

RESORBOWALNE POKRYCIA POLIMEROWE NA DRUTACH ZE STOPU MAGNEZU MODYFIKOWANE TCP I ZnO

ANNA MORAWSKA-CHOCHÓŁ^{1*}, PATRYCJA DOMALIK-PYZIK¹,
OLGA SIKORA¹, WITOLD RECZYŃSKI², MAGDALENA RZEWUSKA³,
JAN CHŁOPEK¹

¹ AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA W KRAKOWIE,
Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki,
Katedra Biomateriałów,
al. A. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków

² AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA W KRAKOWIE,
Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki,
Katedra Chemii Analitycznej,
al. A. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków

³ SZKOŁA GŁÓWNA GOSPODARSTWA WIEJSKIEGO,
Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Katedra Nauk Przedklinicznych,
ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

*E-MAIL: MORAWSKA@AGH.EDU.PL

Streszczenie

Magnez i jego stopy mogą stanowić obiecującą alternatywę dla tradycyjnie stosowanych biomateriałów metalicznych. Główne zalety materiałów na bazie Mg to: biogodność, biodegradowalność, osteokonduktyność, antybakteryność oraz gęstość i moduł Younga zbliżone do naturalnej kości. Największą wadą jest ich zbyt gwałtowna degradacja, która może prowadzić do gromadzenia się wodoru oraz znacznego wzrostu pH w okolicznych tkankach; a także do przedwczesnej redukcji parametrów mechanicznych. Naukowcy próbują rozwiązać ten problem na różne sposoby: przez dobór pierwiastków stopowych, obróbkę powierzchniową, czy stosowanie pokryć. Przedstawiona praca dotyczy zastosowania resorbowańnych materiałów polimerowych na pokrycia drutów ze stopu magnezu. Powłoki otrzymano metodą zanurzeniową z roztworów polilaktydu (PLA) i polikaprolaktonu (PCL) o różnych stężeniach. Otrzymane materiały inkubowano w buforze fosforanowym i wodzie destylowanej przez 7 tygodni. Monitorowano zmiany pH, przewodnictwa jonowego oraz uwalnianie kationów Mg^{2+} . Wykazano wpływ stężenia roztworu polimeru na jakość pokrycia i skuteczność ochrony antykorozyjnej oraz korzystniejsze parametry powłoki PCL. W drugiej części pracy zaproponowano modyfikację wybranego pokrycia fosforanem trójwapnia (TCP) i tlenkiem cynku (ZnO), które zostały wprowadzone do matrycy polimerowej. Badania właściwości mechanicznych wykazały, że w rezultacie równoczesnego zastosowania TCP i ZnO wzrasta moduł Younga, a spada wytrzymałość i odkształcalność folii PCL/TCP/ZnO, jednak nie powinno to wpływać niekorzystnie na skuteczność pokrycia. Analizy SEM i EDS powierzchni próbek inkubowanych w SBF potwierdziły potencjalną bioaktywność opracowanych układów.

Słowa kluczowe: stopy magnezu, polikaprolakton, polilaktyd, fosforan trójwapnia, bioaktywność, pokrycia polimerowe

[Inżynieria Biomateriałów 136 (2016) 28-35]

RESORBABLE POLYMER COATINGS MODIFIED WITH TRICALCIUM PHOSPHATE AND ZINC OXIDE FOR MAGNESIUM ALLOY WIRES

ANNA MORAWSKA-CHOCHÓŁ^{1*}, PATRYCJA DOMALIK-PYZIK¹,
OLGA SIKORA¹, WITOLD RECZYŃSKI², MAGDALENA RZEWUSKA³,
JAN CHŁOPEK¹

¹ AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,
DEPARTMENT OF BIOMATERIALS,
MICKIEWICZ AV. 30, 30-059 KRAKOW, POLAND

² AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,
DEPARTMENT OF ANALYTICAL CHEMISTRY,
MICKIEWICZ AV. 30, 30-059 KRAKOW, POLAND

³ WARSAW UNIVERSITY OF LIFE SCIENCES - SGGW,
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE,
DEPARTMENT OF PRECLINICAL SCIENCES,
UL. CISZEWSKIEGO 8, 02-786 WARSZAWA, POLAND

*E-MAIL: MORAWSKA@AGH.EDU.PL

Abstract

Magnesium and its alloys can be a promising alternative for traditionally used metallic biomaterials due to their: biocompatibility, biodegradability, osteoconductivity, antibacterial activity, and resemblance of density and Young's modulus to the natural bone. Rapid corrosion, Mg alloys main disadvantage, causes hydrogen accumulation, harmful pH level increase in surrounding tissues, and premature loss of mechanical parameters. In order to solve those issues, scientists select appropriate alloying elements and apply different surface treatments or coatings. This research considers application of resorbable polymers as coating materials for magnesium alloy wires. Samples were dip-coated with various concentration polylactide (PLA) and polycaprolactone (PCL) solutions. Immersion tests were conducted for 7 weeks in phosphate buffered saline and distilled water; pH and ionic conductivity changes, and release of Mg^{2+} ions were monitored. We show the influence of polymer solution concentration on the coating quality and effectiveness of anticorrosive protection, as well as superior parameters of polycaprolactone. In the second part of the study, selected coating was modified with tricalcium phosphate (TCP) and zinc oxide (ZnO), that were incorporated into the polymer matrix. Mechanical studies revealed that after modification with those two types of particles Young's modulus increased, while tensile strength and elasticity of the foils decreased, however it should not affect the effectiveness of the coating. SEM and EDS analysis confirmed potential bioactivity of investigated materials.

Keywords: magnesium alloys, polycaprolactone, polylactide, tricalcium phosphate, bioactivity, polymer coatings

[Engineering of Biomaterials 136 (2016) 28-35]

Wprowadzenie

Magnez i jego stopy są obecnie jednymi z najbardziej obiecujących biomateriałów metalicznych, które mogą znaleźć zastosowanie między innymi jako implanty ortopedyczne [1-4]. To szczególne zainteresowanie można tłumaczyć korzystnymi właściwościami mechanicznymi i biologicznymi oraz zdolnością magnezu i jego stopów do biodegradacji. Implanty tradycyjnie stosowane w ortopедii, np. do zespołów kostnych to w większości niedegradowalne materiały metaliczne, które wymagają przeprowadzenia dodatkowej operacji usunięcia implantu, gdy ten spełni już swoją funkcję [5]. Natomiast odpowiednio zaprojektowany i przygotowany implant wykonany ze stopów magnezu powinien ulec kontroloowanej resorpcji, eliminując konieczność narządzania pacjenta na powtórną interwencję chirurgiczną. Również z perspektywy właściwości mechanicznych magnez ma dużą przewagę nad pozostałymi biomateriałami metalicznymi (jak np. stopy tytanu), gdyż jego gęstość i moduł Younga są zbliżone do naturalnej kości, dzięki czemu można wyeliminować ryzyko przeszytnienia kości i w konsekwencji jej zaniku w miejscu implantacji. Magnez i jego stopy są także korzystniejsze z biologicznego punktu widzenia. Po pierwsze Mg jest pierwiastkiem naturalnie występującym w ludzkim organizmie, w dużej części właśnie w tkance kostnej; poza tym ma właściwości osteokonduktywne i wykazuje działanie antybakterystyczne [6-8].

