberación de iones *in vitro*

La liberación de iones cobre se evaluó mediante espectrofotometría UV-VIS. Para ello, se prepararon soluciones de agua bidestilada y nitrato cúprico a distintas concentraciones. Se mezclaron 900 µl de cada solución con 300 µl de etilendiamina para complejar el cobre.

Por otro lado, se sumergió una muestra recubierta con zeína y BG-Cu en agua bidestilada y se la dejó en inmersión a 37 °C durante 13 días. Pasado ese tiempo, se tomaron 900 µl del agua bidestilada y se añadieron 300 µl de etilendiamina.

Finalmente, se midió la absorbancia de las soluciones entre 400 y 800 nm empleando un espectrofotómetro UV-3600 Plus (Shimadzu, Japón).

3.8 Evaluación de la viabilidad celular

Para la evaluación biológica se utilizaron células C2-C12. Se las mantuvo a 37°C en una incubadora de CO₂ en un medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con 10% en volumen de suero fetal bovino (FBS, Sigma-Aldrich, Alemania) y 1% en volumen de antibióticos (penicilina-estreptomina).

Las células fueron cultivadas en frascos de cultivo hasta la confluencia, se retiró el medio, se las lavó dos veces con solución salina tamponada con fosfato, conocida como PBS (Gibco, Alemania), y se agregaron 3 ml de tripsina/EDTA (Gibco, Alemania). Posteriormente se las llevó a la incubadora de CO₂ a 37 °C durante 2 min, se añadió medio de cultivo y se las centrifugó durante 5 min a 1400 rpm.

Luego del centrifugado, se retiró el sobrenadante y se añadió medio de cultivo nuevamente. Se guardó el frasco de cultivo en la incubadora de CO₂ a 37 °C para su posterior uso.

Para contar la cantidad de células presentes se retiraron 100 µl del medio con células y se los mezcló con 100 µl de azul tripano (trypan blue). Este último permite distinguir las células muertas de las viables, para evitar contabilizarlas. Por medio de un microscopio óptico y una cámara de Neubauer se contó la cantidad de células viables.

Por otro lado, las muestras fueron esterilizadas por calor seco. Se las colocó en un recipiente de vidrio, que fue recubierto con papel de aluminio, y se las mantuvo a 130 °C durante 2 hs en el horno (Naberthem, Alemania). Luego se las traspasó a una microplaca estéril de 24 pocillos para cultivo celular. Se añadieron 50000 células en cada pocillo con 700 µl de medio de cultivo.

3.8.1 WST-8

La viabilidad de las células se evaluó mediante un ensayo WST-8 (Sigma-Aldrich, Alemania) luego de 1, 3 y 7 días de cultivo.

Se retiró el medio de cultivo en el que se encontraban las muestras y se las lavó con PBS para remover los restos de medio que pudieran quedar. Se preparó una solución 1% WST y 99% DMEM incoloro y se añadieron 500 µL de la solución sobre cada muestra. Posteriormente se las incubó a 37 °C durante 3 hs en la incubadora de CO₂.

Se retiraron 200 µL de la solución que cubría cada muestra y se los traspasó a una microplaca de 96 pocillos. Se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de microplacas (PHOmo, China).

3.8.2 Microscopía de fluorescencia

Se retiró el medio de cultivo en el que se encontraban las muestras, se las lavó con PBS y se las traspasó a una microplaca de 12 pocillos. Se añadieron 2 ml de Fluofix-PBS para fijar las células a la superficie de las muestras. Luego de 15 minutos se volvieron a lavar las muestras con PBS, se permeabilizaron y se añadió una solución fluorescente de isotiocianato (Phalloidin, Sigma–Aldrich, USA) para colorear el citoesqueleto de las células. Las muestras fueron dejadas una hora en oscuridad. Una vez transcurrido el tiempo necesario se agregó 1 µg de DAPI (Sigma–Aldrich, USA) por ml de PBS durante 5 minutos para colorear el núcleo de las células. Las muestras fueron cubiertas con PBS y dejadas en la oscuridad para su posterior uso.

Finalmente fueron observadas por medio de un microscopio de fluorescencia (Axio Scope A1, Carl-Zeiss, Jena, Alemania).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización del sustrato

En la *Figura 10* se muestran las imágenes del sustrato luego de ser atacado con el reactivo Vilella. El acero 316L es un acero austenítico, las zonas oscuras que se ven en la metalografía corresponden a ferrita delta. Si bien con el reactivo no se marcaron los bordes de grano, pueden distinguirse ciertos límites de los mismos. No se observan carburos precipitados, principalmente debido al bajo contenido de carbono que poseen los aceros 316L en su composición. Puede verse una distribución medianamente homogénea del tamaño de grano, sin ninguna orientación o deformación preferencial de los mismos.

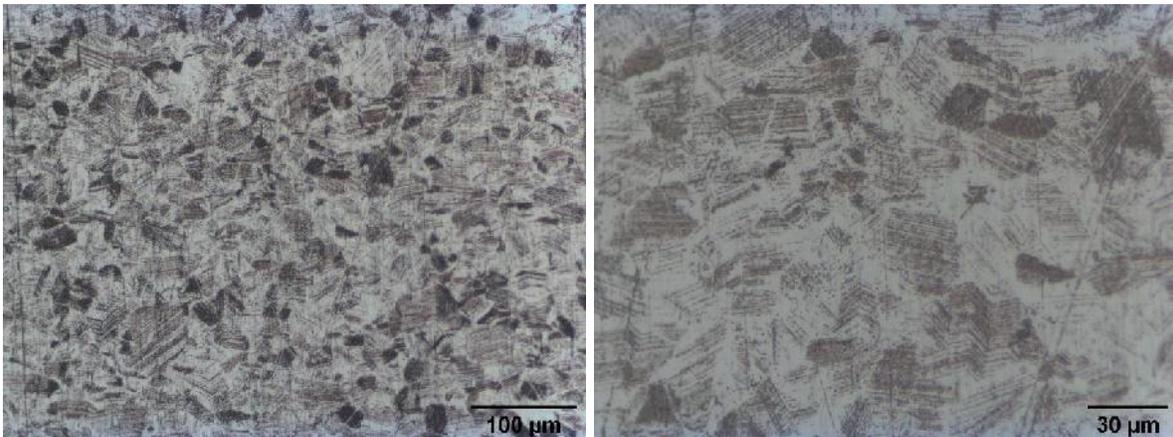


Figura 10. Microestructura del sustrato a 200x y 500x luego del ataque con Vilella.

A partir de los ensayos de perfilometría realizados, se obtuvieron valores de rugosidad $R_a = 0.08 \pm 0.03 \mu\text{m}$ y $R_z = 0.52 \pm 0.10 \mu\text{m}$. Estos resultados son acordes con la superficie de un acero inoxidable pulido con granulometría entre 1000 y 2000 grit comercial.

El valor del ángulo de contacto para el sustrato fue $92.6 \pm 0.1^\circ$.

4.2 Selección de condiciones de deposición

Para determinar las condiciones óptimas de deposición, es decir aquellas que generen recubrimientos más homogéneos, con menor porosidad y menos fisuras, se realizaron EPD a distintos tiempos y corrientes.

En primer lugar, se depositaron capas de zeína y zeína-BG a 20, 50, 80 y 100 mA durante 5 y 10 min. Durante el procedimiento se registraron los valores de voltaje alcanzados por el sistema.

En las deposiciones a bajas corrientes el voltaje se mantuvo cercano a 10-12 V, mientras que cuando se utilizó corrientes altas, se alcanzaron valores cercanos a 45-48 V. Según bibliografía [12] en casos en los que se ha utilizado el mismo sistema de partida para realizar EPD a voltaje constante, se ha reportado que los mejores resultados se obtuvieron a 10 V.

Se observó que, al utilizar corrientes más altas durante la EPD, las suspensiones que eran de color amarillo se tornaron de color marrón. Esto puede deberse a un cambio conformacional de las moléculas de zeína [55]. Según Cabra [56] una gran cantidad de cargas positivas en las moléculas de proteína puede conducir a un cambio conformacional de la estructura secundaria de α -hélice a β -hoja y espirales aleatorias. Un campo eléctrico elevado, que se aplica durante la EPD, puede influir en el campo eléctrico local alrededor de la proteína en combinación con las cargas de la propia proteína. Por tanto, puede producir un cambio conformacional de la estructura, lo que genera el cambio de color.

Mediante inspección visual se determinó que el recubrimiento de mejor calidad se obtuvo a 20 mA, la capa formada era mucho más homogénea y densa. A corrientes más altas la calidad disminuyó notablemente: las capas perdieron uniformidad e incluso llegó a corroerse el metal, como puede observarse en la *Figura 11*.

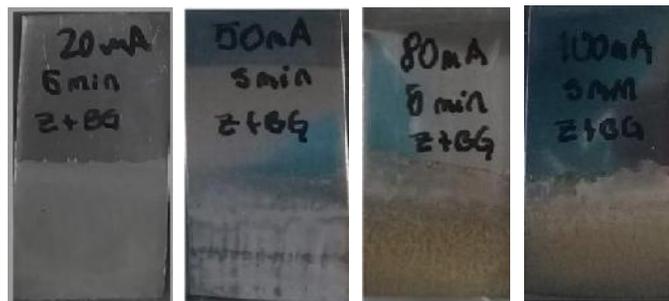


Figura 11. Recubrimientos de zeína-BG realizados por EPD durante 5 min a distintas corrientes.

Se procedió a realizar deposiciones electroforéticas de zeína y zeína-BG a bajas corrientes: 10 y 20 mA, durante 1, 3, 5, 7, 10 y 15 minutos. Se hicieron cinco muestras de cada condición. Los electrodos fueron pesados antes y después de las deposiciones para estimar en qué casos el espesor de la capa formada era mayor. En la *Figura 12* se detallan los pesos obtenidos. A pesar de que las barras de error son muy grandes, puede verse una tendencia a aumentar el espesor a mayores tiempos, especialmente en las EPD a 10 mA.

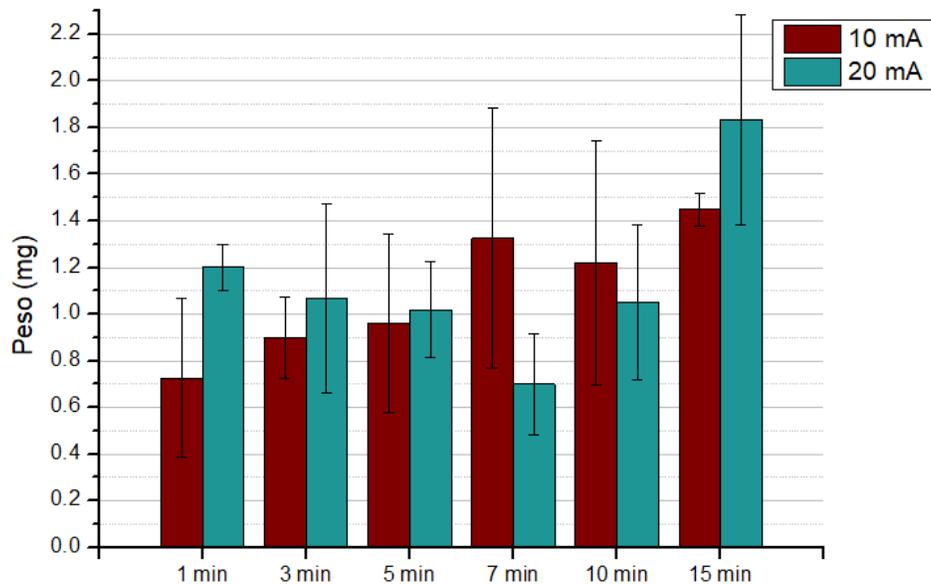


Figura 12. Pesos de recubrimientos de zeína-BG realizados por EPD a 10 y 20mA con distintos tiempos de deposición.

Las muestras sintetizadas fueron observadas mediante microscopía SEM y además se realizó un análisis EDS para asegurar la presencia de partículas de BG en las capas. En la *Figura 13* pueden verse los resultados del EDS, la existencia de Ca, Si y Na indica que hay partículas de BG en los recubrimientos.

