



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS

ESCUELA DE POSTGRADO Y EDUCACIÓN CONTINUA

SÍNTESIS DE BIOVIDRIOS DOPADOS CON Li Y ÓXIDO DE GRAFENO, Y
CARACTERIZACIÓN DE SUS PROPIEDADES DE REMINERALIZACIÓN Y
ANTIMICROBIANAS, PARA EVALUAR SU POTENCIAL USO EN EL TRATAMIENTO
DE ENFERMEDADES ORALES.

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA,
MENCION CIENCIAS DE LOS MATERIALES

RENÉ ALEJANDRO CASTRO CID

PROFESOR GUÍA:

HUMBERTO PALZA CORDERO

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:

JOSÉ ARIAS BAUTISTA

RODRIGO ESPINOZA GONZÁLEZ

CRISTIAN COVARRUBIAS GALLARDO

PATRICIO SMITH FERRER

RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE: Doctor en Ciencias de la Ingeniería, Mención Ciencias de los Materiales.

POR: René Alejandro Castro Cid.

FECHA: 17/11/2021

PROFESOR GUÍA: Humberto Palza Cordero

**SÍNTESIS DE BIOVIDRIOS DOPADOS CON Li Y ÓXIDO DE GRAFENO, Y
CARACTERIZACIÓN DE SUS PROPIEDADES DE REMINERALIZACIÓN Y
ANTIMICROBIANAS, PARA EVALUAR SU POTENCIAL USO EN EL TRATAMIENTO
DE ENFERMEDADES ORALES.**

El presente trabajo muestra la síntesis y evaluación del efecto del biovidrio (BG), BG dopado con Li (BGLi) y Oxido de Grafeno (GO), sobre procesos de biomineralización; además del efecto antimicrobiano contra bacterias asociadas a caries y periodontitis. Biovidrios y GO promovieron la precipitación de β -TCP e HA en los ensayos de biomineralización, logrando una recuperación de los valores de micro dureza, en tejidos dentales, cuando fueron usados biovidrios sobre éstos. Los ensayos antibacterianos, mostraron que ambos biovidrios inhibieron el crecimiento de *S. mutans* y *P. gingivalis*. BGLi presentó una mayor toxicidad contra *A. actinomycetemcomitans* que BG, con concentraciones inhibitorias de 20 mg/mL y 100 mg/mL, respectivamente. El GO, a 0,05 mg/ml, concentración no citotóxica, también presentó un efecto antimicrobiano.

Podemos concluir que los biovidrios pueden promover la remineralización de tejido dentario, e inhibir el crecimiento de patobiontes orales. La presencia de Li mejora el efecto antibacteriano sobre cepas de *A. actinomycetemcomitans*, sin afectar la bioactividad del biovidrio. La adición de GO no entregó mejores resultados, tanto en ensayos de biomineralización como en ensayos antibacterianos, al ser comparados con biovidrios.

“Solo sé que nada sé”

Sócrates (470-399 a. de. C)

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi amigo, el Profesor Héctor Urrutia, quien me dio el impulso para postular al programa de doctorado, y al Profesor Rodrigo Palma, quien apostó por un cirujano dentista, en un programa de postgrado muy divergente con mi formación profesional.

Gracias a los profesores que me guiaron en este proceso: al Profesor Humberto Palza, mi tutor; a los Profesores Marcos Flores, Rodrigo Espinoza, Víctor Fuenzalida, Octavio Vásquez, Mónica Soler, Aquiles Sepúlveda, Francisco Martínez, Raúl Quijada, Cristian Covarrubias, José Luis Arias, Patricia Palma y Patricio Smith.

Quiero agradecer a Gina Madariaga, por todo su apoyo; a Juan Benavides y a Darna Venegas, por su amistad y compañerismo a toda prueba; a los técnicos de los distintos laboratorios en los que desarrolle mis experimentos y caracterizaciones. Además, una mención a mis compañeros, con quienes pasamos muy buenos momentos durante estos años de estudio.

Gracias a CONICYT, que a través de la Beca Doctorado Nacional N° 21140499 me permitió desarrollar el programa de doctorado, y financiar parcialmente los gastos asociados al desarrollo de esta investigación.

Finalmente quiero agradecer a mi familia, que siempre creyó en mí: a mis padres Marita y René, a mis suegros Nilda y Mario, a mi querida Eto, a mis hijos Consuelo y Nicolás, hinchas incondicionales, y principalmente a mi compañera de vida, mi amiga y esposa Pamela, quien, con su amor, sabiduría y comprensión, fue el pilar fundamental para sacar adelante esta empresa.

PRESENTACIONES EN CONGRESOS

Bioglass® 45S5 doped with Lithium as a Potential Biomaterial for Treatment of Early Dental Caries. 66th ORCA Congress. Cartagena, Colombia, 3-6 July, 2019.

Desarrollo de un Papel de Óxido de Grafeno para Bioaplicaciones. Análisis del Grado de Oxidación. IV Congreso Nacional de Nanotecnologías. Olmué, Chile, 5 al 7 de septiembre de 2016.

Obtención y Caracterización de Nanopartículas de $\text{CaCu}_3\text{Ti}_4\text{O}_{12}$ por Método Semi-Húmedo, Sol- Gel e Hidrotermal, VII Escuela de Nanoestructuras, Universidad Federico Santa María, Valparaíso, Chile, 6 al 9 de enero 2015.

Preparation and Characterization of $\text{CaCu}_3\text{Ti}_4\text{O}_{12}$ by Semi- Wet and Sol- Gel Methods, Pontificia Universidad Católica De Chile, Santiago, Chile, 11 al 14 de noviembre 2014.

PUBLICACIONES Y PATENTES

Humberto Palza Cordero; René Castro Cid; Mario Díaz Dosque; Rodrigo Cabello Ibacache; Patricia Palma Fluxá. Li-doped bioglass® 45S5 for potential treatment of prevalent oral diseases. Journal of Dentistry. Volume 105, February 2021, 103575.