W przedstawionym wcześniej kontekście biodegradowalność magnezu jest bardzo istotną zaletą, jednak nie można zapomnieć o problemie gwałtownego przebiegu owej degradacji zwłaszcza w agresywnym środowisku płynów biologicznych, w którym główną rolę odgrywają anioni chlorkowe. Zbyt szybka degradacja magnezu może prowadzić do nagromadzenia wodoru, niebezpiecznego wzrostu pH w tkankach wokół implantu oraz przedwczesnej utraty właściwości mechanicznych [5]. Pracując nad rozwiązyaniem tego problemu, naukowcy sięgają po różne środki – od dobrania odpowiedniego składu stopu, poprzez obróbkę powierzchniową [9], aż po stosowanie rozmaitych pokryć, głównie ceramicznych [5] i polimerowych [10,11]. Pokrycia ceramiczne na bazie fosforanów wapnia są oczywistym wyborem ze względu na zwiększenie potencjału bioaktywnego i związaną z tym integrację implant-tkanka kostna. Jednak krucha ceramika niezbyt dobrze współpracuje z powierzchnią metalu, co wiąże się z ryzykiem pojawienia się mikropęknięć i osłabieniem ochrony antykorozyjnej. Kompromisem może być zastosowanie pokryć kompozytowych na bazie polimerów biodegradowalnych, które pozwolą na wprowadzenie bioaktywnych modyfikatorów ceramicznych, zachowując jednocześnie elastyczność powłoki i dobrą przyczepność do podłożu [12].

Polimerami stosowanymi na biozgodne i biodegradowalne pokrycia implantów metalicznych są np. PLA (poli(L-laktyd)) i PCL (poli(ε-kaprolakton)). PCL jest polimerem semi-krystalicznym (temperatura przejścia szklistego (T_g) -60°C), o właściwościach hydrofobowych i znacznej odkształcalności. Biomedyczne zastosowania polikaprolaktonu obejmują m.in.: systemy dostarczania leków, nici chirurgiczne, opatrunki ran, implanty do zespołów oraz rusztowania dla inżynierii tkankowej [13]. PLA charakteryzuje się wysoką (jak na materiały polimerowe) wytrzymałością, modelem Younga i długim czasem resorpcji. Oba te polimery pozwalają na wprowadzenie do matrycy różnych faz modyfikujących i tym samym otrzymanie pokrycia kompozytowego o zaprojektowanych właściwościach. W poniższej pracy zaproponowano dwa dodatki: β-trójfosforan wapnia (TCP), który pozwala na uzyskanie bioaktywności [14] oraz tlenek cynku (ZnO) posiadający właściwości antybakterystyczne [15].

Introduction

Magnesium and its alloys are currently one of the most promising metallic biomaterials which can be used for orthopaedic implants [1-4]. This particular interest can be explained by favourable mechanical and biological properties, and the ability of magnesium and its alloys to biodegrade. Traditionally used orthopaedic implants (e.g. for bone unions) are mainly stable metallic materials that require revision surgery once the implant has fulfilled its task [5]. Properly designed and pretreated magnesium alloy implant should undergo resorption in a controllable manner, eliminating the need for additional surgical procedure. Also from mechanical perspective, magnesium has superior properties as compared to the rest of metallic biomaterials (e.g. titanium alloys) due to similarity of its density and Young's modulus to the properties of natural bone, which eliminates the risk of bone loss in the implantation area. Magnesium and its alloys are also beneficial from biological point of view. Mg is an element naturally occurring in human organism, mainly in bone tissue; moreover it has osteoconductive and antibacterial properties [6-8].

In the previously presented context, biodegradability of magnesium is an important asset, but one cannot forget about the rapid nature of Mg degradation, especially in the aggressive environment of biological fluids, in which chloride anions predominate. Rapid degradation of magnesium can cause hydrogen accumulation, harmful pH level increase in surrounding tissues, and premature loss of mechanical parameters [5]. Scientists try to solve this problem in many different ways – from choosing an appropriate alloying composition, through surface treatments [9], to application of various coatings, mostly ceramic [5] and polymeric [10,11]. Ceramic coatings based on calcium phosphates are an obvious choice due to increase in bioactive potential and associated bone tissue-implant integration. However, brittle ceramic works poorly with metal surface, what can result in microcracks occurrence and weakening of anticorrosive protection. A compromise may be the use of composite coatings based on biodegradable polymers, which allow the incorporation of bioactive ceramic modifiers, while maintaining coating elasticity and good adhesion to the substrate [12].

Polymers used for biocompatible and biodegradable coatings of metallic implants are, e.g. PLA (poly(L-lactide)) and PCL (poly(ε-caprolactone)). PCL is a semi-crystalline polymer (glass transition temperature (T_g) -60°C), of hydrophobic properties and relatively high strain. PLA is characterized by high (as for polymeric materials) strength and Young's modulus, and long resorption time. Biomedical application of polycaprolactone and polylactide include: drug delivery systems, surgical sutures, wounds dressings, fixation implants and tissue engineering scaffolds [13]. Both those polymers allow to introduce various modifying phases into the matrix and in this way produce composite coatings with designed properties. We used two modifiers: β-tricalcium phosphate (TCP), which brings bioactivity [14], and zinc oxide (ZnO), known for antibacterial properties [15].

This work aimed at evaluating the possibility of application of polymer matrix-tricalcium phosphate-zinc oxide composite system as multifunctional, biodegradable coating for magnesium alloy wires. In the first step, appropriate solution concentration and polymer were chosen; next the influence of modifiers on the bioactivity of the composite system was assessed.

Praca miała na celu ocenę możliwości zastosowania układu kompozytowego matryca polimerowa-fosforan trój-wapnia-tlenek cynku na wielofunkcyjne, biodegradowalne pokrycia drutów wykonanych ze stopu magnezu. W pierwszym kroku dokonano selekcji stężenia i rodzaju polimeru, a następnie oceniono wpływ zastosowanych dodatków na bioaktywność układu.