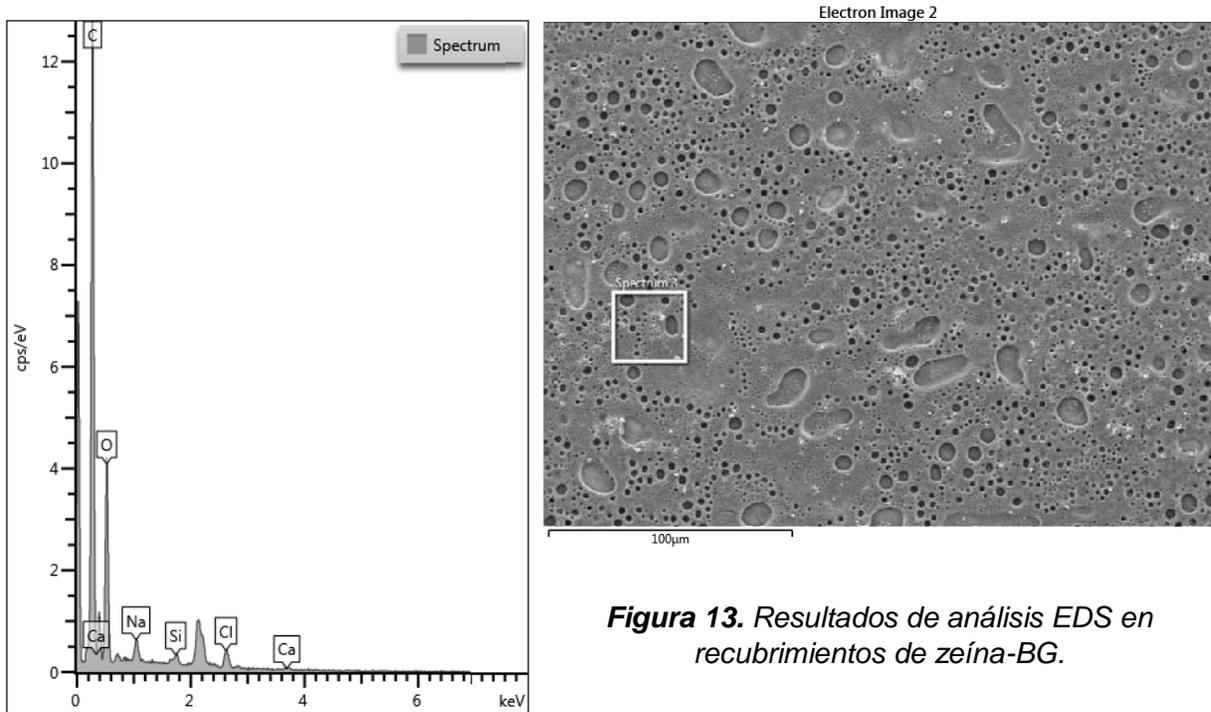
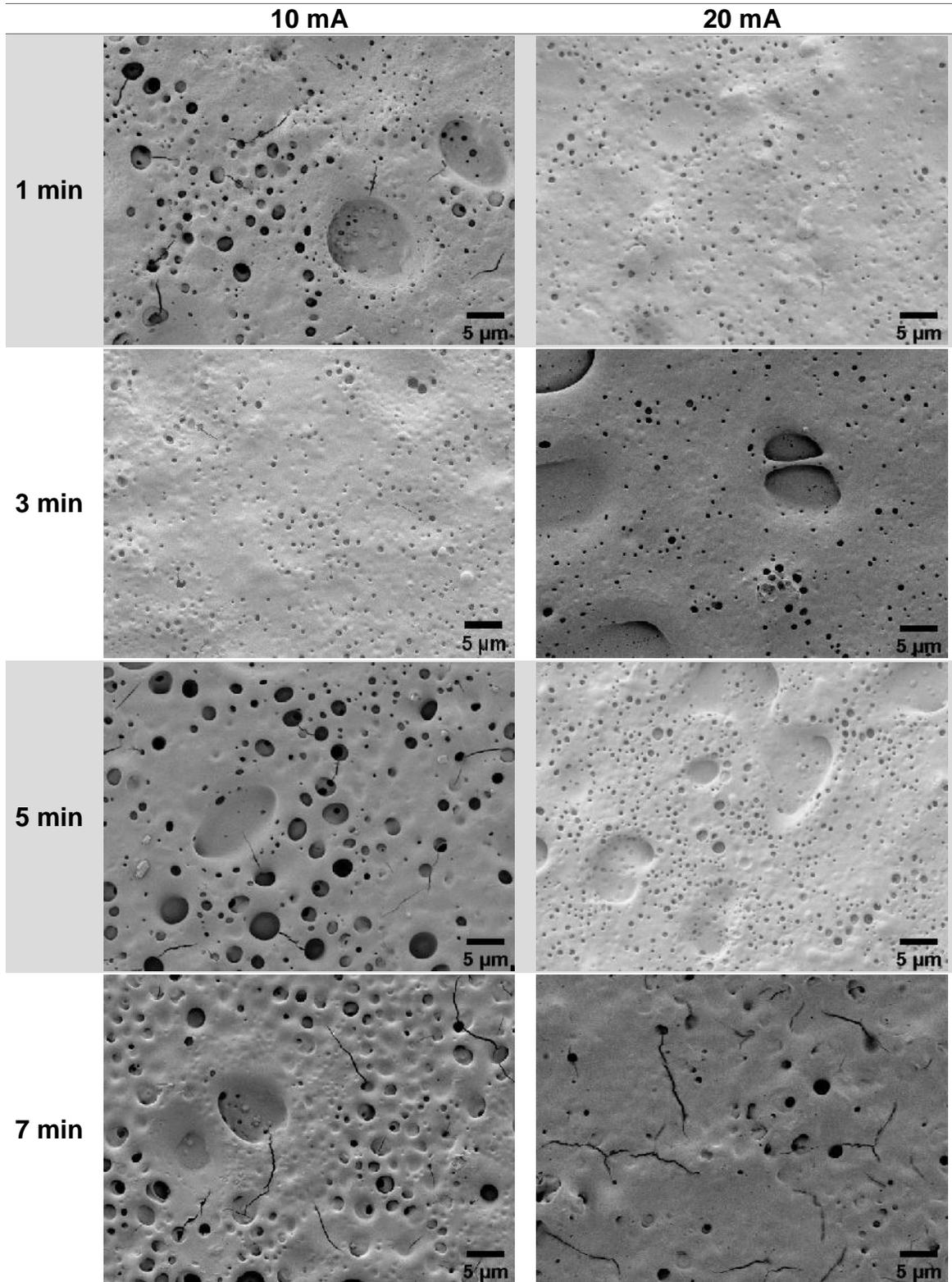


Figura 13. Resultados de análisis EDS en recubrimientos de zeína-BG.

En la *Figura 14* se presentan las imágenes SEM tomadas para las distintas condiciones estudiadas. Puede observarse que los recubrimientos más homogéneos y con menor cantidad de fisuras, poros y defectos se lograron con deposiciones a tiempos cortos, particularmente la de 10 mA en 3 min y la de 20 mA en 1 minuto.



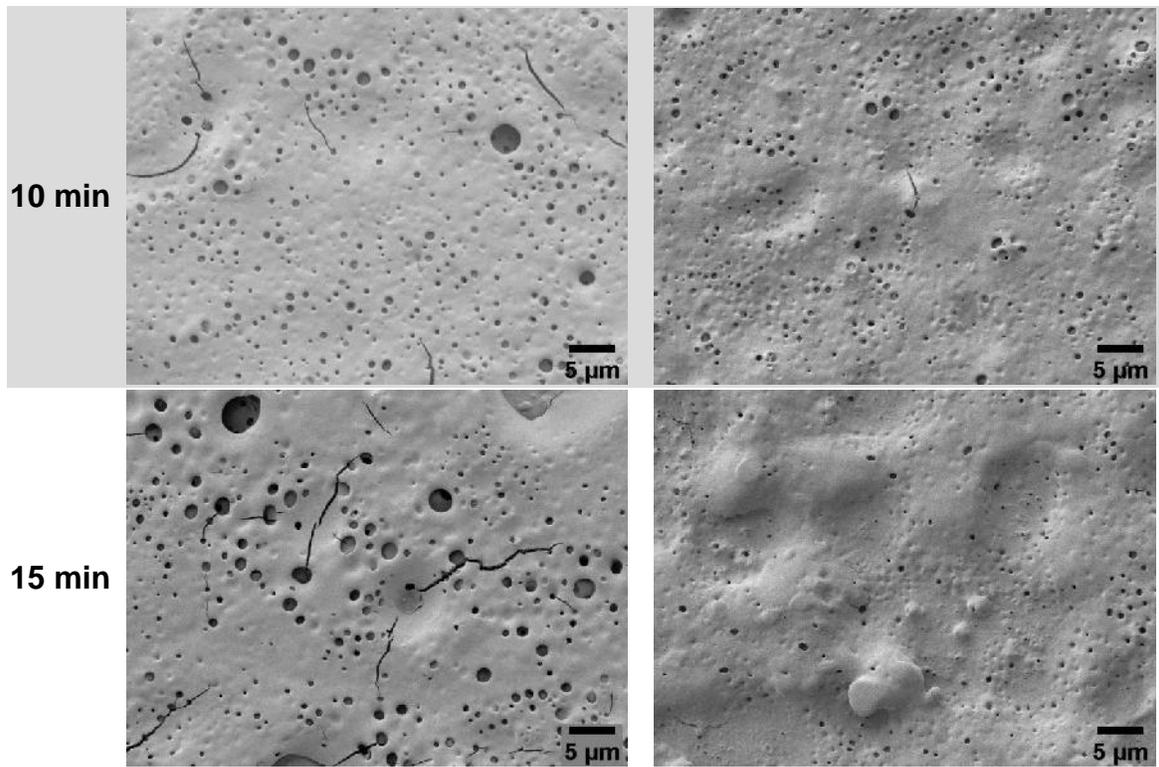


Figura 14. Imágenes SEM a 5000x de recubrimientos de zeína-BG obtenidos bajo distintas condiciones de EPD.

En base a los resultados obtenidos y principalmente a las imágenes SEM, se determinó que los mejores parámetros de deposición fueron: 20 mA y 1 minuto. En la *Figura 15* se muestra el recubrimiento obtenido bajo estas condiciones a menor aumento.

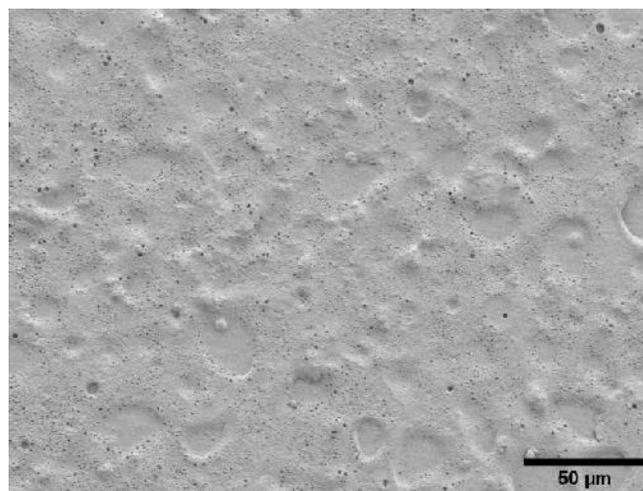


Figura 15. Micrografía SEM a 1000x del recubrimiento de zeína-BG obtenido por EPD a 20 mA durante 1 min.

4.3 Caracterización de los recubrimientos

4.3.1 Perfilometría y sección transversal

En la *Tabla 6* se muestran los resultados de las medidas de rugosidad R_a (valor medio de rugosidad) y R_z (profundidad de rugosidad media) del sustrato y de los distintos recubrimientos.

Tabla 6. *Parámetros de rugosidad R_a y R_z para distintas superficies.*

Superficie	R_a (μm)	R_z (μm)
Sustrato	0.08 ± 0.03	0.5 ± 0.1
Zeína	0.29 ± 0.10	1.8 ± 0.3
Zeína-BG	0.25 ± 0.02	2.4 ± 0.3
Zeína-BG-Cu	0.38 ± 0.07	3.0 ± 0.5

La rugosidad superficial presente en el sustrato se debe al proceso de pulido que se realiza sobre el acero cuando finaliza su fabricación.

La rugosidad de las muestras recubiertas se debe a la deposición no uniforme de las partículas sobre el sustrato durante la EPD, y a la distribución de tamaño que presentan.

Las partículas del vidrio bioactivo BG tienen un diámetro menor a las de BG-Cu (2 μm vs 5 μm) y presentan una distribución de tamaño mucho más estrecha (ver sección materiales y métodos). Al ser las partículas de tamaños similares, se espera mayor uniformidad en la capa formada y menor rugosidad.

En el caso del recubrimiento de zeína que no tiene partículas de biovidrio, la rugosidad puede deberse a una deposición no uniforme sobre el sustrato durante la EPD y a la presencia de fisuras, defectos y/o poros en la capa.

Por otro lado, continuando con la técnica de perfilometría, se intentó estimar el espesor de los recubrimientos. Para ello se trató de medir el escalón que se forma en las muestras, en la zona donde comienza la capa. En la *Figura 16* se muestra el gráfico obtenido para una de las mediciones, hacia la izquierda se encuentra el sustrato desnudo y hacia la derecha el recubrimiento. Como puede verse, hay una pendiente donde comienza la capa y no se forma un escalón bien definido separando una región de la otra.

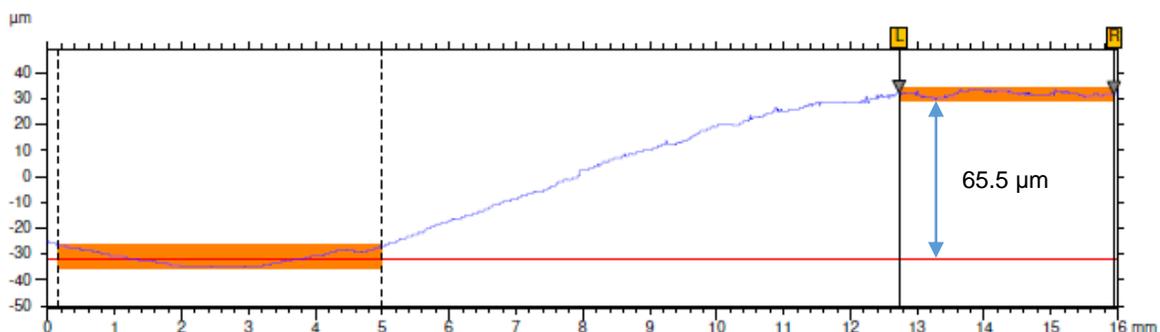


Figura 16. Perfil obtenido para estimación de espesor del recubrimiento de Z-BG-Cu.

En la *Tabla 7* se detallan los resultados obtenidos para cada recubrimiento. El espesor calculado para las muestras de zeína-BG-Cu resultó mucho mayor a los demás. Esto puede deberse al mayor tamaño de las partículas de vidrio bioactivo dopado con cobre en comparación a las de BG.

Tabla 7. Espesor de los recubrimientos medido por perfilometría.

Recubrimiento	Espesor (μm)
Zeína	10 ± 4
Zeína-BG	19 ± 6
Zeína-BG-Cu	70 ± 13

Sin embargo, debe tenerse en cuenta que realizar las mediciones por esta técnica presenta cierta complejidad y existen varios puntos a considerar, que pueden sumar errores. La curvatura o alabeo de las muestras, la ausencia de un escalón definido para la medida, la presencia de partículas en los recubrimientos, así como también una gran cantidad de poros (especialmente en el caso de la zeína) o fisuras generan espectros más ruidosos y dificultan la correcta lectura de las mediciones.

Por estos motivos, se calculó nuevamente el espesor de los recubrimientos, pero utilizando otro método: se observó la sección transversal de las muestras con un microscopio óptico. En la *Figura 17* puede verse la imagen de la sección trasversal de una de las muestras, donde se distingue claramente el sustrato (parte superior), el recubrimiento (parte central) y la resina donde fue incluida (parte inferior).