Cortínez, Diego; Palma Fluxá, Patricia; Castro, René; Palza, Humberto. A multifunctional bi-phasic graphene oxide/chitosan paper for water treatment. Separation and Purification Technology. Volume 235, 18 March 2020, 116181.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
PRESENTACIONES EN CONGRESOS.....	v
PUBLICACIONES Y PATENTES.....	v
TABLA DE CONTENIDOS.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES	
1.1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.2 Estado del Arte.....	2
1.2.1 Biocerámicas y Biovidrios.....	2
1.2.2 Óxido de Grafeno.....	9
1.3 Hipótesis.....	15
1.4 Objetivo General.....	15
1.5 Objetivos Específicos.....	15
CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODO	
2.1 Síntesis de materiales utilizados en el estudio.....	16
2.1.1 Síntesis de BG Y BGLi.....	16
2.1.2 Síntesis de GO.....	17
2.2 Confección de materiales compuestos, usando PCL.....	19
2.3 Ensayos de bioactividad	20

	Página
2.3.1 Ensayo de biomineralización estándar sobre.... tabletas	20
2.3.2 Biomineralización sobre superficie de..... materiales compuestos	21
2.3.3 Bioactividad <i>in vitro</i> , a través de ensayo..... desmineralización- remineralización, sobre esmalte dentario	21
2.4 Ensayo antibacteriano.....	24
2.5 SEM y EDS.....	26
2.6 DRX.....	26
2.7 FTIR.....	27
2.8 Área específica BET.....	27
2.9 Análisis estadístico.....	27
 CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
3.1 Caracterización.....	28
3.1.1 Caracterización de partículas de BG y BGLi.....	28
3.1.2 Caracterización de GO.....	30
3.2 Pruebas de biomineralización.....	33
3.2.1 Pruebas de biomineralización sobre tabletas de... biovidrios	33
3.2.2 Pruebas de biomineralización sobre superficies de compósitos hechos con PCL/BG/BGLi/GO	35
3.2.3 Ensayo de remineralización <i>in vitro</i> sobre esmalte	38
3.3 Actividad antibacteriana.....	44

	Página
3.4 Discusión general.....	49
CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES	
4.1 CONCLUSIONES.....	59
CAPÍTULO V. BIBLIOGRAFÍA	
5.1 BIBLIOGRAFÍA.....	61

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Composición BG y BGLi.	17
Tabla 2	Composición experimental y teórica de biovidrios.	28
Tabla 3	Área específica BET de biovidrios sintetizados por método sol-gel.	30
Tabla 4	Ensayo antibacteriano: cepas de <i>S. mutans</i> ATCC 25175, <i>P. gingivalis</i> ATCC 33277 y <i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC 43718-serotipo b. Log10 CFU/mL. C- (control negativo BHI), C+ (clorhexidina 0,12% CHX), BG (biovidrio 45S5), BGLi (biovidrio 45S5 dopado con Li 5 wt%).	46
Tabla 5	pH: cepas de <i>S. mutans</i> ATCC 25175, <i>P. gingivalis</i> ATCC 33277 y <i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC 43718-serotipo b. C- (control negativo BHI), C+ (clorhexidina 0,12% CHX), BG (biovidrio 45S5), BGLi (biovidrio 45S5 dopado con Li 5 wt%).	47
Tabla 6	Ensayo antibacteriano hecho sobre cepas de <i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC 43718-serotipo b. Log10 UFC / mL, utilizando nitratos de Ca, Na, Li y Ag , en una concentración de 50 mg/mL. BHI (control negativo), CHX (control positivo).	48
Tabla 7	Ensayo antibacteriano hecho sobre cepas de <i>S. mutans</i> ATCC 25175, <i>P. gingivalis</i> ATCC 33277 y <i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC 43718-serotipo b. C- (control negativo BHI), C+ (clorhexidina 0,12% CHX), GO (óxido de grafeno), BG (biovidrio 45S5), BGLi (biovidrio 45S5 dopado con Li 5 wt%).	48

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

		Página
Figura 1	Etapas de lixiviación de vidrios bioactivos, de acuerdo a Hench. Etapa 1: intercambio iónico entre biovidrio cuaternario y SBF. Etapas 2 y 3: ruptura enlaces Si-O-Si, formación de grupos Si-OH, repolimerización ($2\text{Si-OH} \rightarrow \text{Si-O-Si} + \text{H}_2\text{O}$). Etapa 4: formación de fosfato de calcio amorfo. Etapa 5: cristalización de fosfato de calcio amorfo hasta convertirse en hidroxiapatita carbonatada, que involucra captura de iones adicionales como OH^- , CO_3^{2-} y Na^{2+} .	5
Figura 2	Esquema molécula GO. A. Carbono sp^2 ; B. Grupo hidroxilo; C. Grupo epóxido; D. Grupo carboxilo.	10
Figura 3	Síntesis GO mediante método modificado en base a dos ácidos. A. Incorporación de H_2SO_4 y H_3PO_4 (relación 9:1); B. Incorporación de grafito; C. Incorporación KMnO_4 ; D. Vertido solución en vaso con hielo y H_2O_2 al 30%; E. Decantado; F. Eliminación sobrenadante y rescate GO.	18
Figura 4	Proceso de lavado y separación de GO, mediante centrifugado	19
Figura 5	Ensayo de desmineralización-rem mineralización <i>in vitro</i> , sobre la superficie de esmalte dental.	24
Figura 6	DRX muestra picos característicos de las partículas de BG y BGLi después del proceso térmico, demostrando la presencia de diferentes estructuras: o : $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$ (JCPDS N° 22-1455), □ $\text{Na}_2\text{Ca}_3\text{Si}_6\text{O}_{16}$ (JCPDS N° 23-671), + NaNO_3 (01-079-2056), 8 $\text{Ca}(\text{NO}_2)_3$ (JCPDS [07-0204]), = $\text{Ca}(\text{NO}_2)_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (JCPDS [27-0087]), Δ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (JCPDS N° 70-2064), w CaSiO_3 (JCPDS N° 042-0547), * $\text{Li}_2\text{Ca}_4\text{Si}_4\text{O}_{13}$ (JCPDS N° 82-1106), # Li_2SiO_3 (JCPDS N° 554-13-2).	29
Figura 7	DRX realizado sobre muestras de GO, sintetizadas por método experimental propuesto. Comparación con GO sintetizado por método de Hummers, y con grafito sin procesar.	31
Figura 8	FTIR observado en muestra de GO sintetizado por técnica experimental propuesta.	32
Figura 9	XPS observado en muestra de GO, sintetizado por técnica experimental.	32
Figura 10	Pruebas de biomineralización sobre tabletas de biovidrios. Imágenes SEM muestran partículas precipitadas sobre la superficie de las tabletas de BG y BGLi, después de 24 horas (T1) y catorce días (T14). La razón Ca/P de las superficies de biovidrios fue analizada por EDS.	33
Figura 11	DRX muestra picos característicos de diferentes estructuras de BG y BGLi: o : $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$ (JCPDS N° 22-1455), □ $\text{Na}_2\text{Ca}_3\text{Si}_6\text{O}_{16}$ (JCPDS N° 23-671), Δ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (JCPDS N° 70-2064), w CaSiO_3 (JCPDS N° 042-0547), * $\text{Li}_2\text{Ca}_4\text{Si}_4\text{O}_{13}$ (JCPDS N° 82-1106), # Li_2SiO_3 (JCPDS N° 554-13-2). Picos de difracción correspondientes a β β -TCP (JCPDS N° 09-0169) e H HA (JCPDS N° 24-0033) son	34