Materiały i metody

Jako modelowego materiału magnezowego, użyto drutów ze stopu magnezu (Mg, Leibniz University of Hannover, Institute of Materials Science; $d = 0.97$ mm) o następującym składzie: do 88% Mg, 3% Al, 9% Li i do 1% Ca. W pierwszym kroku zastosowano obróbkę powierzchniową. Druty Mg poddano trawieniu przez 30 s w roztworze trawiącym (19 g 100% kwasu octowego, 5 g azotanu (V) sodu, 100 mL wody destylowanej), następnie płukano w wodzie destylowanej (dH_2O) i suszono (20 min., 70°C). Tak przygotowane próbki zostały pokryte różnymi roztworami polimerowymi przy pomocy metody zanurzeniowej.

Pierwsza część badań miała na celu określenie wpływu rodzaju polimeru użytego na pokrycie na jego skuteczność, dlatego przygotowano różne typy roztworów pokryciowych. Poli(L-laktyd) (PLA, Ingeo™ 3051D, Nature Works LCC) i poli(ϵ -kaprolakton) (PCL, Sigma-Aldrich, Mn = 80 000) rozpuszczono w dichlorometanie (DCM, Avantor Performance Materials Poland S.A.) uzyskując roztwory o stężeniu 10% w/v, 25% w/v, 50% w/v dla PLA i 10% w/v dla PCL, oznaczane w dalszej części jako PLA10, PLA25, PLA50 i PCL10. Próbki inkubowano w wodzie destylowanej (dH_2O) i buforowanym roztworze soli fosforanowych (PBS; o składzie 1,37 M NaCl, 14,7 mM KH_2PO_4 , 78,1 mM Na_2HPO_4 , 26,8 mM KCl) przez 7 tygodni, z cotygodniowym pomiarem pH i przewodnictwa jonowego. Uwalnianie kationów Mg określono przy pomocy Atomowej Spektrometrii Absorpcyjnej (ASA), techniką płomieniową (Perkin Elmer 3110; $\lambda = 285.2$ nm).

W drugiej części przygotowano pokrycia kompozytowe: fosforan trójwapnia (TCP) (5% wag.) i/lub tlenek cynku (ZnO) (5% wag.) rozpuszczono w DCM, zhomogenizowano przez sonifikację i następnie dodano do wybranego roztworu polimerowego (PCL) tak, by finalnie osiągnąć to samo stężenie (10% w/v). Analogicznie jak w pierwszej części, druty pokrywano metodą zanurzeniową. Przeprowadzono charakterystykę właściwości mechanicznych polikaprolaktonu i jego kompozytów użytych na pokrycia wykonując próbę rozciągania na uniwersalnej maszynie wytrzymałościowej (Zwick 1435) – określono wytrzymałość na rozciąganie (Rm, MPa), moduł Younga (E, MPa) oraz odkształcenie przy zerwaniu (ϵ_{break} , %). W celu oceny potencjalnej bioaktywności, próbki zanurzono w symulowanym płynie biologicznym (SBF, TABELA 1) w 37°C na okres 4 tygodni, z cotygodniowym pomiarem pH. Morfologia i skład chemiczny wydzielień zostały określone przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM, Nova NanoSEM 200, FEI) z analizatorem EDS.

Materials and Methods

As a model magnesium substrate, magnesium alloy wires (Mg, Leibniz University of Hannover, Institute of Materials Science; $d = 0.97$ mm) with following alloy content: up to 88% Mg, 3% Al, 9% Li and up to 1% of Ca, were used. Firstly surface treatment was applied. Mg wires were etched for 30 s in an etching solution (19 g 100% acetic acid, 5 g sodium nitrate (V), 100 ml distilled water), then rinsed with dH_2O and dried (20 min, 70°C). As prepared samples were covered with different polymer solutions by dip-coating method.

First part of the study aimed at assessing the influence of the type of polymer used as a coating material on its effectiveness, hence different kinds of coating solutions were prepared. Poly(L-lactide) (PLA, Ingeo™ 3051D, Nature Works LCC) and poly(ϵ -caprolactone) (PCL, Sigma-Aldrich, Mn = 80 000) were dissolved in dichloromethane (DCM, Avantor Performance Materials Poland S.A.) to achieve 10% w/v, 25% w/v, 50% w/v solutions for PLA and 10% w/v solution for PCL; indicated herein after as PLA10, PLA25, PLA50 and PCL10. Samples were incubated in distilled water (dH_2O) and phosphate buffered saline (PBS: 1.37 M NaCl, 14.7 mM KH_2PO_4 , 78.1 mM Na_2HPO_4 , 26.8 mM KCl) for 7 weeks, with weekly measurements of pH and ion conductivity. Release of Mg ions was evaluated by Atomic Absorbance Spectrometry (AAS), with flame technique (Perkin Elmer 3110; $\lambda = 285.2$ nm).

In the second part, composite coatings were applied: tricalcium phosphate (TCP) (5 wt%) and/or zinc oxide (ZnO) (5 wt%) were dissolved in dichloromethane (DCM), homogenised by sonification and then added to the chosen polymer solution (PCL) to achieve the same final concentration of 10% w/v. Analogically to the first part, wires were covered by dip-coating method. Polycaprolactone and its composite used for coatings were mechanically characterized by tensile test on universal testing machine (Zwick 1435) – tensile strength (Rm, MPa), Young's modulus (E, MPa) and elongation at maximum force (ϵ_{break} %) were calculated. To evaluate potential bioactivity, samples were immersed in simulated body fluid (SBF, TABLE 1) in 37°C for 4 weeks, with weekly pH monitoring. Morphology and chemical composition of the precipitates were assessed by scanning electron microscopy (SEM, Nova NanoSEM 200, FEI) with EDS analysis.

TABELA 1. Skład chemiczny symulowanego płynu biologicznego.

TABLE 1. Chemical composition of simulated body fluid.

Jon Ion	Stężenie jonów Ion concentration [mM]
Na^+	142.00
K^+	5.00
Mg^{2+}	1.50
Ca^{2+}	2.50
HCO_3^-	4.20
HPO_4^{2-}	1.00
SO_4^{2-}	0.50
Cl^-	147.96

Wyniki i dyskusja

Wpływ stężenia roztworu i rodzaju polimeru

W celu ochrony drutów ze stopów magnezyjowych przed zbyt gwałtowną degradacją zastosowano pokrycia polimery. Na podstawie przedstawionych poniżej zmian pH i przewodnictwa roztworu PBS i wody destylowanej oceniono skuteczność pokryć PLA i PCL oraz wpływ stężenia roztworu PLA, z którego nanoszono powłoki.