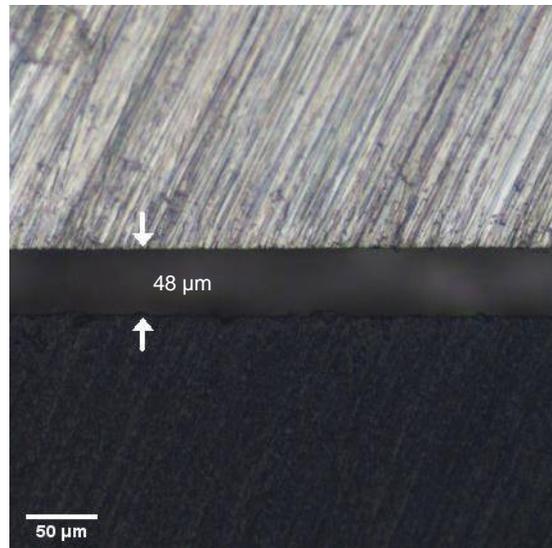


Figura 17. Sección transversal de muestra recubierta con zeína-BG.

Realizar medidas de espesor mediante esta técnica también presenta varias dificultades. Por un lado, cuando las muestras son incluidas deben quedar completamente perpendiculares a la superficie, si presentan un pequeño ángulo de inclinación, las medidas resultarán erróneas. Por otro lado, antes de observarlas en el microscopio las muestras deben ser pulidas, lo que puede generar desprendimiento o arrastre de material, así como dificultad para delimitar dónde comienza y dónde termina el recubrimiento.

En la *Tabla 8* se muestran los valores de espesor obtenidos. Puede verse que el correspondiente a la muestra recubierta con zeína-BG resultó bastante mayor a los de las demás. Esto puede deberse, o bien a que el espesor es efectivamente mayor para las muestras recubiertas con zeína-BG, o puede ser un error debido a las limitaciones propias de la técnica empleada.

Tabla 8. Medidas de espesor de los recubrimientos a partir de sección transversal.

Recubrimiento	Espesor (μm)
Zeína	30 ± 2
Zeína-BG	48 ± 1
Zeína-BG-Cu	31 ± 1

Luego de realizar las mediciones por ambos métodos, puede estimarse que los espesores de los recubrimientos con biovidrio se encuentran entre 20-70 μm . Es necesario mayor número de muestras para medir el espesor con los dos métodos

utilizados de manera estadísticamente significativa, y poder obtener valores más representativos de los recubrimientos obtenidos.

4.3.2 Ángulo de contacto (CA)

Otra caracterización de los recubrimientos consistió en medir el ángulo de mojado de cada uno de ellos. Es un parámetro importante a considerar porque influye en la adhesión de proteínas y células sobre la superficie [57]. Los valores obtenidos se muestran en la *Figura 18*.

El sustrato fue la superficie que exhibió el carácter más hidrofóbico dado por un ángulo de contacto alto, mientras que las muestras recubiertas presentaron valores menores. La zeína posee un carácter anfifílico y la adición de una fase inorgánica, en este caso los biovidrios, favorece su hidrofiliidad [21], disminuyendo en consecuencia el ángulo de contacto.

Menzies y Jones [57] han reportado que las superficies con ángulos de contacto entre 35 - 80 ° favorecen la adhesión de osteoblastos y que la misma se encuentra limitada en superficies altamente hidrofóbicas o altamente hidrofílicas. Por otro lado, según bibliografía [42], un ángulo de contacto de 55 ° provee condiciones óptimas para la adhesión y el crecimiento celular.

Por lo tanto, los resultados obtenidos indican que todas las muestras recubiertas generarían un entorno amigable para la adhesión celular, en especial el recubrimiento de zeína-BG-Cu por presentar el valor de ángulo de mojado más cercano al "óptimo". Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la adhesión celular dependerá también de otros factores.

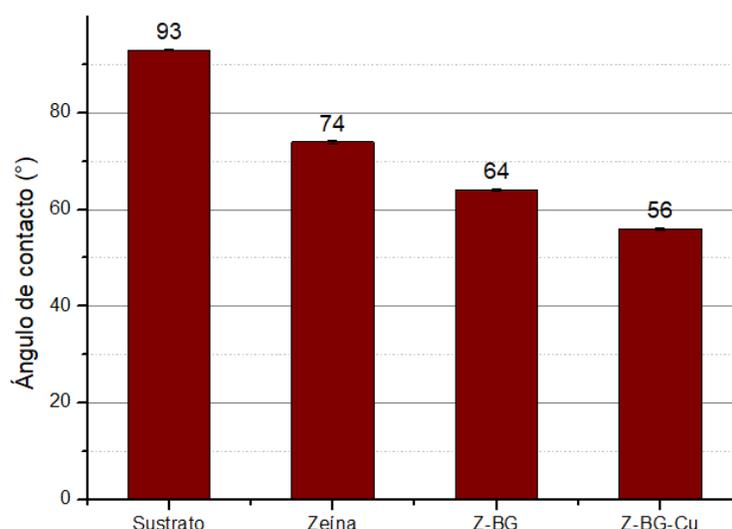


Figura 18. Ángulo de contacto del sustrato y los recubrimientos.

4.3.3 Tape test

Mediante inspección visual y microscopía óptica se observó la superficie de las muestras luego de la remoción de la cinta.

Ninguno de los recubrimientos presentó daños, desprendimientos ni roturas tras la realización del ensayo. En la *Figura 19* puede verse una de las muestras antes y después del tape test.

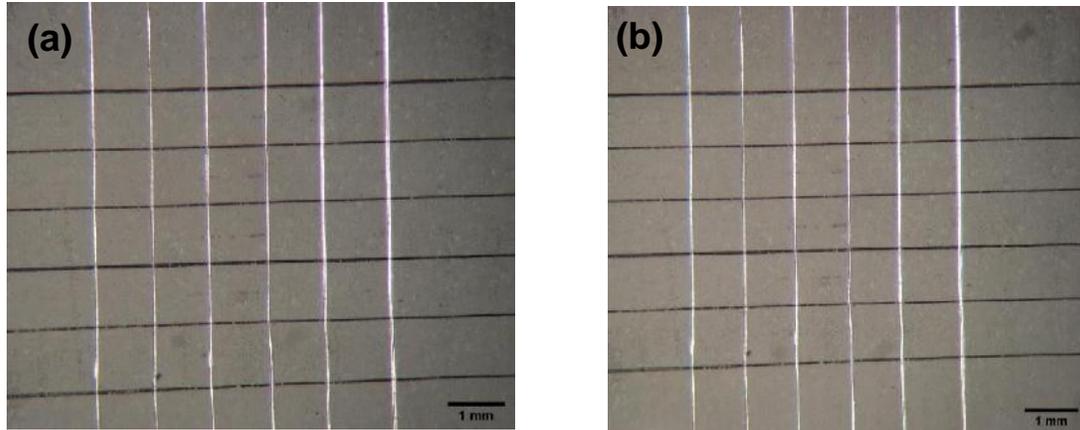


Figura 19. Recubrimiento de zeína-BG-Cu (a) antes y (b) después del tape test.

En la *Figura 20* se muestran imágenes del microscopio óptico con mayor amplificación de uno de los recubrimientos estudiados. Puede verse un ligero desprendimiento en algunas zonas como la cercana la línea superior de la cuadrícula. Sin embargo, dado que es apenas notorio con un aumento de 50x, se determina según la norma ASTM D3359-09 que los recubrimientos son clase 5B. Se puede considerar óptima la adhesión entre la capa y el sustrato.

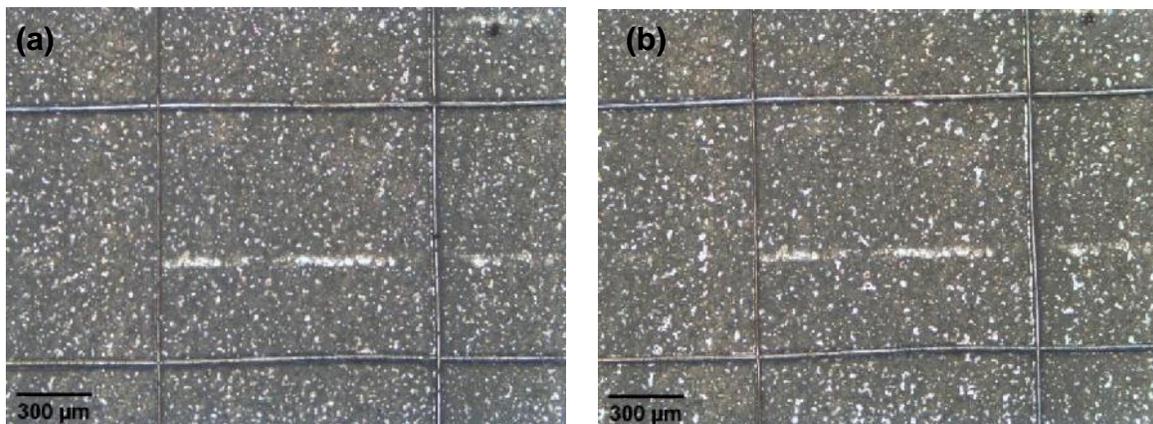


Figura 20. Recubrimiento de zeína-BG a 50x (a) antes y (b) después del tape test.

4.4 Ensayos *in vitro*

4.4.1 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR-ATR)

En la *Figura 21* y *Figura 22* pueden verse los espectros obtenidos para las muestras recubiertas sin inmersión y con siete días de inmersión en SBF, respectivamente. En todas las muestras recubiertas se distinguen las cuatro bandas características de las proteínas. Entre 2800 y 3500 cm^{-1} aparece una banda llamada amida A, que corresponde al estiramiento de los enlaces N-H y O-H de los aminoácidos de la zeína. Alrededor de 1650 cm^{-1} se encuentra la banda amida I, correspondiente al estiramiento del carbonilo (C=O) de los grupos amida pertenecientes a los grupos peptídicos. La banda a 1540 cm^{-1} se llama amida II y se debe a vibraciones de deformación angular del enlace N-H. Por último se encuentra la banda amida III a 1230 cm^{-1} que corresponde a las vibraciones de deformación axial del enlace C-N [24], [58]. El pico a 2930 cm^{-1} también es característico de la zeína y corresponde al estiramiento del enlace C-H [25].

Por otro lado, también se distinguen picos debidos a grupos funcionales presentes en los vidrios bioactivos. A 1043 cm^{-1} puede verse un pico debido al estiramiento asimétrico de Si-O-Si [25]. Alrededor de 1430 cm^{-1} hay un pico correspondiente a las vibraciones por estiramiento y flexión del enlace P-O [25]. Este pico se solapa en parte a otro pico más pequeño a 1460 cm^{-1} relacionado con carbonatos adsorbidos en la superficie del BG por reacción entre el CO_2 atmosférico y algunos iones superficiales Ca^{2+} disponibles [10], [59].

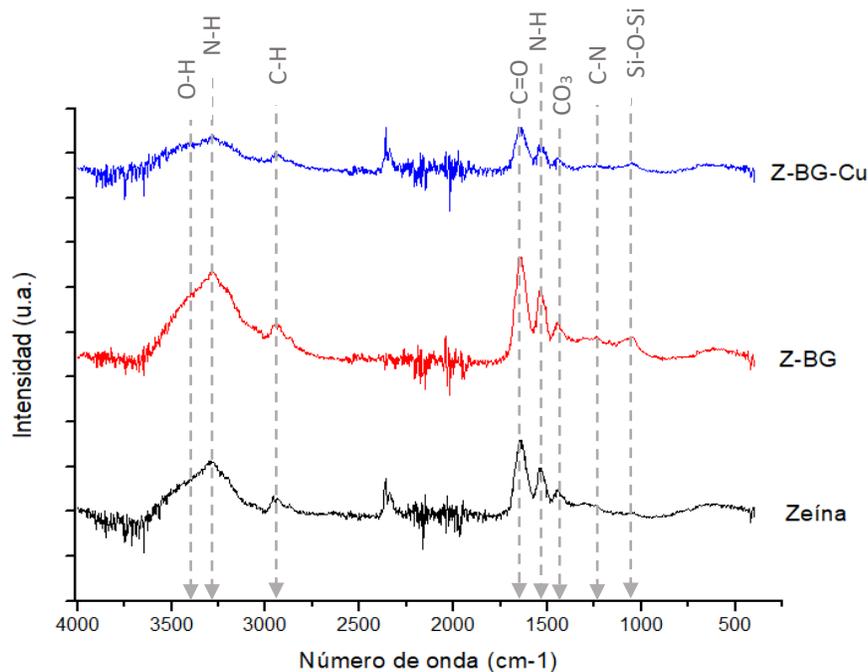


Figura 21. Espectro FTIR de los distintos recubrimientos sin inmersión en SBF.

Luego de la inmersión, no se observan grandes variaciones en los espectros. La diferencia más notoria es el pico alrededor de 1040 cm^{-1} que aparece en todas las muestras recubiertas. Este pico se atribuye a la vibración de flexión del enlace P-O e indica la formación de hidroxiapatita en la superficie del recubrimiento [25]. Por otro lado, en la muestra recubierta con zeína-BG-Cu puede observarse un pico ancho o banda alrededor de los 600 cm^{-1} que corresponde a los modos de vibración de los grupos PO_4^{3-} característicos de la hidroxiapatita [10].