encontrados también.

	Página
Figura 12	36
Imágenes SEM de materiales compuestos. Porcentaje de área cubierta con depósitos de fosfato de calcio, luego de 56 días de exposición a SBF. a. PCL (control); b. PCLBG (policaprolactona combinada con BG); c. PCLBGLi (policaprolactona combinada con BGLi); d. PCLGO (policaprolactona combinada con GO); e. PCLBGGO (policaprolactona combinada con BG y GO); f. PCLBGLiGO (policaprolactona combinada con BGLi y GO).	
Figura 13	37
Imágenes SEM de materiales compuestos. Relación Ca/P observada, obtenida por análisis EDS, luego de 56 días de exposición a SBF.	
Figura 14	38
DRX materiales compuestos expuestos a SBF por 56 días. Picos de difracciones correspondientes a: P ϵ - Policaprolactona (JCPDS N° 0-1431) e H HA (JCPDS N° 24-0033).	
Figura 15	39
Ensayo <i>in vitro</i> desmineralización- remineralización sobre esmalte dental. Imágenes SEM del grupo Control (esmalte sin tratamiento y sólo en contacto con saliva artificial): A (inicial), B (post ensayo desmineralización), y C (post ensayo remineralización). Relación Ca/P de superficie de esmalte fue analizada por EDS.	
Figura 16	40
Ensayo <i>in vitro</i> de desmineralización- remineralización sobre esmalte dental. Imágenes SEM: A (inicial) y C (post ensayo de remineralización). Tres grupos fueron evaluados: Control (esmalte sin tratamiento y sólo en contacto con saliva artificial), expuestos a BG y a BGLi. La relación Ca/P de BG y BGLi fue analizada por EDS. a. superficie de esmalte, previo al ensayo de desmineralización (inicial), b. esmalte observado en el grupo control (sin ser expuesto a los biovidrios), c. superficie de esmalte sometido a ensayo de remineralización (expuesto a BG), d. superficie de esmalte sometido a ensayo de remineralización (expuesto a BGLi), e. superficie de esmalte sometido a ensayo de remineralización (expuesto a BGLi), con mayor aumento en la imagen.	
Figura 17	42
DRX muestra picos característicos de la superficie de esmalte, después de 15 días de exposición a biovidrios: β β -TCP (JCPDS N° 09-0169), H HA (JCPDS N° 24-0033), C CaO (JCPDS N° 37-1497).	
Figura 18	43
Valores de micro dureza Vickers en grupo control y grupos experimentales.	

LISTA DE ABREVIATURAS.

AgNO₃	Nitrato de plata
ALP	Fosfatasa alcalina (<i>Alcaline phosphatase</i>)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATR	Reflectancia total atenuada (<i>Attenuated total reflectance</i>)
AXIN 2	Proteína axin-2, o proteína similar a axina, o proteína del eje 2.
BET	Brunauer, Emmett y Teller
BG	Biovidrio (Bioglass® 45S5)
BGLi	Biovidrio dopado con Li (5% en peso)
BHI	Infusión de cerebro y corazón (<i>Brain heart broth</i>)
β-TCP	Beta- Tri Fosfato de calcio
Ca₃(PO₄)₂	Fosfato de calcio
CaO	Óxido de calcio
Ca(NO₃)₂	Nitrato de calcio
Ca(NO₃)₂ *2H₂O	Nitrato de calcio di hidratado
Ca(NO₃)₂*4H₂O	Nitrato de calcio tetra hidratado
Ca/P	Relación calcio- fosfato
CAP	Proteína de unión derivada de cemento (<i>Cementum- derived attachment protein</i>)
CaSiO₃	Wollastonita
CFU	Unidad formadora de colonias (<i>Colony-forming unit</i>)
CHX	Clorhexidina
CNT	Nano tubos de carbono (<i>Carbone nanotubes</i>)
CEMP1	Proteína del cemento 1
CS	Quitosano
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DRX	Difracción de rayos X
EDS	Espectroscopía de rayos X por energía dispersiva (<i>Energy-dispersive X-ray spectroscopy</i>)
FTIR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (<i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i>)
GO	Óxido de grafeno (<i>Graphene oxide</i>)
H⁺	Catión hidrón
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
H₃O⁺	Catión hidronio
H₃PO₄	Ácido fosfórico
HA	Hidroxiapatita (Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂)
hBMSCs	Células mesenquimales de la médula ósea humana (<i>Human bone marrow mesenchymal stem cells</i>)
hPDLCS	Células del ligamento periodontal humano (<i>Human periodontal ligament cells</i>)
HV	Dureza Vickers (<i>Hardness Vickers</i>)
JCPDS	Comité Conjunto de Normas de Difracción de Polvo (<i>Joint Committee on Powder Diffraction Standards</i>), actualmente