Przedstawione na RYS. 1 zmiany pH roztworu PBS, w którym inkubowano otrzymane próbki, wskazują wyraźny wpływ stężenia roztworu PLA z którego nanoszono powłoki na szybkość zmian wartości pH. Różnice były widoczne już po 4 dniach inkubacji, wykazując najmniejszą skuteczność powłok PLA10 i PLA50 i pogłębiały się od 4 tygodnia inkubacji, gdzie dla próbki Mg_PLA10 odnotowano wartość pH ok. 11. Wskazuje to na najmniejszą skuteczność powłoki PLA10. Co istotne, powłoka PCL otrzymana z takiego samego stężenia roztworu wykazywała najlepszą skuteczność w ochronie drutu magnezyjowego, umożliwiając stopniowy i równomierny wzrost pH.

Jak wskazuje RYS. 2, wzrost pH wody destylowanej związany z uwalnianiem magnezu następuje stopniowo w całym okresie inkubacji osiągając po 7 tygodniach wartość 8,4 dla Mg_PCL10 i 9,3 dla Mg_PLA25. Większy wzrost pH odnotowano dla pokrycia polilaktydowego i tendencja ta utrzymywała się w całym okresie obserwacji. Co istotne, wartości pH wody destylowanej są znacznie niższe niż roztworu PBS, pomimo jego buforujących właściwości, co wskazuje na wyraźnie szybszą degradację drutów w buforze fosforanowym.

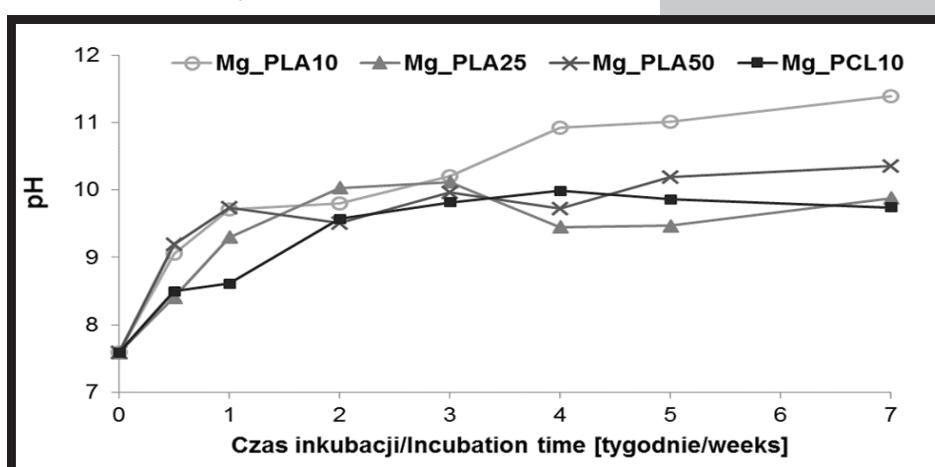
Results and Discussions

The influence of solution concentration and polymer type

In order to protect magnesium alloy wires from rapid corrosion, polymer coatings were applied. Based on pH and conductivity changes of PBS solution and distilled water presented below, efficiency of PLA and PCL coatings, and the influence of PLA solution concentration were assessed.

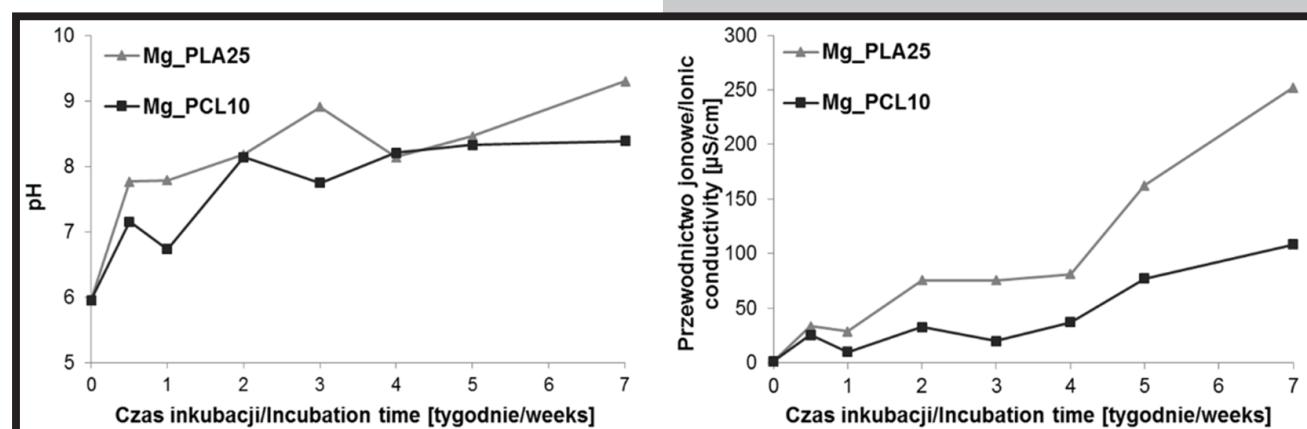
Changes of PBS buffer pH presented in FIG. 1 show clear influence of the initial solution concentration of the PLA coating on the rate of pH value changes. Differences in the pH were already visible after 4 days of incubation, demonstrating the lowest effectiveness of the PLA10 and PLA50 coatings. They increased after 4 weeks of incubation, when pH of approx. 11 was recorded for sample Mg_PLA10. It may suggest that the PLA10 was the least effective as the coating material. PCL coating from the same solution concentration showed the highest effectiveness in the magnesium alloy wire protection, allowing gradual and steady pH level increase.

FIG. 2 shows differences in the pH and ionic conductivity of the distilled water in which Mg samples coated with either PLA25 or PCL10 were immersed. pH level increase related to Mg ions release occurred gradually through the whole incubation period reaching, after 7 weeks, the value of 8.4 for Mg_PCL10 and 9.3 for Mg_PLA25. In general, higher increase in pH was observed for polylactide coated samples. Importantly, the pH of distilled water was much lower than of the PBS solution, despite buffering properties of the latter, which indicates a more rapid resorption of the wires in the phosphate buffered saline.



RYS. 1. Zmiany pH podczas 7-tygodniowej inkubacji w buforze fosforanowym (PBS) próbek Mg pokrywanych PLA10, PLA25, PLA50 i PCL10.