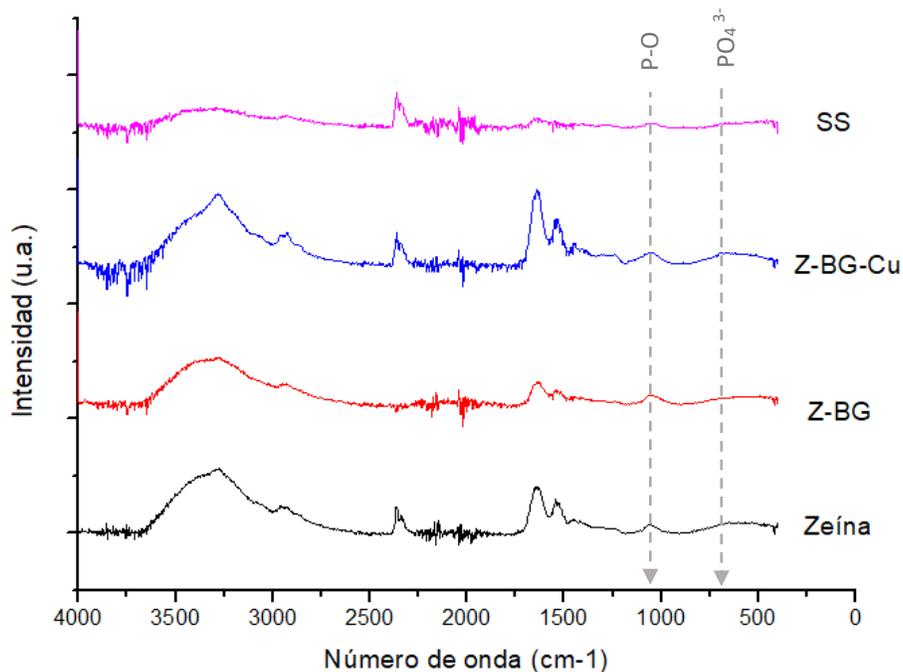


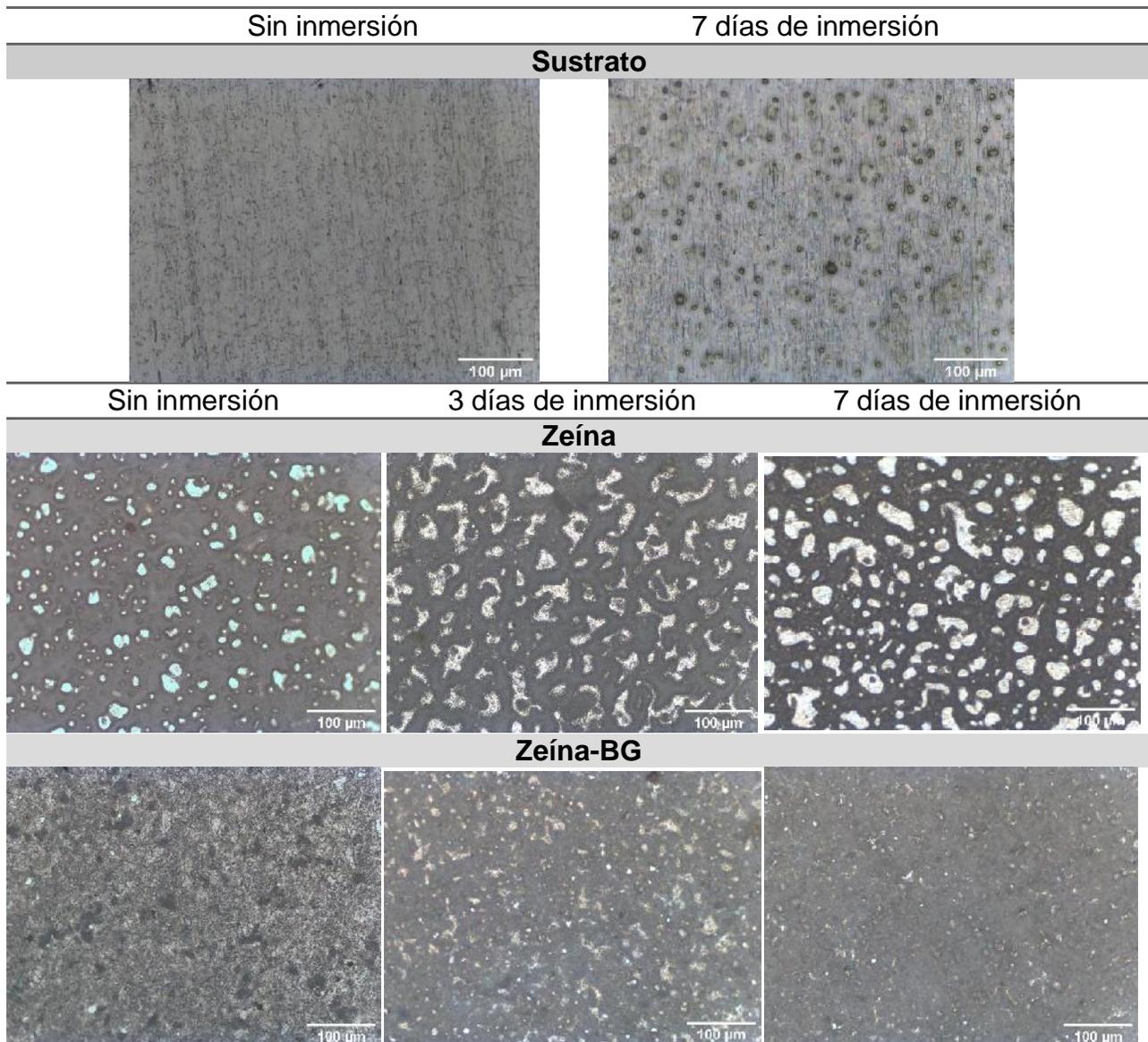
Figura 22. FTIR de los recubrimientos y el sustrato luego de 7 días de inmersión en SBF.

4.4.2 Microscopía óptica y porosidad

En la *Figura 23* se presentan imágenes de los sistemas recubiertos analizados tomadas luego de 0,3 y 7 días de inmersión en SBF a 37 °C y del sustrato luego de 0 y 7 días de inmersión en las mismas condiciones. Puede verse que los recubrimientos de zeína poseen una porosidad alta, seguidos de los de zeína-BG-Cu, mientras que las capas de zeína-BG cubren una mayor área superficial del sustrato. Esto puede ser debido a que las partículas de biovidrio logran cubrir parte de la porosidad inherente de la capa de zeína. Luego, dependiendo del diámetro y distribución de tamaño de partícula, así como de las condiciones de la deposición, se logra una mayor o menor cobertura de los poros.

La disolución de las capas de zeína y las partículas, cuando las muestras están en inmersión, provoca un aumento de porosidad. Pero, si a la vez ocurre la formación de depósitos ricos en Ca y P o incluso hidroxiapatita, se puede contrarrestar el aumento de poros y no dejar expuesto al sustrato. En las imágenes tomadas luego de tres y siete días de inmersión, se nota un deterioro de las capas y un marcado aumento de la porosidad, lo que muestra una rápida disolución de los recubrimientos, sin que los poros lleguen a cubrirse con los depósitos de compuestos relacionados con la apatita.

En la *Figura 24* se aprecian con mayor detalle y aumento algunos recubrimientos luego de estar en inmersión en SBF durante 7 días. En el centro de ciertos poros, se distinguen unas formas circulares que se infiere que podrían ser formaciones de depósitos ricos en Ca y P.



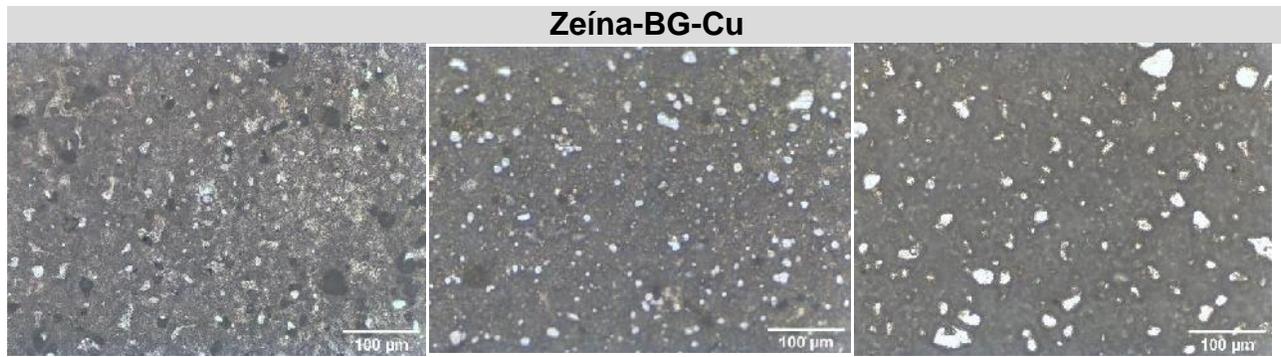


Figura 23. Microscopías ópticas a 200x de las muestras recubiertas tras 0,3 y 7 días de inmersión en SBF y del sustrato tras 0 y 7 días de inmersión en SBF.

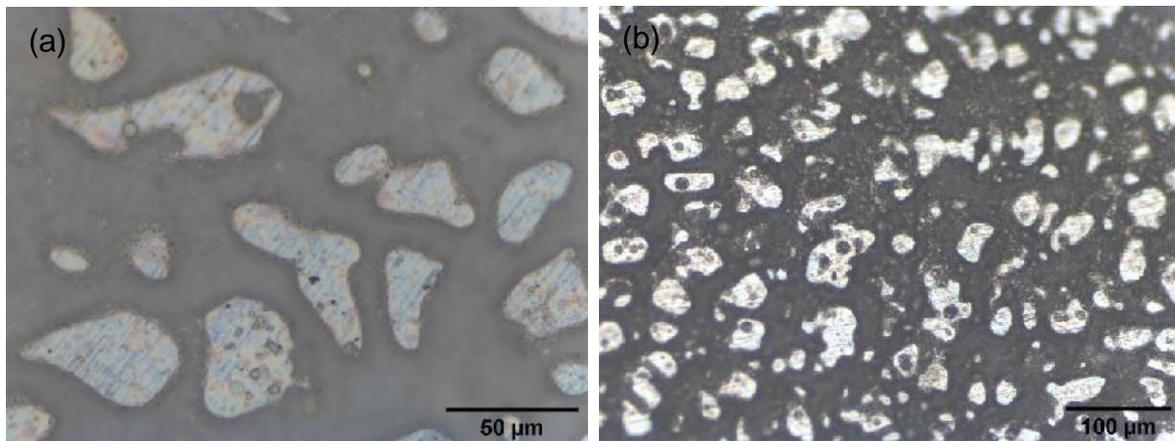


Figura 24. Microscopía óptica de recubrimiento de (a) zeína-BG-Cu a 500x y (b) zeína a 200x, luego de 7 días de inmersión en SBF.

Posteriormente, se procedió a evaluar la porosidad de los recubrimientos de zeína mediante procesamiento digital de imágenes, en colaboración con el Laboratorio de Procesamiento Digital de Imágenes del ICyTE (UNMdP-CONICET). En la *Figura 25* se muestra parte del procedimiento realizado. En primer lugar, se seleccionaron los poros, luego se transformaron las imágenes a binarias, separándolas en zonas correspondientes al recubrimiento y poros para poder calcular el porcentaje de área cubierta. Se repitió el procedimiento con distintas muestras de zeína sin inmersión y con 7 días de inmersión en SBF a 37 °C.

En las muestras cuyas capas tenían partículas de biovidrio no se realizó este análisis debido a la dificultad para diferenciar los poros de las partículas, dado que ambos tienen tonalidades de gris similares.

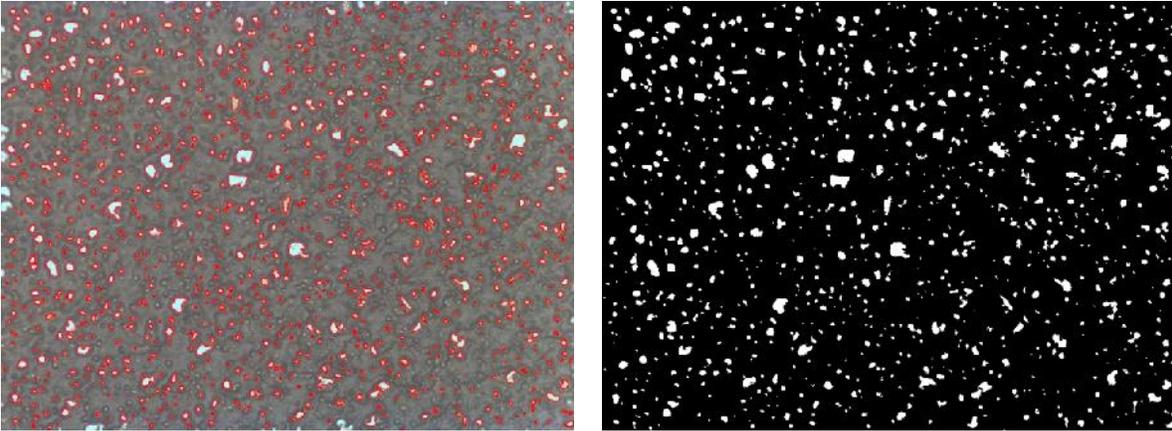


Figura 25. Imágenes del procedimiento realizado para el cálculo de porosidad, (a) selección de poros, (b) pasaje a sistema binario.

En la *Tabla 9* se muestra el porcentaje de área cubierta de los recubrimientos estudiados. Puede notarse un gran aumento de la porosidad tras la inmersión, generado por una rápida disolución de la capa.

Tabla 9. Porcentaje de área cubierta y descubierta de los recubrimientos de zeína.

	Sin inmersión	7 días de inmersión
Área cubierta (%)	91.1 ± 1.7	77 ± 2

Por otro lado, se realizó un histograma de la distribución de tamaño de los poros (ver *Figura 26*). Para ello, se analizaron los poros como círculos o elipses, y se consideró que su longitud característica estaba dada por el eje más largo, estimándose como eje mayor de la elipse o diámetro del círculo (ver sección materiales y métodos).

Tanto antes como después de la inmersión, los poros presentaron una distribución de Poisson en donde la mayor frecuencia se encontró a tamaños de 10-30 μm . Sin embargo, puede verse que luego de la inmersión, la distribución se ensanchó llegando a dimensiones de poro mucho mayores.

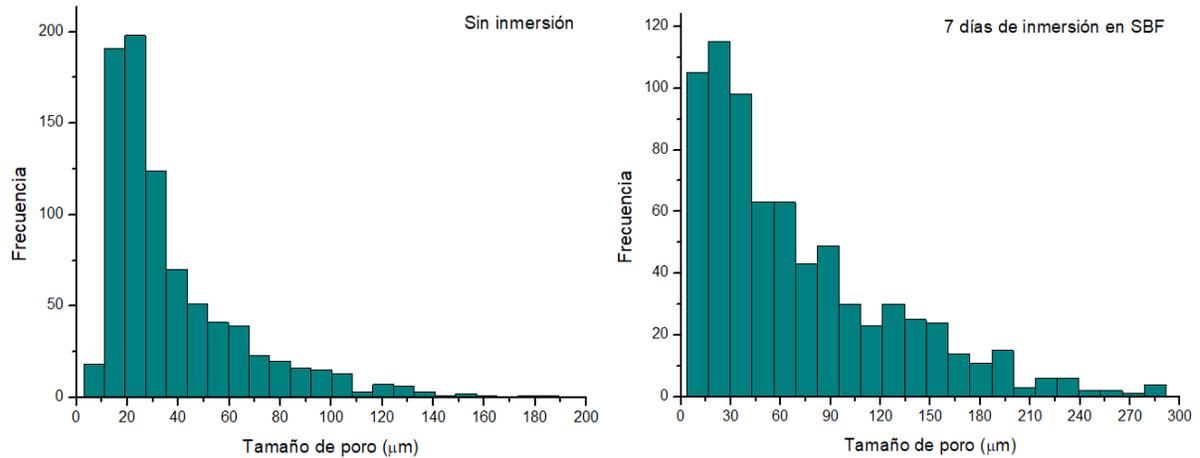


Figura 26. Histograma de distribución de poros de recubrimientos de zeína antes (izquierda) y después de inmersión en SBF (derecha).