Centro Internacional para Datos de Difracción (*International Centre for Diffraction Data, ICDD*)

KMnO₄	Permanganato de potasio
Li⁺	Ion litio
Li₂Ca₄Si₄O₁₃	Silicato de litio-calcio
Li₂SiO₃	Silicato de litio
LiNO₃	Nitrato de litio
MC3T3	Células pre osteoblásticas murinas
ME	Matriz extracelular
MIC	Concentración mínima inhibitoria (<i>Minimum inhibitory concentration</i>)
MG63	Células fibroblásticas de hueso humano
M_n	Peso molecular promedio en número
mMSCs	Células mesenquimales de médula de ratón
Na(NO₃)	Nitrato de sodio
Na₂Ca₂Si₃O₉	Combeita
Na₂Ca₃Si₆O₁₆	Devitrita
Na₂O	Óxido de sodio
Na₂O-SiO₂	Silicato de sodio
NHO₃	Ácido nítrico
OCN	Osteocalcina
OPN	Osteopontina
P₂O₅	Óxido de fósforo
PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PC12-L	Feocromocitoma
PCL	ε- policaprolactona (C ₆ H ₁₀ O ₂) _n)
PCLBG	Policaprolactona combinada con BG
PCLBGGO	Policaprolactona combinada con BG y GO
PCLBGLi	Policaprolactona combinada con BGLi
PCLBGLiGO	Policaprolactona combinada con BGLi y GO
PCLGO	Policaprolactona combinada con GO
PD	Polidispersidad
PDLLA	Acido poli- (D, L láctico) (<i>Poly (D, L-Lactic Acid)</i>)
PGE2	Prostaglandina E2
PGLA	Acido poli láctico-co-glicólico (<i>Poly lactic-co-glycolic acid</i>)
PHB	Ácido polihidroxitubúrico (<i>Polyhydroxybutyrate</i>)
PLL	Poli lisina
PTCHED1	Proteína parche-1 (<i>Patched-1 protein</i>)
PVK	Poli-N-vinil carbazol
rBMSC	Células mesenquimales derivadas de médula ósea de rata (<i>Rat bone marrow derived mesenchymal stem cells</i>)
rGO	Óxido de grafeno reducido
ROS	Especies oxígeno reactivas (<i>reactive oxygen species</i>)
rpm	Revoluciones por minuto
SBF	Fluido corporal simulado (<i>Simulated body fluid</i>)
SEM	Microscopía electrónica de barrido (<i>Scan electron microscopy</i>)
SiO₂	Silicato
Si(OH)₄	Tetrahidróxido del silicio

SHH	Proteína <i>Sonic hedgehog</i>
TCBS	Triptona suero de soja bacitracina vancomicina (<i>Tryptone soy serum bacitracin vancomycin</i>)
TEOS	Tetra etil orto silicato ($\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$)
TEP	Tri etil fosfato ($\text{OP}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$)
TSB	Caldo de soja tréptico (<i>Tryptic soy broth</i>)
TYC	Cistina de extracto de levadura tripticasa (<i>Trypticase yeast-extract cystine</i>)
UV	Luz ultra violeta
WNT	Vía de señalización WNT (combinación de genes <i>wingless</i> e <i>int-1</i>)
XPS	Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X (<i>X-ray photoelectron spectroscopy</i>)

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1 INTRODUCCIÓN.

Las cerámicas y los vidrios diseñados para aplicaciones biomédicas han sido extensamente estudiados para tratar daños en tejidos duros [1]. Los biovidrios, en particular, son biocerámicos, es decir, materiales intermediarios entre un material reabsorbible y un material bio inerte. Estos materiales bioactivos pueden intercambiar cationes (ejemplo: calcio y sodio) con la solución, produciendo grupos silanoles que, después de un proceso de repolimerización, forman una capa superficial rica en sílice, bajo condiciones alcalinas. Este proceso permite cristalizar CaO y P₂O₅, formados por la disolución del vidrio, en una mezcla de estructuras de hidroxiapatita, sobre su superficie [2].

Otro material de interés como biomaterial es el GO, un derivado del grafeno, con una gran cantidad de grupos funcionales, entre los cuales destacan ácidos carboxílicos en los bordes, y grupos hidroxilos, fenólicos y epóxicos en el plano [3-11]. Estos grupos funcionales hacen que el GO sea dispersable en agua, tenga una alta área superficial y buenas propiedades mecánicas, físicas, térmicas y eléctricas, entre otras [12]. El GO ofrece promisorias aplicaciones en áreas de la biología y la medicina: como agente antiviral, antibacteriano [8, 10-12, 14- 18]; de diagnóstico para enfermedades, para el desarrollo de biosensores [19, 20], marcadores de células cancerosas [21] y terapia foto termal [22]; y como biomaterial para liberación de drogas e ingeniería de tejidos [5, 23-25]. Combinado con biovidrios, disminuye la biomineralización [17, 22].

1.2 ESTADO DEL ARTE.

1.2.1 BIOCERÁMICAS Y BIOVIDRIOS

Cerámicas y vidrios para aplicaciones biomédicas han generado una revolución desde el punto de vista de los biomateriales. Tradicionalmente, estos materiales han sido utilizados en muchas aplicaciones en la industria de la salud. Sin embargo, su uso dentro del cuerpo humano es relativamente nuevo [1]. Las cerámicas usadas en humanos son conocidas como bio cerámicas. Estas han sido utilizadas para reparar estructuras dañadas o enfermas, principalmente tejidos duros como huesos y dientes, aunque también han sido investigadas para otras aplicaciones [1, 26]. Pueden ser clasificadas en bio inertes y bio activas, de acuerdo al método empleado para su procesamiento y a la microestructura resultante. Lo anterior, asociado con la distribución de las fases desarrolladas en el material [1, 27, 28]. Los materiales bio activos pueden facilitar la deposición de iones calcio y fosfato, precipitando en la forma de fosfato de calcio amorfo, y formando una nueva capa cristalizada por una reacción con grupos hidroxilo, carbonato y fluoruros [29, 30].