FIG. 1. pH changes during 7-week incubation in phosphate buffered saline (PBS) of PLA10, PLA25, PLA50 and PCL10 covered Mg samples.



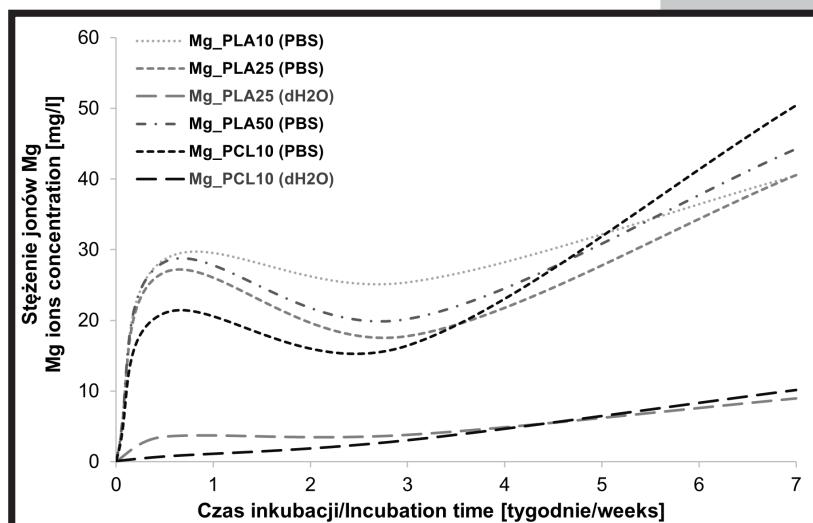
RYS. 2. Zmiany pH oraz przewodnictwa jonowego podczas inkubacji w wodzie destylowanej próbek Mg pokrywanych PLA25 i PCL10.

FIG. 2. pH and ion conductivity changes during incubation in distilled water of PLA25 and PCL10 covered Mg samples.

Podobną zależność można zaobserwować na podstawie zmian przewodnictwa wody destylowanej (RYS. 2), gdzie różnice są znacznie bardziej widoczne i wskazują na większą skuteczność pokrycia PCL. Niezwykle istotny jest stopniowy i równomierny przebieg degradacji drutu, tak aby możliwe było stopniowe odprowadzanie wodoru będącego produktem korozji magnezu. Równocześnie, stopniowe uwalnianie magnezu i tworzenie jego wodorotlenku zapewnia ciągłą alkalizację środowiska, której efektem jest działanie bakteriobójcze materiałów na bazie stopów magnezu [16,17].

Wyniki uwalniania jonów Mg^{2+} potwierdzają najlepszą skuteczność powłoki PCL, zwłaszcza w początkowym okresie inkubacji, zarówno w PBS jak i w wodzie destylowanej (RYS. 3). Po 7 tygodniu wszystkie powłoki przestają już pełnić funkcję ochronną. Przedstawione wyniki wskazują na znacznie wyższe stężenie jonów Mg^{2+} w roztworze PBS niż w wodzie destylowanej, co potwierdza powyższe obserwacje, że bufor fosforanowy jest bardziej agresywnym środowiskiem.

Przedstawione wyniki dla różnych powłok PLA potwierdzają najlepszą skuteczność powłoki PLA25, a najniższą PLA10, co szczególnie widoczne jest po 3 tygodniach inkubacji. Stężenie roztworu wpływało na grubość nanoszonych powłok, stąd powłoka PLA10 jako najcięńsza wykazywała najmniejszą ochronę drutu Mg przed resorpcją. Z drugiej strony, duże stężenie roztworu (50%) skutkowało trudnościami w równomiernym pokryciu drutu. Przedstawione wyniki wskazują, że dla PLA nanoszonego ze stężeniem 25% osiągnięto kompromis między grubością powłoki a jej równomiernym pokryciem na całej powierzchni drutu, a w konsekwencji najskuteczniejszą jego ochronę przed degradacją. Z drugiej strony, dla PCL o stężeniu 10% osiągnięto największą skuteczność w porównaniu do omówionych powłok PLA, co wydaje się być satysfakcyjujące. Wyższe stężenia PCL znacznie utrudniały nanoszenie powłok. Biorąc pod uwagę omówione wyniki, do drugiego etapu badań wytypowano powłoki na bazie polikaprolaktonu.



RYS. 3. Zmiany zawartości jonów Mg^{2+} podczas inkubacji w wodzie destylowanej i PBS drutów Mg pokrytych PLA10, PLA25, PLA50 oraz PCL10.
FIG. 3. Mg^{2+} ions concentration during immersion in distilled water and PBS of PLA10, PLA25, PLA50 and PCL10 covered Mg alloy wires.

Modyfikacja PCL dodatkami aktywnymi biologicznie (TCP, ZnO)

Powłokę PCL10 (dalej jako 'PCL'), jako najbardziej skuteczną w ochronie stopów magnezu przed zbyt gwałtowną degradacją poddano modyfikacji dodatkami ceramicznymi w celu nadania jej odpowiednich cech biologicznych. Inkorporacja TCP powinna zapewnić działanie bioaktywne, a ZnO został użyty jako materiał o działaniu antybakteryjnym. Oceniono wpływ stosowanych modyfikatorów ceramicznych na właściwości mechaniczne folii polimerowych oraz na bioaktywność drutów ze stopów magnezu pokrytych PCL modyfikowanym TCP i ZnO.