La zeína es conocida por tener múltiples propiedades beneficiosas para ser utilizada en biomateriales o medicina [24]. La misma es biocompatible, y algunos autores mencionan sus capacidades antibacteriales. Sin embargo, no muestra bioactividad, por lo que no presenta en ensayos acelulares *in vitro* una capacidad de oseoinducción con generación de compuestos relacionados con Ca y P. De ser así, el aumento de la superficie desnuda estaría en detrimento ya que parte se estaría cubriendo por estos compuestos relacionados con la apatita. Primeros indicios de presencia de compuestos ricos en fosfatos, se ven luego de 7 días de inmersión, pero éstos todavía no son lo suficientemente voluminosos para impedir la disminución del área cubierta de las muestras.

4.4.3 Ensayos electroquímicos

En este apartado se muestran los resultados correspondientes a los distintos recubrimientos tras realizar la espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) y las voltametrías.

En la *Figura 27* se presentan los gráficos de Bode obtenidos para el sustrato desnudo y la capa de zeína sin inmersión en SBF (está representada una muestra por condición, pero los ensayos se hicieron de 3 a 5 veces con diferentes muestras). Puede notarse que los resultados fueron casi iguales para ambos casos. Esto se debe a que el recubrimiento de zeína posee micro-porosidades que dejan al descubierto el metal, como pudo verse en las imágenes de microscopía óptica (*Figura 23*).

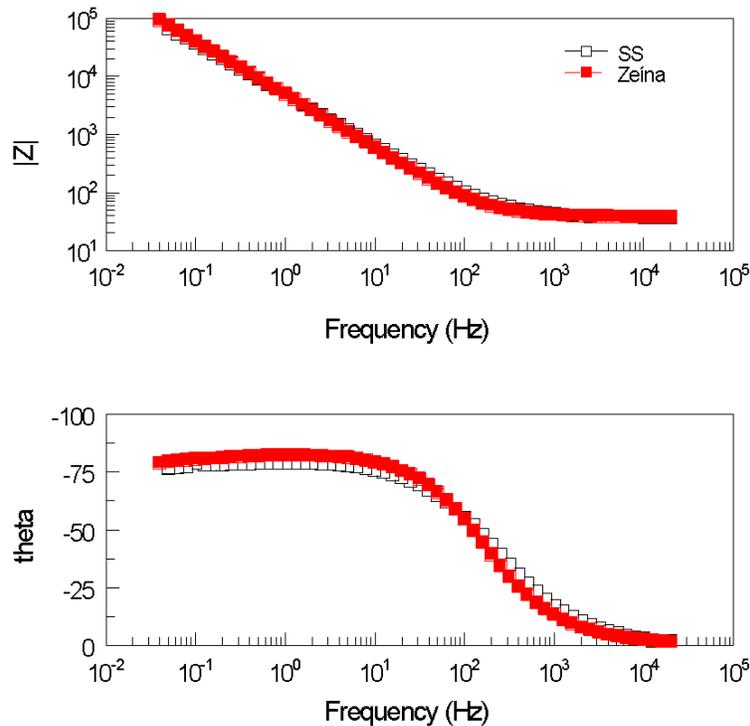


Figura 27. Gráficos de Bode de la capa de zeína y el sustrato desnudo sin inmersión.

Por otro lado, en la *Figura 28* se presentan los gráficos de Bode obtenidos para las capas de zeína-BG sin inmersión, donde se los compara además con el obtenido para el sustrato. Los ensayos se realizaron por quintuplicado. En los recubrimientos estudiados se distinguen dos comportamientos electroquímicos: (1) comportamiento similar a la capa porosa de zeína y por lo tanto al sustrato, (2) comportamiento de capa más densa, pero no más resistiva.

En el caso de las muestras con zeína-BG que presentan el comportamiento (2) se considera que las partículas que tapan los poros, y que a su vez permiten acumular el agua dentro, entre las moléculas de zeína. Esto se infiere porque las resistencias totales del sistema, que se obtienen extrapolando las curvas obtenidas a frecuencia cero en el gráfico del módulo de impedancia, son muy similares a las muestras que presentan el comportamiento (1). Además, el ángulo de fase es muy bajo (alrededor de 25 grados), de modo que el sistema no estaría mostrando un comportamiento protector, sino uno más difusivo dentro de la capa.

En el caso de los recubrimientos de zeína-BG-Cu, ambos comportamientos fueron encontrados en la variación de las muestras, pero la gran mayoría presentó un comportamiento de capa porosa, similar al metal desnudo.

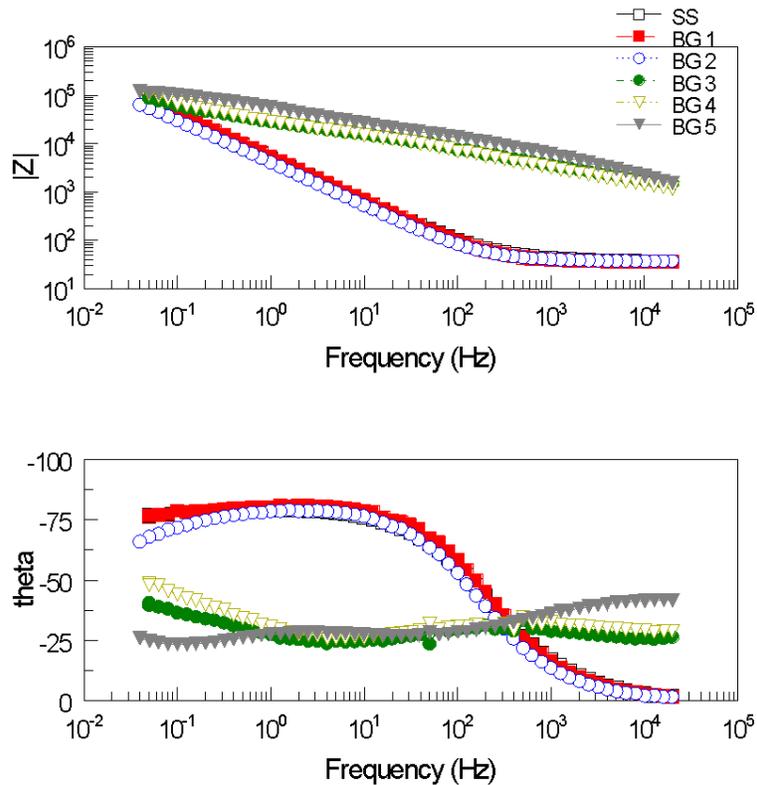


Figura 28. Gráficos de Bode de la capa de zeína-BG sin inmersión en SBF.

La existencia de dos comportamientos distintos para recubrimientos fabricados con un mismo sistema de partida puede deberse al propio proceso de generación de las capas. Para hacer las electrodeposiciones se partió de una solución con 10 g/L de partículas de biovidrio, pero la misma suspensión fue utilizada para realizar tres electrodeposiciones consecutivas. Por lo tanto, pudo haber una merma en la concentración de especies disponibles para generar las capas, de modo que unas resultaron más porosas o menos densas que otras. No fue posible distinguir esto a ojo desnudo por lo que, al momento de la síntesis, las muestras no fueron identificadas según el orden de deposición.

Los resultados fueron modelados a través de circuitos equivalentes que ajustan los datos experimentales obtenidos y facilitan la interpretación de los procesos de degradación y procesos físicos que ocurren en el sistema.

Con base en un mismo circuito equivalente se modelaron: el sustrato, las capas de zeína y las capas de zeína-BG y zeína-BG-Cu que presentaban un comportamiento poroso (ver *Figura 29*).

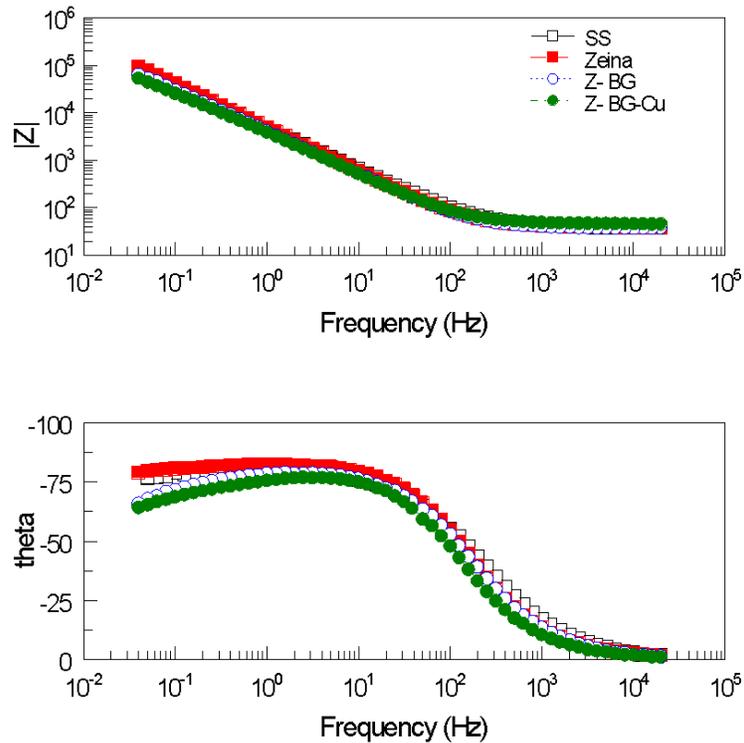


Figura 29. Gráficos de Bode del sustrato y de los recubrimientos que presentaron un comportamiento de capa porosa.

Se utilizó el modelo de doble capa de la *Figura 30*, que incluye dos pseudocapacitores (capacitores no ideales o con pérdida) y tres resistencias. En lugar de capacitores ideales se utilizaron elementos de fase constante llamados CPE, los cuales se emplean cuando el ángulo de fase es distinto a -90° :

$$CPE = \frac{1}{Q(j\omega)^n}$$

Cada uno de estos elementos de fase constante se encuentra afectado por un coeficiente n asociado a la homogeneidad del sistema, siendo 1 el valor correspondiente a un capacitor ideal.

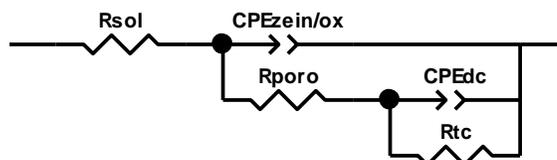


Figura 30. Modelo de circuito equivalente de doble capa utilizado.

La pseudocapacitancia de la capa de óxido en el metal o la capa del recubrimiento está representada por el elemento $CPE_{rec/ox}$, mientras que el elemento CPE_{dc} se relaciona con la doble capa electroquímica. Por otro lado, las resistencias están asociadas a los poros (R_{poro}) y a la resistencia a la transferencia de carga (R_{tc}). R_{sol} hace referencia a la resistencia de la solución.

En la *Tabla 10* se presentan los valores que ajustan al modelo propuesto para cada condición estudiada.

Tabla 10. Valores que ajustan al modelo de circuito equivalente propuesto.

	R_{sol} (Ωcm^2)	$CPE_{rec/ox}$		R_{poro} (Ωcm^2)	CPE_{dc}		R_{tc} (Ωcm^2) (*1E-5)
		Q (S/ Ωcm^2) (*1E+05)	n		Q (S/ Ωcm^2) (*1E+05)	n	
Sustrato	35±3	2.27±0.06	0.85±0.05	86±40	1.7±0.2	0.85±0.03	42±30
Zeína	52±15	4±1	0.89±0.01	98±50	0.6±0.1	1.00±0.00	7±5
Z-BG	36±1	1.6±0.4	0.97±0.01	25.4±0.5	2.7±0.4	0.83±0.01	7±6
Z-BG-Cu	46±1	1.4±0.3	1.00±0.00	29.3±0.2	3.8±0.3	0.79±0.01	3±1

Para el caso de los recubrimientos de zeína-BG que presentaron el comportamiento más difusivo, se podría utilizar un modelo de circuito equivalente como el de la *Figura 31*, que posee un elemento difusivo de Warburg.

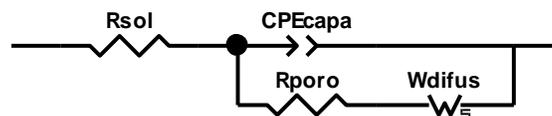


Figura 31. Modelo de circuito equivalente para las capas de zeína-BG con comportamiento difusivo.

La impedancia de Warburg es utilizada para modelar la conductividad iónica creciente debido a procesos electroquímicos o de corrosión que ocurren dentro de defectos o poros, lo que incrementa la difusividad de los mismos. Cuando el espesor de los recubrimientos o capas de óxido es pequeño, bajas frecuencias penetrarán a través del espesor, creando un elemento de Warburg de longitud finita [60]:

$$Z_w = R_{DO} \frac{\tanh(jT\omega)^n}{(jT\omega)^n}$$

El modelo solo fue aplicable a los recubrimientos de zeína-BG y no a los de zeína-BG-Cu, debido a que éstos últimos presentaron espectros muy dispersos que no pudieron modelados. En la *Tabla 11* se presentan los valores que ajustaron al circuito equivalente propuesto.

Tabla 11. Valores que ajustan al circuito equivalente propuesto.

	R_{sol}	$CPE_{rec/ox}$		R_{poro} (*1E-05)	W		
		Q (*1E+06)	n		R (*1E-05)	T	n
Z-BG	670 ± 300	6 ± 3	0.46 ± 0.07	1.1 ± 1.2	3.4 ± 0.7	11 ± 2	0.60 ± 0.05

En la *Figura 32* se presentan los gráficos de Bode obtenidos para el sustrato desnudo y los distintos recubrimientos luego de 7 días de inmersión en SBF a 37 °C. Se observa que las capas se deterioraron durante la inmersión, ya sea por la disolución de las partículas de biovidrio o por la disolución de la zeína. Este efecto se demuestra porque todas las muestras presentan el mismo comportamiento y pueden ser modeladas con el mismo circuito equivalente que el metal desnudo (ver *Figura 30*). Solo se observan leves cambios en los valores de pseudocapacitancias y de resistencias obtenidos (ver *Tabla 12*). Los resultados concuerdan con las imágenes ópticas encontradas luego de la inmersión.