Desde comienzos de los setenta, los vidrios bioactivos han sido usados en ortopedia y odontología [31]. Los biovidrios son biocerámicos bio activos; un intermediario entre un material reabsorbible y un material bio inerte. Dependiendo del óxido formador representativo, presente en su formulación, los biovidrios pueden estar basados en tres sistemas: SiO_2 (silicato), B_2O_3 (borato) y P_2O_5 (fosfato) [1, 27, 32]. De los óxidos formadores de vidrios clásicos, propuestos por Zachariesen, los más conocidos como óxidos formadores de red son el óxido de silicio (SiO_2), y el pentóxido de fósforo (P_2O_5), dando origen a los vidrios de base SiO_2 , y de base P_2O_5 [34].

Originalmente, el biovidrio consistía en un eutéctico ternario ($\text{SiO}_2\text{—CaO—P}_2\text{O}_5$). Posteriormente se agregó Na_2O , que permite aumentar la bioactividad del material y

disminuir la temperatura de sinterizado, obteniéndose el biovidrio cuaternario. Además, el Na_2O permite la formación de una fase cristalina biodegradable, que mejora las propiedades mecánicas del material [35].

El biovidrio 45S5 está formado por una gran cantidad de óxido de calcio (CaO), y pentóxido de fósforo (P_2O_5), en una matriz de silicato de sodio ($\text{Na}_2\text{O-SiO}_2$), con una velocidad de disolución rápida y una alta concentración iónica [35]. El biovidrio más conocido es el Bioglass® 45S5 (45 SiO_2 —24,5 Na_2O —24,5 CaO —6 P_2O_5 wt.%), que presenta el más alto índice de bioactividad reportado [29, 30, 36, 37]. Este es un fundido basado en sílice, o un vidrio derivado de gel, caracterizado por un contenido de SiO_2 de 60% o menos, alto contenido de Na_2O y CaO , y alta relación $\text{CaO}:\text{P}_2\text{O}_5$, igual o mayor a 5:1 [26, 27, 30]. Vidrios con una proporción menor de CaO respecto a P_2O_5 no se adhieren a hueso [26].

El biovidrio 45S5 estimula la osteogénesis y la angiogénesis en modelos experimentales con animales [38]. El biosilicato ayuda a acelerar la deposición de una capa de hidroxiapatita cuando es aplicado [2, 30, 39]. Los biovidrios tienen en común, que dentro de su composición tienen una concentración fija de un 6% de P_2O_5 [1]. La reacción sobre la superficie de los biovidrios libera concentraciones críticas de iones solubles Si, Ca, P y Na, que inducen una respuesta intra y extra celular [36]. Esta modificación es dependiente del tiempo [1].

El biovidrio Bioglass® 45S5 fue el primer biovidrio sintetizado, presentando el mejor índice de bioactividad informado, lo que le permite adherirse a los tejidos duros y blandos. Los materiales bio activos clase A, como el biovidrio 45S5, son osteogénicos y osteoconductivos; mientras los materiales clase B, como la hidroxiapatita, sólo exhiben osteoconductividad [36]. La bioactividad de BG, o la tasa de formación de HA después de la inmersión en fluido humano simulado (SBF), proporciona información sobre la

capacidad de unión entre BG y hueso humano. Gabbai- Armelin y cols [38] observaron la formación de HA, tan sólo a las 12 horas de haber sido puesto en contacto el BG con la solución salina fosfato tamponada (en inglés *phosphate-buffered saline* o PBS).

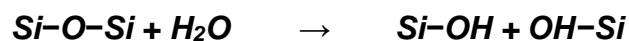
Sobre la superficie de este biovidrio cuaternario, se forma una capa biológicamente activa de hidroxiapatita carbonatada. Esta capa proporciona una interface adhesiva con los tejidos [1, 2, 29, 40, 41]. Este fenómeno es conocido como bioactividad, y proporciona información sobre la capacidad de unión entre biovidrio y tejidos duros, como hueso, esmalte y dentina [1].

El intercambio iónico entre Bioglass® 45S5 y fluido humano se asocia al pH del medio [26]. Este fenómeno consta de 5 etapas, según Hench [1]:

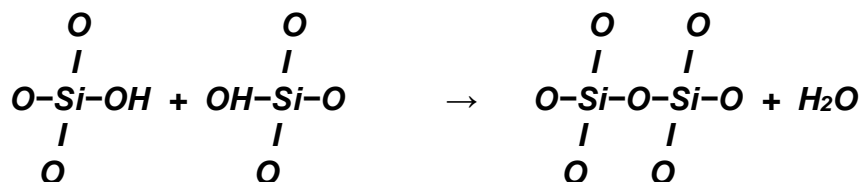
1. Intercambio de cationes como Na⁺, con cationes hidrones (H⁺) o hidronios (H₃O⁺). Este intercambio aumenta el pH del medio, debido aumento del consumo de H⁺.



2. Pérdida de sílice soluble, en la zona del tetrahidróxilo del silicio (Si(OH)₄). Al aumentar el pH, y por lo tanto la concentración de OH⁻, hay un ataque al SiO₂, disolviéndose la sílice, y aumentando la concentración de esta (proceso tiempo dependiente).