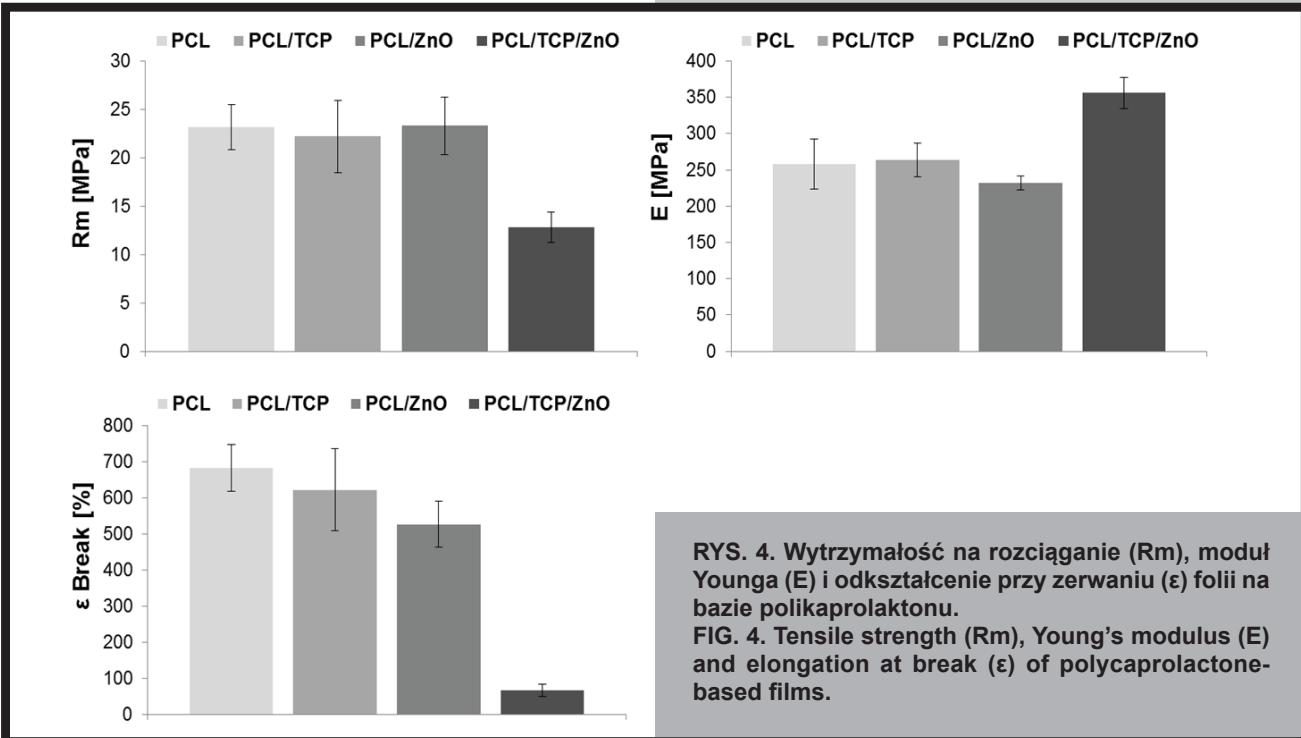
We observed similar pattern in the changes of ionic conductivity (FIG. 2), where the differences were even more visible and indicated an overall higher effectiveness of the PCL coating. Gradual resorption of the magnesium wire is important to allow gradual release of hydrogen (by-product of magnesium corrosion). At the same time, gradual release of magnesium and formation of its hydroxide provides continuous alkalization of the surrounding environment, which results in the antibacterial activity of magnesium alloy-based materials [16,17].

Mg^{2+} ions release studies confirmed the highest effectiveness of the PCL coating, especially during first few days of incubation in both: phosphate buffered saline and distilled water (FIG. 3). All of the coatings lost their protective function after seven weeks of incubation. Presented results show higher concentration of Mg^{2+} ions in the PBS solution, than in distilled water, what confirms above observations that phosphate buffer is a more aggressive environment.

Results presented for different PLA coatings confirm the best effectiveness of the PLA25 coating, and the lowest of the PLA10, what is especially visible after 3 weeks of incubation. Concentration of the polymer solution affected the coating thickness; PLA10 coating, the thinnest one, was the least effective as the Mg wire anticorrosive protection. On the other hand, high solution concentration (50%) resulted in difficulties in even coverage of the wire. With PLA coating from 25% solution concentration, we compromised between the coating thickness and its even deposition on the entire surface of the wire, and in consequence the most effective anticorrosive protection was achieved. Moreover, the PCL of 10% concentration was more effective than all of the different PLA coatings. Higher concentrations of PCL hindered the dip-coating. Based on the achieved results, PCL coatings were selected for further studies.

Modification of PCL with biologically active particles (TCP, ZnO)

The PCL10 coating (herein after as 'PCL'), as the most effective in magnesium alloys protection from rapid resorption, was modified with ceramic additives to achieve appropriate biological properties: TCP incorporation should ensure bioactivity, while ZnO should secure antibacterial activity. We evaluated the influence of the applied ceramic modifiers on mechanical properties of the polymer foils and bioactivity of the magnesium alloy wires covered with TCP and ZnO modified PCL.



RYS. 4. Wytrzymałość na rozciąganie (R_m), moduł Younga (E) i odkształcenie przy zerwaniu (ϵ) folii na bazie polikaprolaktonu.

FIG. 4. Tensile strength (R_m), Young's modulus (E) and elongation at break (ϵ) of polycaprolactone-based films.

Badania mechaniczne folii

Przeprowadzone badania mechaniczne nie wykazały istotnego wpływu zastosowania samego TCP i samego ZnO na wytrzymałość na rozciąganie oraz moduł Younga materiałów (RYS. 4). Zaobserwowano natomiast niewielki spadek odkształcalności po wprowadzeniu do matrycy ZnO. Wynika to zapewne z faktu, że wpływ na parametry mechaniczne ma wielkość uziarnienia stosowanych napełniaczy. Przy takim samym udziale procentowym (5%), nanometryczny TCP nie wpływał istotnie na żaden z mierzonych parametrów, natomiast dodatek mikrometrycznego ZnO spowodował obniżenie odkształcalności. Równoczesne zastosowanie obu typów modyfikatorów spowodowało wzrost modułu Younga oraz obniżenie wytrzymałości i odkształcalności. Związane jest to ze zwiększeniem udziału napełniaczy, których sumaryczna zawartość wyniosła 10%. Jednak w dalszym ciągu parametry mechaniczne układu PCL/TCP/ZnO, w tym szczególnie moduł Younga, nie powinny powodować niekorzystnego wzrostu naprężeń wewnętrznych w powłoce polimerowej, jak to ma miejsce w przypadku znacznie sztywniejszego polilaktydu [12].