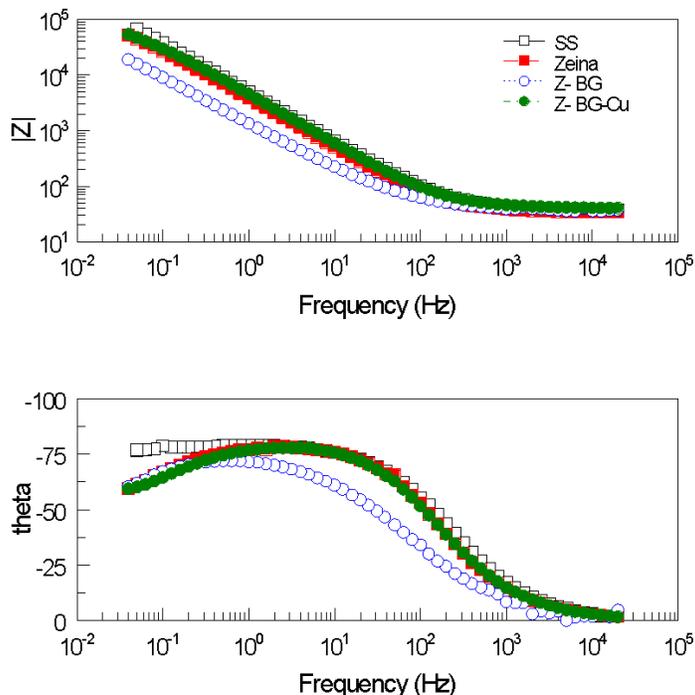


Figura 32. Gráficos de Bode del sustrato y los recubrimientos luego de 7 días de inmersión en SBF a 37 °C.

Tabla 12. Valores que ajustan al modelo de circuito equivalente tras 7 días de inmersión.

	R_{sol} (Ωcm^2)	$CPE_{rec/ox}$		R_{poro} (Ωcm^2)	CPE_{dc}		R_{tc} (Ωcm^2) (*1E-5)
		Q (S/ Ωcm^2) (*1E+05)	n		Q (S/ Ωcm^2) (*1E+06)	n	
Sustrato	34±1	3.7±0.6	0.86±0.01	116±30	6±5	0.9±0.1	2.9±0.4
Zeína	35±1	4.2±0.8	0.88±0.02	86±30	4±1	1.0±0.1	1.7±0.3
Z-BG	38±2	9.5±0.6	0.84±0.01	85±50	60±6	0.8±0.0	0.5±0.2
Z-BG-Cu	35±7	4.2±0.1	0.86±0.01	103±4	4.2±0.4	1.0±0.0	1.4±0.01

Según el modelo de Brug [61], la pseudocapacitancia de los recubrimientos puede ser relacionada con una capacidad efectiva (C_{eff}), a partir de la siguiente ecuación:

$$C_{eff} = Q^{\frac{1}{n}} \left(\frac{R_{sol} * R_{poro}}{R_{sol} + R_{poro}} \right)^{\frac{(1-n)}{n}}$$

En la *Tabla 13* se encuentran los valores de la capacidad efectiva calculados para el sustrato y las muestras recubiertas (de comportamiento poroso) antes y después de la inmersión en SBF. Puede notarse que las C_{eff} casi no varían, esto se debe a que los recubrimientos presentaban una alta porosidad previa a la inmersión y no presentaron suficientes depósitos luego de la misma como para cubrir la superficie expuesta.

Tabla 13. Valores de C_{eff} (F/cm^2) de las muestras, multiplicados por $1E+05$.

	Sustrato	Zeína	Z-BG	Z-BG-Cu
0 días	0.6 ± 0.3	2.0 ± 0.5	1.2 ± 0.1	1.4 ± 0.3
7 días	1.1 ± 0.1	1.6 ± 0.3	3.1 ± 0.6	1.4 ± 0.2

En la *Figura 33* se presentan las curvas de polarización obtenidas para las muestras recubiertas y el material desnudo, antes y después de 7 días de inmersión en SBF.

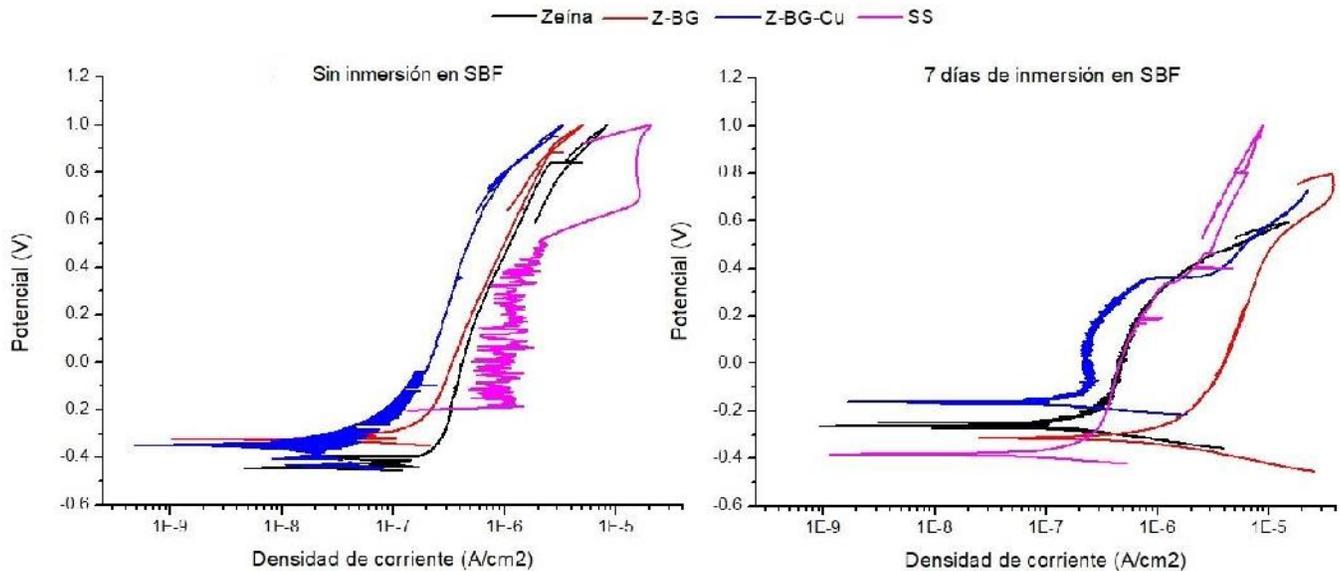


Figura 33. Curvas de polarización de las muestras recubiertas y el sustrato sin inmersión (izquierda) y tras 7 días de inmersión en SBF (derecha).

En el caso de las curvas obtenidas sin inmersión previa a los ensayos electroquímicos, puede verse que las muestras con zeína-BG-Cu tienen densidades de corriente levemente inferiores respecto de las otras tres condiciones, de modo que presentan una sutil diferencia positiva en cuanto a la protección. Las muestras recubiertas con zeína-BG, en cambio, presentaron un comportamiento similar a la zeína. Esto puede deberse a que los ensayos se realizaron después que las muestras estuvieran en inmersión por lo menos 3 horas, ya que fueron sometidas a la medida de potencial de corrosión e impedancia electroquímica antes. Ese tiempo puede haber sido suficiente para permitir que comience la disolución de las partículas de BG y generar poros similares a las muestras de zeína.

Luego de 7 días de inmersión se observa una empeora de las muestras conteniendo BG, indicando que la utilización del sistema zeína-BG no sería aconsejable en este tipo de recubrimientos. En el caso del sistema zeína-BG-Cu puede verse un aumento en el potencial de corrosión, pero también se observa que la densidad de corriente de pasividad es menor que para el resto de los sistemas, logrando una leve protección a la corrosión luego de 7 días de inmersión.

A partir de estos resultados y los obtenidos en ensayos de FTIR, puede inferirse que no se presenta gran cantidad de depósitos superficiales (fosfatos relacionados con apatita). Podrían realizarse en un futuro, ensayos a 30 días de inmersión en SBF, para ver si se presenta una capa más continua y compacta de fosfatos, que modifiquen el comportamiento electroquímico del sistema. Dadas a las condiciones

de aislamiento en relación al COVID-19, no se pudieron estudiar mayores tiempos de inmersión en el presente trabajo.

4.5 Ensayos de liberación de cobre y antibacteriales

Por causa de las condiciones de aislamiento y restricciones para ir al laboratorio, no se pudieron realizar ensayos cuantitativos de calibración y de liberación de iones cobre para diferentes tiempos de inmersión.

Se realizó una medición cualitativa de la presencia de iones Cu^{2+} en una muestra recubierta con zeína-BG-Cu que estuvo inmersa en agua bidestilada por 13 días a 37°C . Para ello, por medio de espectroscopia UV-vis, se buscó la presencia del pico de absorción de Cu^{2+} en alrededor de 700 nm . Se comparó el espectro obtenido, con espectros de diferentes soluciones patrón con concentraciones variables del ion cobre. Los resultados se muestran en la *Figura 34*. Puede verse que el Cu^{2+} está presente en la muestra problema, dado que la curva se encuentra entre algunas de las concentraciones medidas. Sin embargo, debido a la falta de ensayos no fue posible cuantificar este efecto.

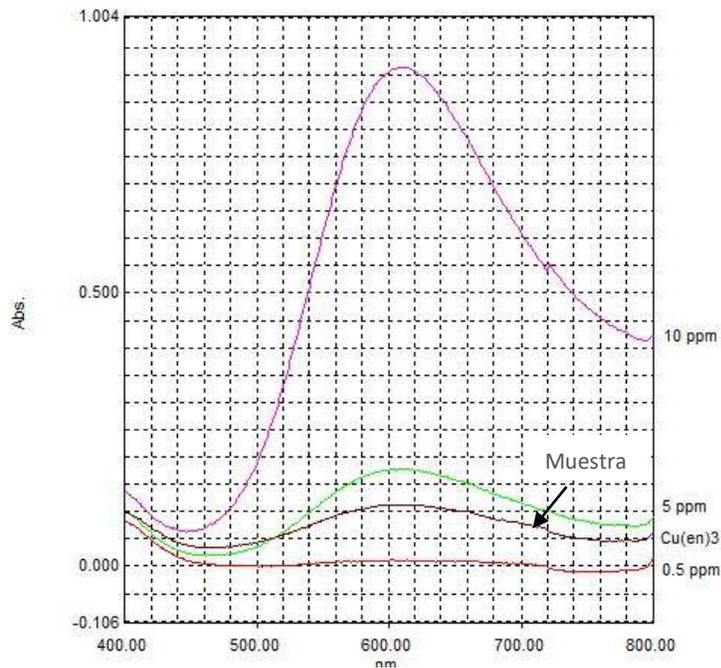


Figura 34. Espectros UV-vis para la muestra problema y soluciones con distintas concentraciones de cobre.

Por otro lado, los resultados de las mediciones de densidad óptica para la evaluación antibacterial se presentan en la *Figura 35*. No se ven diferencias notorias en el crecimiento de bacterias en presencia o ausencia de iones cobre en ningún caso. En *S.aureus* incluso parecería que las muestras de zeína-BG tienen alguna disminución a las 48 horas, lo que puede estar asociado a una gran disolución de las partículas de BG y a la generación de un medio ácido, o también a la formación de un biofilm y la disminución de células plantónicas en la suspensión.

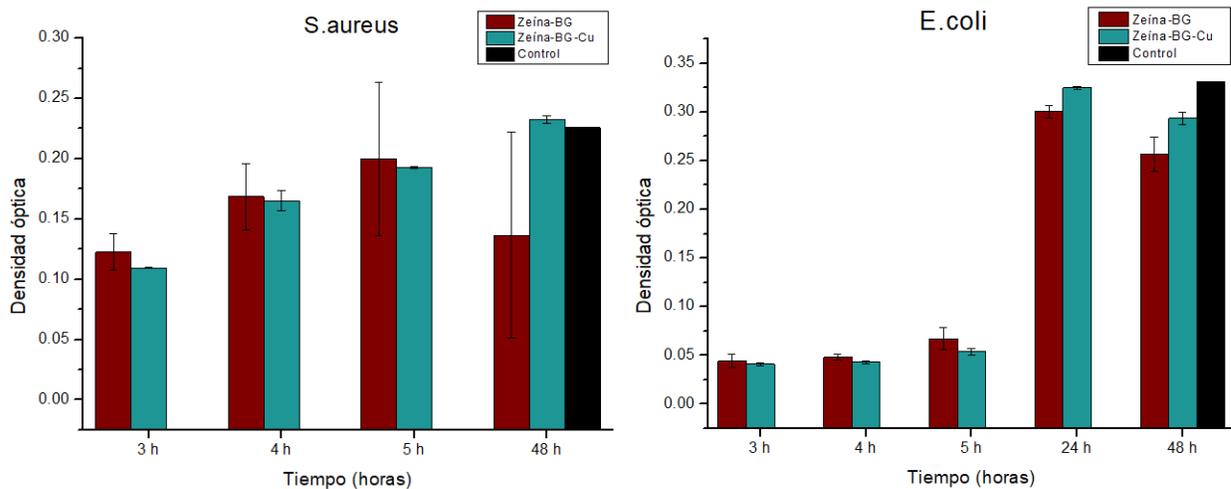


Figura 35. Densidad óptica de diluciones de *S.aureus* y *E.coli* tras estar en contacto con recubrimientos de zeína-BG y zeína-BG-Cu durante distintos tiempos.

Luego de retirar las soluciones, tanto los materiales recubiertos como los tubos quedaron teñidos con cristal violeta, como se observa en la *Figura 36*. Las muestras recubiertas con zeína-BG y zeína-BG-Cu se tiñeron todas por igual. No podría afirmarse que los recubrimientos retienen cristal violeta por algún mecanismo especial que no sea referido a la capa en sí y no al biofilm. Por otro lado, en los tubos puede observarse que aquellos que contenían *S. aureus* y material recubierto con zeína-BG-Cu parecen tener menor cantidad de biofilm teñido en las paredes.