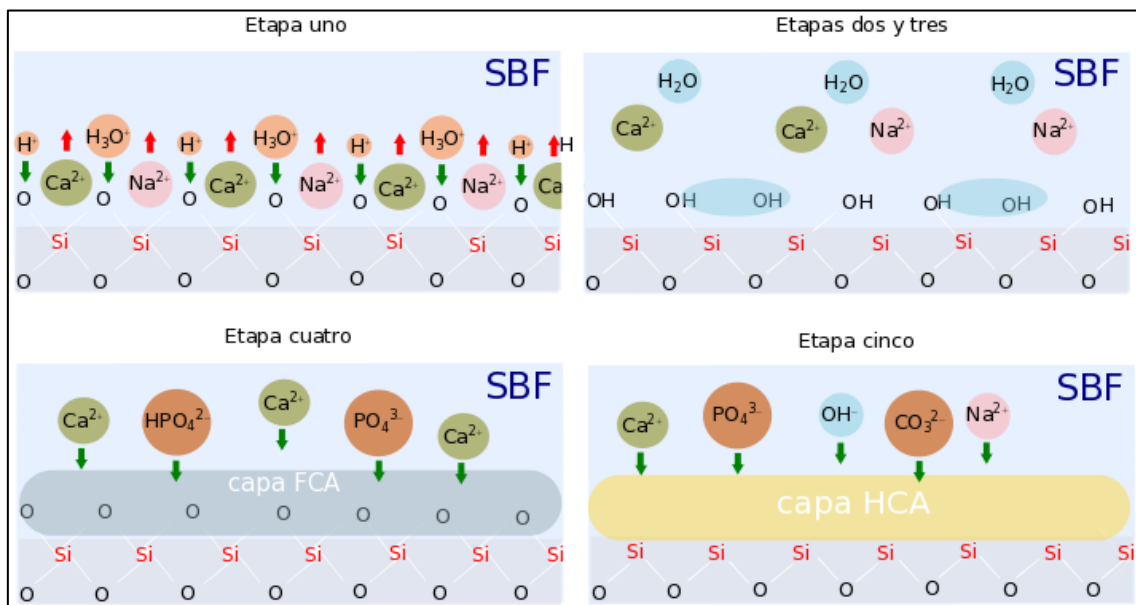
3. Condensación y repolimerización de SiO₂. Se produce una capa amorfa, rica en SiO₂.



4. Migración de Ca^{2+} y PO_4^{3-} a la superficie del biovidrio, a través de la capa rica en SiO_2 , formando $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ (fosfato de calcio amorfo o ACP, *amorphous calcium phosphate*).
5. Cristalización de la capa amorfa de ACP, por incorporación del OH^- , Na^+ y CO_3^{2-} , formándose HA. La HA permite la adhesión celular [1].

La **Figura 1**, muestra un esquema de las etapas asociadas al fenómeno de bioactividad.

Figura 1. Etapas de lixiviación de vidrios bioactivos, de acuerdo a Hench. Etapa 1: intercambio iónico entre biovidrio cuaternario y SBF. Etapas 2 y 3: ruptura enlaces Si-O-Si , formación de grupos Si-OH , re polimerización ($2\text{Si-OH} \rightarrow \text{Si-O-Si} + \text{H}_2\text{O}$). Etapa 4: formación de fosfato de calcio amorfo. Etapa 5: cristalización de fosfato de calcio amorfo hasta convertirse en hidroxiapatita carbonatada, que involucra captura de iones adicionales como OH^- , CO_3^{2-} y Na^+ .



De las diferentes rutas para sintetizar biovidrios, se enfatiza el método sol-gel [1, 27, 39], debido a las temperaturas más bajas necesarias para su síntesis, enlaces covalentes más fuertes en la red, y mejora en la bioactividad, en comparación con el método de fusión [39, 42, 43]. Este método de procesamiento, permite la posibilidad de sintetizar materiales híbridos orgánicos- inorgánicos [39].

Tienen como principal ventaja, una rápida tasa de reacción superficial; y como principal desventaja, fragilidad mecánica y baja tenacidad a la fractura, debido a la presencia de una red de vidrio dimensionalmente amorfa [1]

La disolución iónica de BG permite una buena biocompatibilidad, e incrementa la expresión de fosfatasa alcalina (*alkaline phosphatase* o ALP) desde células mesenquimales [44]. Además los BG tienen la capacidad, *in vivo*, de adherirse al hueso (osteointegración) y de inducir formación de nuevo hueso a partir de su superficie (osteoconducción) [31].

Se han propuesto varias modificaciones en la composición del biovidrio Bioglass® 45S5 para mejorar sus propiedades y capacidades clínicas, por ejemplo, la adición de diferentes cationes para modificar la estructura de la red de silicatos, y ofrecer nuevas propiedades y beneficios terapéuticos [2, 29]. Se ha investigado actividades antibacterianas de los biovidrios [29], las que aumentan cuando son combinados con otras moléculas, como GO [12], o cuando son dopados con elementos como Ce [27] y Cu [27, 45- 47]. Propiedades antiinflamatorias se han asociado a BG dopados con Zn [27]. También se ha investigado el aumento en las propiedades angiogénicas en BG dopados con Co [27, 48- 50] y Cu [27, 45- 47]; osteogénicas en BG dopados con B [27, 51], Ce [27, 52], Cu [27, 45- 47, 53], Ga [27, 52], Fe [27, 53], Li [27, 55, 56], Mg [27], Zr [27, 57], Sr [27, 58, 59], y Zn [27, 60]. En el caso de aplicaciones en terapia periodontal, se ha demostrado que BG dopados con Li y Sr estimulan osteogénesis, y cementogénesis en el caso de ligamento periodontal [27, 55, 59]. Miguez- Pacheco y cols [56], sustituyeron una proporción de Na, por Li, en BG 45S5, demostrando que al incorporar Li en un porcentaje de 5%, se vio favorecida la formación de hueso *in vivo*, y demostraron una bioactividad mejorada, con mayor efecto angiogénico y osteogénico, muy parecido a los resultados obtenidos cuando se dopan BG con Cu, Co o Sr. Han y

cols [55], observaron que sustituyendo parcialmente iones Ca^{2+} en un BG terciario, dopado con un 5% de Li^+ , mejora la capacidad de estimular por si solo la proliferación celular y diferenciación cementogénica, de células derivadas del ligamento periodontal humano (hPDLs), al activar genes relacionados a señales WNT (AXIN 2 y β -catenina) y a señales SHH (SHH y PTCH1), lo que genera hiper reacción en la expresión de ALP, osteopontina (OPN) y osteocalcina (OCN); y la expresión relativa de proteína del cemento 1 (CEMP1), y de proteína de unión derivada de cemento (*cementum-derived attachment protein* o CAP).