Ocena bioaktywności

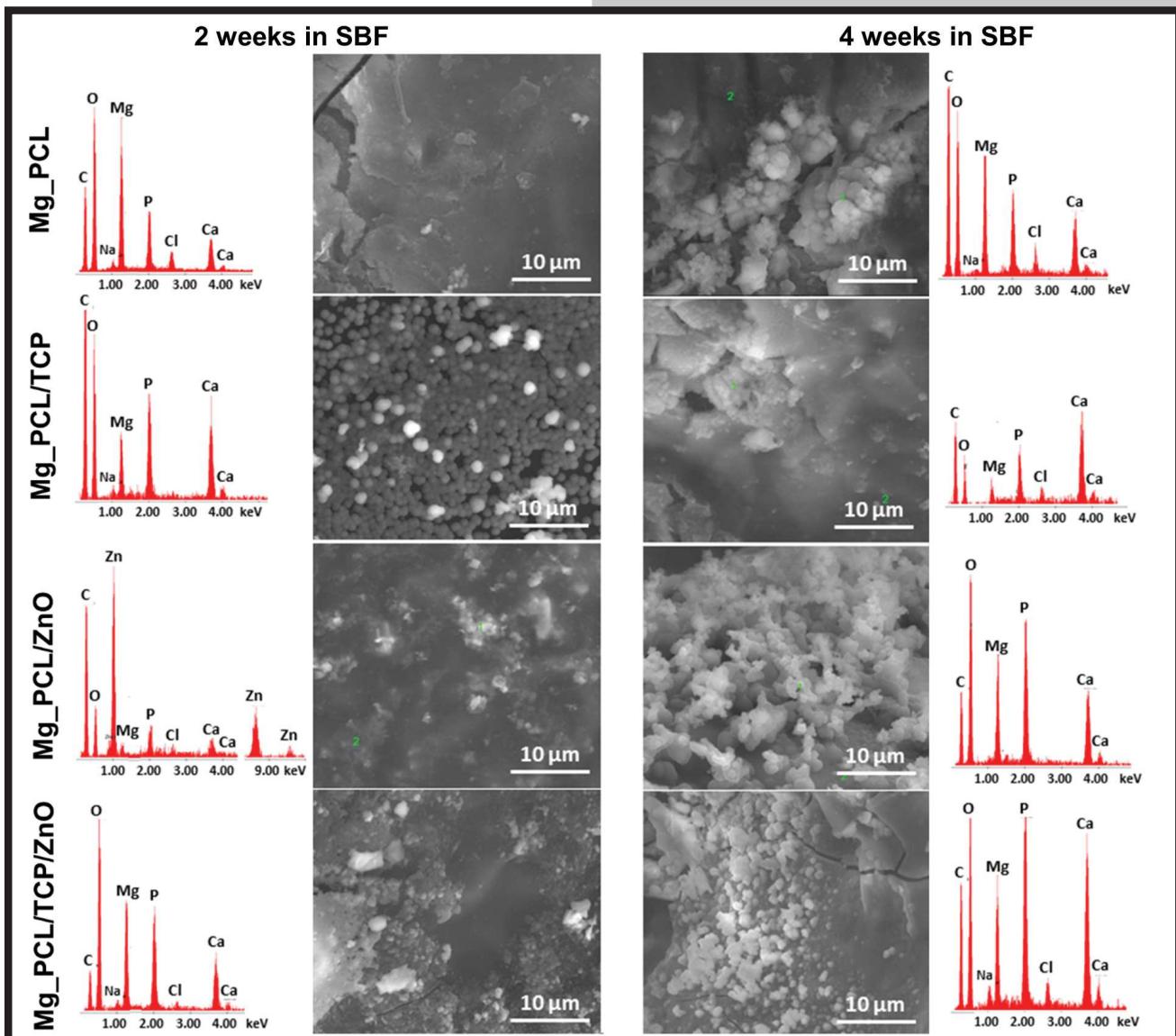
Inkubacja w symulowanym płynie biologicznym (SBF) pozwala na określenie potencjalnej bioaktywności materiału. Analizy SEM i EDS (RYS. 5) potwierdziły obecność wydzielów fosforanowo-wapniowych na powierzchni próbek inkubowanych w SBF przez okres 2 i 4 tygodni. Zaobserwowano także tlenki magnezu, powstałe w wyniku degradacji drutów ze stopu magnezu. Różnice w ilości powstałych wydzielów apatytowych (CaP) na poszczególnych materiałach są szczególnie wyraźne po 2 tygodniach inkubacji w SBF. Najwięcej wytrąconych fosforanów wapnia widocznych jest na powierzchniach materiałów zawierających dodatek TCP (Mg_PCL/TCP i Mg_PCL/TCP/ZnO), najmniej natomiast na drutach Mg pokrytych samym PCL. Zarówno morfologia wydzielów jak i analiza EDS wskazują na obecność wydzielów apatytowych. Co istotne, dodatek ZnO również przyspieszył wzrost apatytów w porównaniu do samego PCL. Analiza EDS wskazuje, że w powstających apatybach mogą wystąpić podstawienia wapnia jonami cynku. Ponadto, wysoka zawartość magnezu w analizie EDS wszystkich materiałów może wskazywać na podstawianie wapnia jonami magnezu.

Mechanical studies

Mechanical studies revealed that TCP and ZnO used separately do not affect the tensile strength and Young's modulus of the composite materials (FIG. 4). However, small decrease in elongation was observed when the ZnO was used. Particle size influences mechanical parameters: with the same percentage (5 wt%) nanometric TCP did not affect studied parameters, while micrometric ZnO caused decrease in elongation. Simultaneous application of both modifiers resulted in increase in Young's modulus and decrease in strength and elongation. It relates to the increase in modifiers content, which achieved 10% in total. Mechanical parameters of the PCL/TCP/ZnO, including Young's modulus, should not cause the unfavourable increase in internal stresses of polymer coating, which is typical for much stiffer polylactide [12].

Bioactivity assessment

Incubation in simulated body fluid (SBF) allows to predict potential bioactivity of a material. SEM and EDS analysis (FIG. 5) confirmed presence of the calcium-phosphate precipitations on the surface of the samples immersed in SBF for 2 and 4 weeks. Magnesium oxides, products of magnesium alloy wires degradation, were also observed on the surface of the samples. Differences in the amount of apatites (CaP) deposited on the surface of each type of the samples were especially visible after 2 weeks incubation in the SBF. The most calcium phosphates were visible on the surface of the composites with addition of TCP and TCP/ZnO compounds, the least on the surface of the PCL coated wires. Both, analysis of the precipitates morphology and EDS analysis, indicated the presence of the apatites. What's important, addition of ZnO increased rate of apatites growth, as compared to PCL. EDS analysis showed that in the formulated apatites, calcium ions may be substituted with zinc ions. High content of magnesium, visible in the EDS spectra, may suggest substitution of calcium ions also with magnesium.



RYS. 5. Obrazy SEM wraz z analizą EDS powierzchni drutów magnezowych pokrytych PCL, PCL/TCP, PCL/ZnO i PCL/TCP/ZnO, inkubowanych w SBF przez 2 (lewa kolumna) i 4 tygodnie (prawa kolumna).

FIG. 5. SEM images with EDS analysis of PCL, PCL/TCP, PCL/ZnO and PCL/TCP/ZnO covered Mg wires, incubated in SBF solution for 2 (left column) and 4 weeks (right column).