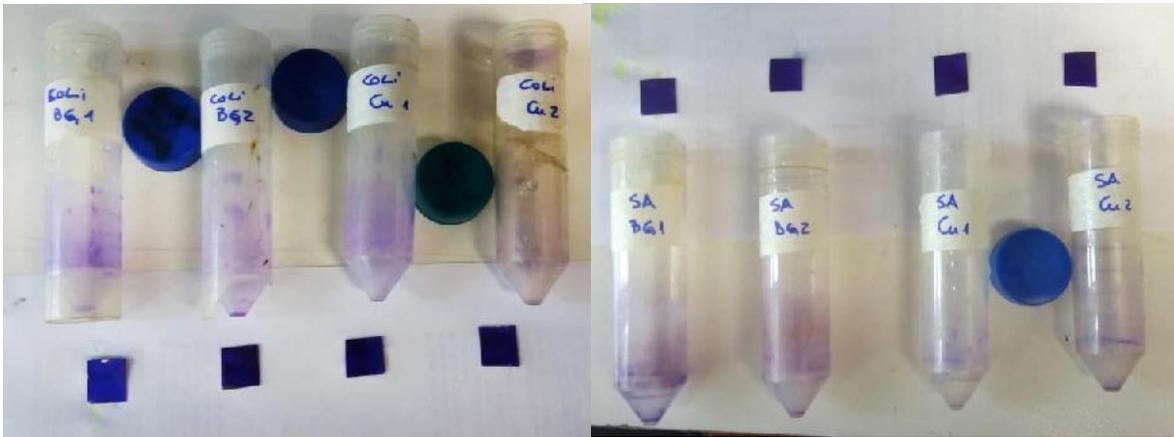


Figura 36. Tubos y muestras recubiertas teñidas con cristal violeta tras retirar las soluciones con bacterias.

Al medir la densidad óptica de las bacterias remanentes en los biofilms formados en las paredes de los tubos (ver *Figura 37*), se observó que las muestras con S.Aureus generaron más biofilm que las que tenían E.coli (lo que es lo esperado para este tipo de bacterias). Además, ambas bacterias mostraron tendencia a menos formación de biofilm en la pared del tubo en presencia de cobre.

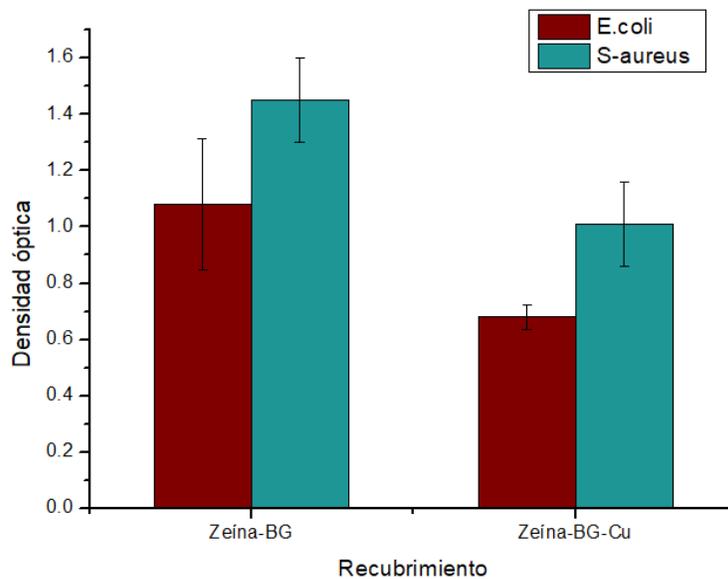


Figura 37. Densidad óptica de bacterias remanentes en los biofilms formados en las paredes de los tubos.

4.6 Evaluación celular *in vitro*

En la *Figura 38* se presentan los resultados de la densidad óptica medida tras el ensayo de WST-8. Puede verse que la cantidad de células aumenta con el paso de los días en todas las condiciones estudiadas. Ambos recubrimientos con partículas de biovidrio presentaron un comportamiento similar, independientemente de la presencia o ausencia de iones cobre. Por otro lado, los recubrimientos de zeína fueron los que mostraron una mayor proliferación celular luego de 7 días de inmersión. Cabe destacarse que no se observan diferencias significativas en la cantidad de células para 1 día de cultivo, en los tres materiales estudiados.

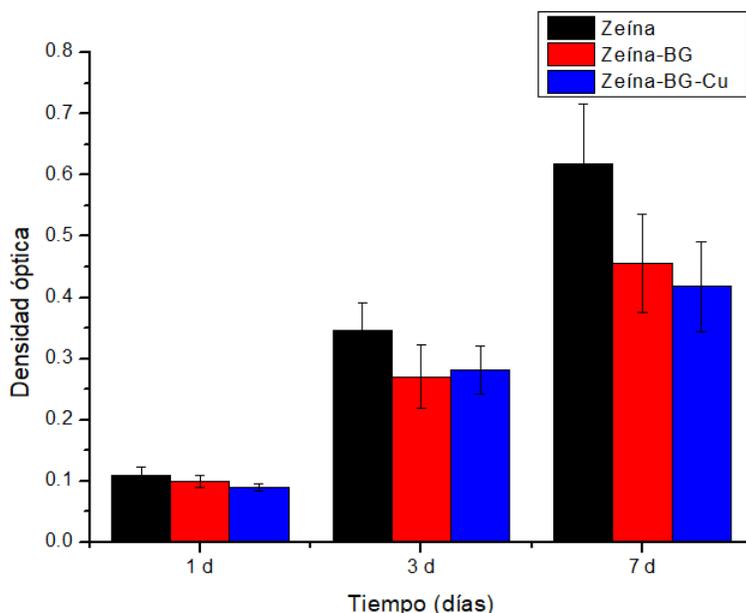


Figura 38. Densidad óptica de las distintas muestras a 450 nm vs tiempo.

En la *Figura 39* puede verse el resultado de las imágenes de microscopía de fluorescencia donde se tiñen los núcleos de las células cultivadas en la superficie de los materiales, de color azul, y sus citoplasmas de rojo.

Luego de 24hs de cultivo, se observa adhesión y proliferación de las células en las muestras recubiertas con zeína y zeína-BG-Cu. No se observa el mismo comportamiento en las muestras con zeína-BG, donde se ven células dispersas, pero sin gran proliferación. Esto puede deberse a que las partículas de BG se disuelven más rápido que las de BG-Cu debido a su menor tamaño y mayor área reactiva superficial. Al disolverse, liberan ácido silícico y generan una alcalinización del medio circundante que afecta el crecimiento celular en las primeras 24 hs [62]. Luego de un día de transcurrido el ensayo, el medio de cultivo de las células se recambia, así que las mismas tendrán medio neutro y rico para seguir

reproduciéndose, como se ve en los casos a mayores tiempos. Igualmente, la cantidad total de células medida por el método del WST-8 nos indicaría que la cantidad de células en los tres materiales es similar, pero no nos brinda información acerca de la adherencia o forma de las mismas.

Al cabo de tres días de ensayo, la monocapa celular es continua en los tres casos de recubrimientos estudiados. Luego de 7 días, en las tres condiciones trabajadas, las células confluyen y forman una o dos capas, cubriendo toda la superficie. Puede verse que esa capa comienza a desprenderse (espacios negros), lo que podría deberse al crecimiento exagerado de las células o podría estar también relacionado con una superpoblación de células sembradas al momento de realizar el ensayo.

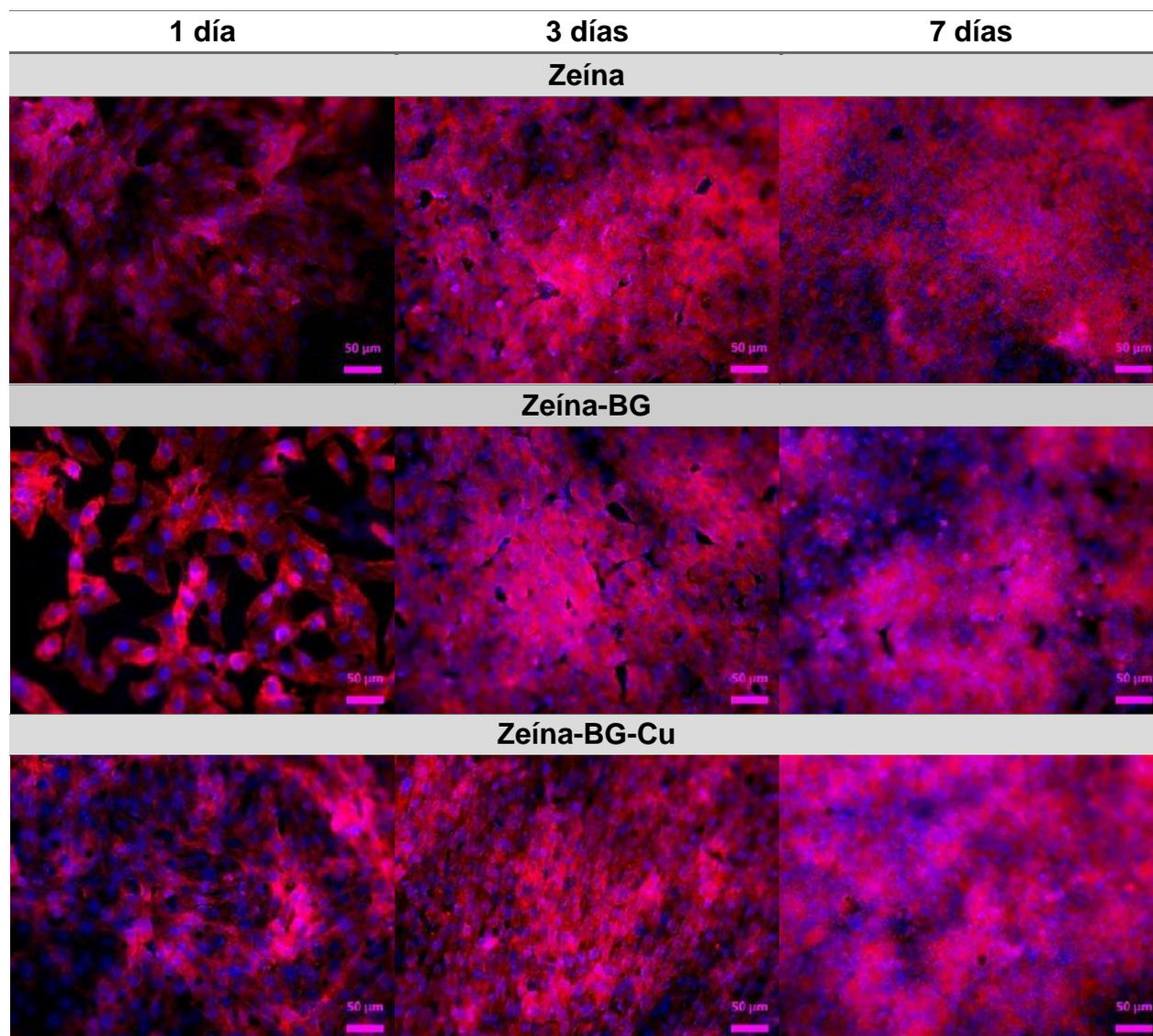


Figura 39. Microscopía de fluorescencia de muestras recubiertas luego de 1,3 y 7 días de cultivo celular.

5. CONCLUSIONES

Se logró fabricar recubrimientos a partir de deposiciones electroforéticas, optimizando los parámetros tiempo-corriente en base a imágenes SEM, de modo de lograr capas homogéneas con baja cantidad de fisuras y defectos presentes.

Los recubrimientos mostraron buena adhesión al sustrato, además de aumentar levemente la rugosidad del mismo y disminuir su ángulo de mojado, lo que favorece la adhesión y el crecimiento celular.

Las capas de zeína presentaron una porosidad alta, como pudo observarse en las imágenes de microscopía óptica. Las partículas de biovidrio (tanto las de BG como BG-Cu) lograron cubrir parte de los poros, pero no su totalidad.

Mediante FTIR se reconocieron los picos característicos de la zeína y las partículas de biovidrio, cuya existencia fue asegurada previamente con el análisis EDS. Además, la presencia de picos de fosfatos en el espectro, indicó signos de bioactividad en las muestras recubiertas, tras 7 días de inmersión en SBF. La formación de depósitos de compuestos ricos en fosfatos, fue acompañada con un gran aumento de la porosidad de las capas, como pudo verse en la microscopía óptica. Esto indica una rápida disolución del recubrimiento que no logra ser contrarrestada con la formación de depósitos suficientemente voluminosos, que cubran la superficie descubierta.

Por otro lado, los recubrimientos no modificaron la resistencia a la corrosión del sustrato. La gran mayoría de las muestras presentó un comportamiento electroquímico de capa muy porosa, otorgando resultados casi idénticos al sustrato desnudo. Algunas de las repeticiones de las muestras recubiertas con zeína y BG mostraron un comportamiento diferente, más inestable y quizás asociado a un comportamiento difusivo de la capa, aunque no por ello de carácter más protector. Se considera que la razón de la existencia de comportamientos tan diferentes, podría ser la distinta concentración de partículas presentes en la suspensión al momento de realizar la deposición electroforética, debido al uso de una misma suspensión para hacer tres EPDs seguidas. Por lo tanto, se debería evaluar el comportamiento electroquímico de las capas realizadas mediante deposiciones en las que se utilice una suspensión nueva cada vez.

En los ensayos electroquímicos que se hicieron luego de 7 días de inmersión en SBF se observó el mismo comportamiento para todas las capas, que resultó igual al del sustrato. Esto indica una baja bioactividad de los recubrimientos a tiempos cortos.

Mediante UV-vis se observó liberación de iones cobre luego de 13 días de inmersión en agua bidestilada, aunque no se la pudo cuantificar.

Si bien algunos resultados mostraron leves indicios de actividad antibacteriana, la misma fue muy baja. Puede que la cantidad de cobre presente en las capas haya sido demasiado baja o que las partículas de biovidrio fueran demasiado grandes por lo que no lograron disolverse lo suficientemente rápido para lograr el efecto antibacterial esperado.

Finalmente, en los ensayos de viabilidad celular se observó una gran proliferación de las células en las tres condiciones de recubrimiento estudiadas, lo que indicaría que los recubrimientos con zeína y BG-Cu no interfieren en la adhesión y proliferación, al contrario, estarían mejorando la misma.