De los diferentes iones terapéuticos, el litio se ha destacado recientemente como un agente dopante en biovidrios, además de su conocido papel como medicamento para los trastornos maniaco-depresivos. Los iones de litio pueden mejorar las propiedades del biovidrio, tales como su comportamiento angiogénico, osteogénico y cementogénico [27, 42, 55, 59, 61, 62]. Además, el menor radio iónico del Li^+ ayuda a mejorar las propiedades mecánicas del vidrio, al compactar la red de silicato y aumentar la dureza y el módulo de Young del biovidrio Bioglass® 45S5 [61]. Li^+ aumenta además, la densidad de oxígeno, lo que resulta en una tasa de disolución más baja de la estructura del vidrio [42], que eventualmente generaría una reducción de la bioactividad del material, pero retardaría la degradación del biovidrio.

Los biovidrios también pueden presentar un comportamiento antimicrobiano [63]. Los diferentes iones liberados pueden aumentar el pH del medio, matando bacterias, un proceso asociado al área de superficie del biovidrio [32, 42]. Otro mecanismo estaría relacionado a las estructuras catiónicas liberadas desde los biovidrios, que pueden reaccionar con los grupos fosfato y éster de las membranas lipídicas celulares, a través de interacciones electrostáticas e hidrófobas [64, 65]. Una estrategia adecuada para aumentar el comportamiento biocida del BG es a través de la adición de iones metálicos

como plata y cobre [53, 66]. El ion de litio también se puede usar como agente antibacteriano en biovidrios [42], aunque se ha estudiado mucho menos.

Se han combinado BG con polímeros naturales, como colágeno, en la confección de andamios, demostrando mejorar la mineralización cuando son colocados en SBF, comparados con el colágeno solo, e incrementan el metabolismo y la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) en células pre osteoblásticas murinas o MC3T3 [48]. Al ser relacionados a polímeros sintéticos como PGLA, PDLLA o PHB, mejoran sus propiedades mecánicas, aprovechándose su características de degradación *in vivo* [31, 36, 59]. Zhang y cols (59) observaron que al incorporar BG en esponjas de poliuretano, su resistencia compresiva aumentaba ~ 170 veces.

En el caso de BG combinados con GO, Shih y cols [12] reportaron una ligera disminución de la bioactividad, sugiriendo que el GO reduce la bioactividad del BG. La causa de este comportamiento estaría relacionada en primer lugar a la incapacidad del BG de liberar iones Ca y P, debido a la presencia de GO en la superficie del BG, lo que evitaría la súper saturación del SBF; y, en segundo lugar, a que el GO absorbe iones Ca y P desde el SBF, y este efecto podría retardar la formación de HA sobre la superficie de BG, con reducción de la bioactividad. Otro estudio, establece que el GO incrementa el efecto antibacteriano del BG y actúa como factor de diferenciación celular y de crecimiento de células troncales a osteoblastos [67].

Wu y cols [68] demostraron que β - TCP dopado con GO estimula la proliferación y diferenciación de hBMSCs *in vivo*, asociado a señal WNT, que probablemente es inducida a través de la interacción de grupos bioactivos (como hidroxilos y carboxilos), y absorbanza de proteínas. Fabbri y cols [69] desarrollaron andamios de BG 45S5, cubiertos con GO, mediante método sol gel, demostrando que el GO no afecta la bioactividad del BG, y no demuestra efecto citotóxico sobre células MG63.

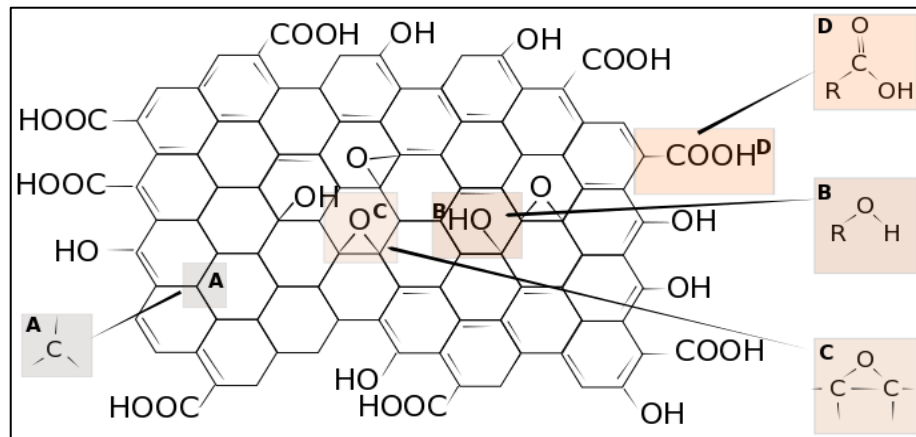
A pesar de lo anteriormente mencionado, respecto a la bioactividad y al comportamiento antibacteriano del BG y de sus compuestos dopantes, existen pocos estudios asociados con propiedades biomineralizantes sobre tejidos duros dentales [70-72], o con su desempeño antibacteriano contra patobiontes asociados con enfermedades orales prevalentes [63, 73]. En particular, estudios relacionados a iones de litio solos o en biovidrios dopados con este ion no han sido reportados para aplicaciones dentales antibacterianas.

1.2.2 OXIDO DE GRAFENO

El óxido de grafeno es un nano material que deriva del grafito. Es una lámina de átomos de carbono de un átomo de espesor, unidos por enlaces sp^2 [9, 14- 16, 19- 22], con un arreglo espacial hexagonal, y una distancia entre C-C de 0,142 nm [9, 15, 16, 22] (**Figura 2**). Es un material muy versátil, con aplicaciones en electroquímica y en sistemas biológicos [15, 19- 22, 74- 79]. Se sintetiza a partir de la oxidación de polvo de grafito, el que se obtiene fácilmente y a un bajo costo [12, 77- 79]. Contiene una gran cantidad de grupos funcionales, entre los cuales destacan ácido carboxílicos en los bordes, e hidroxilos, fenólicos y epóxidos en el plano [4- 6, 8- 11, 17], lo que le permite al GO ser dispersable en agua, poseer una extremadamente alta área superficial y tener buenas propiedades mecánicas, físicas, térmicas y eléctricas, entre otras propiedades [4- 6, 8, 9, 12, 14, 17- 20, 22, 25, 67, 76, 79, 80].