Wnioski

Biomateriały na bazie biodegradowalnych stopów magnezu mogą stanowić obiecującą alternatywę dla powszechnie stosowanych materiałów metalicznych pod warunkiem zapewnienia odpowiedniego zabezpieczenia antykorozjijnego. Przeprowadzone badania pokazały, że istotny wpływ na jakość powłok polimerowych i skuteczność ochrony stopów magnezu przed działaniem środowiska zewnętrznego ma wyjściowe stężenie roztworu, z którego nanoszono powłokę. Lepsze zabezpieczenie antykorozjijnje uzyskano przy zastosowaniu powłok z polikaprolaktonu, w porównaniu do polilaktu. Dzięki wprowadzeniu do matrycy PCL fosforanu trójwspornia i tlenku cynku uzyskano pokrycia o właściwościach bioaktywnych, zachowując korzystne parametry mechaniczne polikaprolaktonu.

Podziękowania

Badania zostały wykonane w ramach grantu dziekański nr 15.11.160.019 Wydziału Inżynierii Materiałowej i Ceramiki, Akademii Górnictwa-Hutniczej w Krakowie.

Conclusions

Biomaterials based on biodegradable magnesium alloys can be a promising alternative for commonly used metallic materials providing proper anticorrosive protection. Our investigations showed that initial concentration of the coating solution affects the quality of the polymer coatings and their efficiency to protect magnesium alloys from the surrounding environment. We achieved better anticorrosive protection when polycaprolactone coatings were used, in comparison to polylactide. Thanks to incorporation of tricalcium phosphate and zinc oxide into the PCL matrix, we obtained bioactive coatings, while maintaining beneficial mechanical parameters of polycaprolactone.

Acknowledgments

This research was financed by the Dean grant No 15.11.160.019 of Faculty of Materials Science and Ceramics, AGH University of Science and Technology, Krakow, Poland.

References

Pismiennictwo

- [1] Witte F.: The history of biodegradable magnesium implants: A review, *Acta Biomater.* 6 (2010) 1680-1692.
- [2] Persaud-Sharma D., McGoron A.: Biodegradable Magnesium Alloys: A Review of Material Development and Applications., *J. Biomimetics, Biomater. Tissue Eng.* 12 (2012) 25-39. doi:10.4028/www.scientific.net/JBBTE.12.25.
- [3] Cifuentes S.C., Frutos E., González-Carrasco J.L., Muñoz M., Multigner M., Chao J., et al.: Novel PLLA/magnesium composite for orthopedic applications: A proof of concept, *Mater. Lett.* 74 (2012) 239-242. doi:10.1016/j.matlet.2012.01.134.
- [4] Li N., Zheng Y.: Novel Magnesium Alloys Developed for Bio-medical Application: A Review, *J. Mater. Sci. Technol.* 29 (2013) 489-502. doi:10.1016/j.jmst.2013.02.005.
- [5] Iskandar M.E., Aslani A., Tian Q., Liu H.: Nanostructured calcium phosphate coatings on magnesium alloys: characterization and cytocompatibility with mesenchymal stem cells, *J. Mater. Sci. Med.* 26 (2015) 189. doi:10.1007/s10856-015-5512-5.
- [6] Staiger M.P., Pietak A.M., Huadmai J., Dias G.: Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: a review., *Biomaterials.* 27 (2006) 1728-34. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.10.003.
- [7] Cifuentes S.C., Bensamar F., Gallardo-Moreno A.M., Osswald T.A., González-Carrasco J.L., Benavente R., et al.: Incorporation of Mg particles into PDLLA regulates mesenchymal stem cell and macrophage responses, *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 104A (2016) 866-878. doi:10.1002/jbm.a.35625.
- [8] Cifuentes S.C., Gavilán R., Lieblich M., Benavente R., González-Carrasco J.L.: In vitro degradation of biodegradable polylactic acid/magnesium composites: Relevance of Mg particle shape., *Acta Biomater.* 32 (2016) 348-357. doi:10.1016/j.actbio.2015.12.037.
- [9] Drynda A., Hassel T., Hoehn R., Perz A., Bach F.W., Peuster M.: Development and biocompatibility of a novel corrodible fluoride-coated magnesium-calcium alloy with improved degradation kinetics and adequate mechanical properties for cardiovascular applications, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 93 (2010) 763-775. doi:10.1002/jbm.a.32582.

- [10] Xu L., Yamamoto A.: Characteristics and cytocompatibility of biodegradable polymer film on magnesium by spin coating, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 93 (2012) 67-74. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.12.009.
- [11] Witecka A., Yamamoto A., Idaszek J., Chlenda A., Świeszkowski W.: Influence of biodegradable polymer coatings on corrosion, cytocompatibility and cell functionality of Mg-2.0Zn-0.98Mn magnesium alloy, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 144 (2016) 284-292. doi:10.1016/j.colsurfb.2016.04.021.
- [12] Johnson I., Michelle Wang S., Silken C., Liu H.: A systemic study on key parameters affecting nanocomposite coatings on magnesium substrates, *Acta Biomater.* 36 (2016) 332-349. doi:10.1016/j.actbio.2016.03.026.
- [13] Woodruff M.A., Hutmacher W.: The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century, *Prog. Polym. Sci.* 35 (2010) 1217-1256. doi:10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002.
- [14] Morawska-Chochol A., Domalik-Pyzyk P., Szaraniec B., Chłopek J.: The effect of magnesium alloy wires and tricalcium phosphate particles on apatite mineralization on poly(lactide)-based composites, *Mater. Lett.* 180 (2016) 1-5. doi:10.1016/j.matlet.2016.05.046.
- [15] Sirelkhatim A., Mahmud S., Seenii A., Kaus N.H.M., Ann L.C., Bakhorii S.K.M., et al.: Review on zinc oxide nanoparticles: Antibacterial activity and toxicity mechanism, *Nano-Micro Lett.* 7 (2015) 219-242. doi:10.1007/s40820-015-0040-x.
- [16] Domalik-Pyzyk P., Morawska-Chochol A., Rzewuska M., Szaraniec B., Chłopek J.: Antibacterial activity study of poly(L-lactide) composites for novel biodegradable intramedullary nails, *Eng. Biomater.* 133 (2015) 7-13.
- [17] Morawska-Chochol A., Domalik-Pyzyk P., Chłopek J., Szaraniec B., Sterna J., Rzewuska M., et al.: Gentamicin release from biodegradable poly-L-lactide based composites for novel intramedullary nails, *Mater. Sci. Eng. C.* 45 (2014) 15-20. doi:10.1016/j.msec.2014.08.059.