6. TRABAJO A FUTURO

Para continuar con la investigación y el desarrollo de recubrimientos de zeína y partículas de biovidrio, obtenidos por deposición electroforética, se propone:

- Realizar ensayos electroquímicos a mayores tiempos de inmersión en solución fisiológica simulada, para evaluar si se forma una cantidad de depósitos de fosfatos apreciable que genere cambios en el comportamiento de las muestras recubiertas respecto del sustrato.
- Estudiar la formación de depósitos de fosfatos en las muestras mediante difracción de rayos X.
- Incrementar la cantidad de partículas de vidrio bioactivo presentes en la capa (aumentando la concentración de las partículas en la suspensión de partida) o disminuir su tamaño, para tener una disolución más rápida y aumentar así la bioactividad de los recubrimientos a tiempos cortos.
- Efectuar ensayos cuantitativos de liberación de iones cobre luego de distintos tiempos de inmersión en SBF.
- Estudiar la posibilidad de aumentar la cantidad de cobre presente en la composición del biovidrio, para incrementar la actividad antibacteriana de las capas, o reducir el tamaño de partícula del BG-Cu para acelerar su disolución (por tener mayor área superficial expuesta) y lograr así una respuesta antibacteriana más marcada en el mismo tiempo.

Otros sistemas de partida deben ser evaluados para obtener recubrimientos con mayor bioactividad y propiedades antibacteriales que puedan ser aplicados en ingeniería de tejidos.

7. REFERENCIAS

- [1] L. Ghasemi-Mobarakeh, D. Kolahreez, S. Ramakrishna y D. Williams, «Key terminology in biomaterials and biocompatibility,» *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 10: 45–50, 2019.
- [2] A. Hudecki, G. Kiryczyński y M. J. Łos, «Biomaterials, Definition, Overview,» *Stem Cells and Biomaterials for Regenerative Medicine*, 2019.
- [3] A. Festas, A. Ramos y J. Davim, «Medical devices biomaterials – A review,» *J Materials: Design and Applications*, Vol. 234(1) 218–228, 2020.
- [4] C. Ning, «Biomaterials for Bone Tissue for Bone Tissue,» D.G. Poitout, *Biomechanics and Biomaterials in Orthopedics*, 2016.
- [5] S. B. Gómez, «Modificación superficial de biomateriales metálicos (316 LVM y Ti6Al4V) mediante granallado, agua a alta presión y "laser peening": efecto en la microestructura, las propiedades mecánicas y la liberación de iones,» Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 2014.
- [6] B. Kasemo y J. Gold, «Implant Surfaces and Interface Processes,» *Advances in Dental Research*, 13, 8-20., 1999.
- [7] J. R. Jones, «Review of bioactive glass: From Hench to hybrids,» *Acta Biomaterialia* 9, 4457–4486, 2013.
- [8] A. El-Ghannam y P. Ducheyne, «Bioactive Ceramics,» Elsevier, 158-165, 2011.
- [9] J. Bramhill y S. R. a. G. Ross, «Bioactive Nanocomposites for Tissue Repair and Regeneration: A Review,» *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 14, , 2017.
- [10] A. Hoppe, R. Meszaros, C. St"ahli, S. Romeis, J. Schmidt, W. Peukert, B. Marelli, S. N. Nazhat, L. Wondraczek, J. Lao, E. Jallot y A. R. Boccaccini, «In vitro reactivity of Cu doped 45S5 Bioglass derived scaffolds for bone tissue engineering,» *J. Mater. Chem. B*, 1, 5659, 2013.
- [11] K. Schuhloden, X. Wang, L. Hupa y A. R. Boccaccini, «Dissolution of borate and borosilicate bioactive glasses and the influence of ion (Zn, Cu) doping in different solutions,» *Journal of Non-Crystalline Solids* 502, 22–34, 2018.

- [12] L. R. Rivera, A. Cochis, S. Biser, E. Canciani y S. Ferraris, «Antibacterial, pro-angiogenic and pro-osteointegrative zein-bioactive glass/copper based coatings for implantable stainless steel aimed at bone healing,» 2021.
- [13] J. V. Prado, A. R. Vidal y T. C. Durán, «Aplicación de la capacidad bactericida del cobre en la práctica médica,» *Rev Med Chile*; 140: 1325-1332, 2012.
- [14] C. Stähli, M. James-Bhasin, A. Hoppe, A. R. Boccaccini y S. N. Nazhat, *Acta Biomaterialia* 19,15–22, 2015.
- [15] N. R. Patel y P. P. Gohil, «A Review on Biomaterials: Scope, Applications & Human Anatomy Significance,» *International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering*, ISSN 2250-2459, Volume 2, 2012.
- [16] Y. Okazaki y E. Gotoh, «Comparison of metal release from various metallic biomaterials in vitro,» *Biomaterials* 26, 11–21, 2005.
- [17] J. B. Park, *Biomaterials science and engineering*, Springer-Verlag, 1984, pp. 193-200.
- [18] R. Singh y N. B. Dahotre, «Corrosion degradation and prevention by surface modification of biometallic materials,» *J Mater Sci: Mater Med*, 18:725–751, 2007.
- [19] I. Gotman, «Characteristics of Metals Used in Implants,» *Journal of Endurology*, Volume 11, Number 6, 1997.
- [20] N. Manam, W. Harun, D. Shri, S. Ghani, T. Kurniawan y M. Ibrahim, «Study of corrosion in biocompatible metals for implants: A review,» *Journal of Alloys and Compounds*, 2017.
- [21] M. Demir, L. R. Rivera, R. Silva, S. N. Nazhat y A. R. Boccaccini, «Zein-Based Composites in Biomedical Applications,» 2017.
- [22] T. J. Anderson y B. P. Lamsal, «Zein Extraction from Corn, Corn Products, and Coproducts and Modifications for Various Applications: A Review,» *Cereal Chem.* 88(2):159–173, 2011.
- [23] M. C. Rishi Shukla, «Zein: the industrial protein from corn,» *Industrial Crops and Products* 13,171–192, 2001.
- [24] E. Corradini, P. S. Curti, A. B. Meniqueti, A. F. Martins, A. F. Rubira y E. C. Muniz, «Recent Advances in Food-Packing, Pharmaceutical and Biomedical Applications of Zein and Zein-Based Materials,» *Int. J. Mol. Sci.*, 15, 22438-22470, 2014.

- [25] N. Meyer, L. R. Rivera, T. Ellis, J. Qi, M. P. Ryan y A. R. Boccaccini, «Bioactive and Antibacterial Coatings Based on Zein/Bioactive Glass Composites by Electrophoretic Deposition,» *Coatings*, 8, 27, 2018.
- [26] Z. Yong, C. Lili, C. Xiaoxia, Z. Heng, S. Nianqiu, L. Chunlei, C. Yan y KongWei, «Zein-based films and their usage for controlled delivery: Origin, classes and current landscape,» *Journal of Controlled Release* 206, 206–219, 2015.
- [27] P. Argos, K. Pedersenfl, M. D. Marksl y B. A. Larkinsfl, «A Structural Model for Maize Zein Proteins,» *The Journal of Biological chemistry*, Vol. 257, No. 1 7 , pp. 9984-9990, 1982.
- [28] N. Matsushima, G.-i. Danno, H. Takezawa y Y. Izumi, «Three-dimensional structure of maize a-zein proteins studied by small-angle X-ray scattering,» *Biochimica et Biophysica Acta* 1339, 14–22, 1997.
- [29] H. Xu, Y. Chai y G. Zhang, «Synergistic Effect of Oleic Acid and Glycerol on Zein Film Plasticization,» *J. Agric. Food Chem.* 60, 10075–10081, 2012.
- [30] J. Taylor, J. O. Anyango y J. R. N. Taylor, «Developments in the Science of Zein, Kafirin, and Gluten Protein Bioplastic Materials,» *Cereal Chem.* 90(4):344–357, 2013.
- [31] T. Lin, C. Lu, L. Zhu y T. Lu, «The Biodegradation of Zein In Vitro and In Vivo and its Application in Implants,» *AAPS PharmSciTech*, Vol. 12, No. 1, 2010.
- [32] S. Kaya y A. R. Boccaccini, «Electrophoretic deposition of zein coatings,» *J. Coat. Technol. Res.*, 2016.
- [33] P. Amrollahi, J. S. Krasinski, R. Vaidyanathan, L. Tayebi y D. Vashae, «Electrophoretic Deposition (EPD): Fundamentals and Applications from Nano- to Micro-Scale Structures,» 2015.
- [34] S. Heise, L. R. Rivera y A. R. Boccaccini, «Bioactive Glass Containing Coatings by Electrophoretic Deposition: Development and Applications,» Gurbinder Kaur, 2019.
- [35] P. Sarkar y P. S. Nicholson, «Electrophoretic deposition (EPD): Mechanism, Kinetic, and Application to Ceramics,» *J. Am. Ceram. Soc.*, 79, 1987-2002, 1996.
- [36] L. Besra y M. Liu, «A review on fundamentals and applications of electrophoretic deposition (EPD),» 2006.

- [37] R. Sikkema, K. Baker y I. Zhitomirsky, «Electrophoretic deposition of polymers and proteins for biomedical applications,» *Advances in Colloid and Interface Science* 284, 102272, 2020.
- [38] V. O. Kollath, Q. Chen, R. Closset, J. Luyten, K. Traina, S. Mullens, A. Boccaccini y R. Cloots, «AC vs. DC electrophoretic deposition of hydroxyapatite on titanium,» *Journal of the European Ceramic Society*, 9190, 2013.
- [39] M. A. U. Rehman, «Zein/Bioactive Glass Coatings with Controlled Degradation of Magnesium under Physiological Conditions: Designed for Orthopedic Implants,» *Prosthesis*, 2020.
- [40] «Rugosidad Superficial,» Grupo tecnología mecánica, pp. 1-16.
- [41] Y. Shibata y Y. Tanimoto, «A review of improved fixation methods for dental implants. Part I: Surface optimization for rapid osseointegration,» *J. Prosthodont Research*-262, 2015.
- [42] J. H. Lee, G. Khang, J. W. Lee y H. B. Lee, «Interaction of Different Types of Cells on Polymer Surfaces with Wettability Gradient,» *Journal of colloid and interface science* 205, 323–330, 1998.
- [43] G. Pérez, «Espectrometría,» [En línea]. Available: https://www.espectrometria.com/espectrometra_ultravioleta-visible.
- [44] R. V. Villamil, H. Aranha, M. C. d. A. Alfonso, M. T. Mercadante y S. L. Agostinho, «Stainless steels in orthopaedic implants: fundamentals and corrosion resistance,» *Rev. Bras. Ortop.* 37, 471–476, 2002.
- [45] J. L. V. Gutiérrez, «Empleo de la técnica de espectroscopía de impedancias electroquímicas para la caracterización de biomateriales. Aplicación de una aleación biomédica de Co-Cr-Mo,» Tesis de Máster, Universidad politécnica de Valencia, 2007.
- [46] J. A. D. Silanes, G. V. Salazar y J. M. Vega, «Evaluación de la corrosión mediante métodos electroquímicos como alternativa a la niebla salina,» *Cidetec Surface Engineering*, 2019.
- [47] T. Groth, P. Falck y R.-R. Miethke, «Cytotoxicity of Biomaterials — Basic Mechanisms and In Vitro Test Methods: A Review,» *Alternatives to laboratory animals: ATLA* 23(6):790-799, 1995.

- [48] T. L. Riss, R. A. Moravec, A. L. Niles, S. Duellman, H. A. Benink, T. J. Worzella y L. Minor, «Cell Viability Assays,» Assay Guidance Manual , 2013 [Updated 2016].
- [49] E. M. L. Alvarez, «Métodos para determinar la viabilidad celular con aplicación en odontología,» Tesis de grado, Facultad de Odontología, Lima-Perú, 2019.
- [50] R. Gonzalez y R. Woods, «Digital image processing,» Upper Saddle River, N. J., vol 1 (Prentice Hall), 2002.
- [51] G. Baxes, «Digital image processing: principles and applications,» Wiley, New York, vol 1 , 1994.
- [52] N. Otsu, «A threshold selection method from gray-level histogram,» IEEE Trans. Syst. Man Cybern SMC-9(1): 62-6., 1979.
- [53] J. Serra, «Image analysis and mathematical morphology,» Academic Press, London, Vol 1, 1982.
- [54] J. Serra, «Image analysis and mathematical morphology,» Academic Press, London, vol 2, 1988.
- [55] L. Ramos-Rivera, J. Dippel y A. R. Boccaccini, «Formation of zein/bioactive glass layers using electrophoretic deposition technique,» The Electrochemical Society, ECS Transactions, 82 (1) 73-80, 2018.
- [56] V. Cabra, R. Arreguin, R. Vazquez-Duhalt y A. Farres, «Effect of temperature and pH on the secondary structure and processes of oligomerization of 19 kDa alpha-zein,» Biochimica et Biophysica Acta 1764, 1110–1118, 2006.
- [57] K. L. Menzies y L. Jones, «The Impact of Contact Angle on the Biocompatibility of Biomaterials,» Optometry and vision science, VOL. 87, NO. 6, PP. 387–399, 2010.
- [58] L. A. Forato, R. Bernardes-Filho y L. A. Colnago, «Protein Structure in KBr Pellets by Infrared Spectroscopy,» ANALYTICAL BIOCHEMISTRY 259, 136–141, 1998.
- [59] M. Cerrutia, D. Greenspan y K. Powers, «Effect of pH and ionic strength on the reactivity of Bioglass 45S5,» Biomaterials 26, 1665–1674, 2005.
- [60] «Zview for Windows, Electrochem. Impedance Software Operating Manual, Part 1,» S.A.I.S. Pines, NC, 1998.

- [61] B. Hirschorn, M. E. Orazem, B. Tribollet, V. Vivier, I. Frateur y M. Musiani, «Determination of effective capacitance and film thickness from constant-phase-element parameters,» *Electrochimica Acta* 55, 6218–6227, 2010.
- [62] F. E. Ciraldo, E. Boccardi, V. Melli, F. Westhauser y A. R. Boccaccini, «Tackling bioactive glass excessive in vitro bioreactivity: Preconditioning approaches for cell culture tests,» *Acta Biomaterialia* 75, 3–10, 2018.