Se ha demostrado que el GO mejora las propiedades mecánicas y térmicas de matrices poliméricas, con mínimas concentraciones, aumentando la resistencia y estabilidad mecánica [10, 11, 13, 25, 81, 82].

Figura 2. Esquema molécula GO. A. Carbono sp^2 ; B. Grupo hidroxilo; C. Grupo epóxido; D. Grupo carboxilo.



El GO ha demostrado ser menos citotóxico comparado con su variedad reducida (rGO) o comparado con otros alótropos del carbono como nano tubos de carbono (CNT) [14, 15, 74, 83].

GO ha sido usado como soporte para dispersar y estabilizar varios nanomateriales, como metales, óxidos metálicos, polímeros, y sus compuestos, con alta eficiencia antibacteriana debido a un efecto sinérgico [15]. GO combinado con polímeros ricos en electrones π permite una dispersión alta. Muchas matrices poliméricas, como poli-N-vinil carbazol (PVK), quitosano (CS), y poli lisina (PLL) ha sido usados para fabricar híbridos antibacterianos para disminuir la viabilidad bacteriana [15].

La acción antibacteriana del grafeno involucra efectos tanto físicos como químicos [15, 16]. Es importante considerar las propiedades físico químicas del GO, como tamaño, carga superficial, estado de la partícula, grupos funcionales superficiales y precursores residuales, que tienen una influencia significativa sobre la actividad biológica y citotóxica [74]. Cuatro mecanismos han sido reportados [12, 15, 16], relacionados con la actividad antibacteriana del GO: (i) perforación de la membrana celular, (ii) extracción de fosfolípidos, (iii) captura y envoltura de micro organismos, y (vi) estrés oxidativo. El

primero y el cuarto mecanismo han sido los más estudiados para explicar la inhibición bacteriana.

La perforación de la membrana bacteriana es debida a la acción de los bordes agudos de las láminas de GO [9, 12, 15, 16]. Estos bordes cortan la membrana celular bacteriana formando poros, que llevan a un desbalance osmótico y muerte bacteriana [8, 12, 15, 16, 67, 84]. Cuando el GO forma parte de un material compuesto, este efecto se explicaría por la exposición parcial del mencionado nano material de relleno, inmerso en la matriz polimérica [10, 11, 19].

En relación al daño bacteriano por estrés oxidativo, este se explicaría por la generación de especies oxígeno reactivas (*reactive oxygen species* o ROS), transferencia de cargas, u oxidación directa de los componentes celulares, mediado por el GO [12, 15]. La superficie del GO tiene numerosos defectos o vacancias de oxígeno, que pueden actuar como sitios, que ofrecen moléculas de agua para producir ROS, como, por ejemplo, radicales hidroxilos. Las ROS transforman la membrana y dañan el DNA de la bacteria, llevándola a la muerte [9, 12, 15]. Transferencia de carga es considerada otra forma de estrés oxidativo inducido por grafeno [15]. La carga superficial y el estado de agregación influye en la citotoxicidad del GO [12, 15]. Se ha propuesto que la transferencia de electrones desde la membrana microbiana al grafeno contribuye a la actividad antibacteriana, más que el daño mediado por ROS [15].

La presencia de GO cambia la topografía de la superficie de un material compuesto, incrementando la aspereza y modificando su humectabilidad [8, 19]. Se ha propuesto que una estrategia para la creación de superficies antibacterianas pasa por modificar las superficies de los materiales y hacerlas químicamente hidrofílicas [16]. Al formar parte de un compuesto, el GO produce un aumento de la hidrofiliidad en polímeros alifáticos, lo que podría explicarse por la interacción de enlaces hidrógeno entre los grupos

funcionales del GO (que contienen oxígenos) y el agua, disminuyendo la tensión superficial del material, e incrementando el comportamiento anfifílico de la superficie del compuesto, comparado con el polímero solo [19]. Esto afecta la adhesión de las bacterias a la superficie del material, ya que éstas son más afines a superficies hidrofóbicas, siendo rápidamente eliminadas por el sistema inmune [16, 85]. Para que las bacterias puedan adherirse a la superficie de un polímero o material compuesto, debe haber un desplazamiento del agua absorbida, por lo que si la superficie está altamente hidratada, esto será termodinámicamente desfavorable, ya que se requerirá de mucha energía para desplazar el agua, y esto hará muy difícil que las bacterias puedan ser atraídas hacia la superficie del material [85]. De acuerdo a la teoría DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek) la adsorción sobre superficies hidrofóbicas es rápida y posee fuerzas de enlace fuertes, mientras que la adhesión a superficies hidrofílicas es débil y reversible, debido a que se generan distancias de separación mayores entre las bacterias y la superficie del material, lo que produce remoción bacteriana por fuerzas débiles o desorción espontánea de éstas [86].

Otro factor que puede influir en la adhesión bacteriana es la carga de la superficie del material, que por diferentes fenómenos como disolución iónica, adsorción iónica o ionización de la superficie, pueden generar la carga positiva o negativa de la superficie, asociado principalmente a pH [10- 12]. En materiales poliméricos que son hidrofóbicos esto no es tan relevante, adquiriendo importancia cuando al agregar un relleno, como el GO, se vuelven hidrofílicos [10, 11, 86]. La carga superficial, se mide en relación al potencial zeta (ζ). En el caso de GO este es negativo (ζ^-), tanto en agua, como en SBF y en medios de cultivo celulares, lo que indica similar contenido de oxígeno. Si la fuerza está aumentada, permitirá una interacción con fosfolípidos de las membranas celulares cargadas positivamente, facilitando su interacción [74]. Como resultado, los fosfolípidos

de la bacteria son extraídos por el GO, generando un efecto antibacteriano [8, 12, 15]. La extracción destructiva de moléculas de fosfolípidos combina la inserción y destrucción de la membrana, y la extracción destructiva de moléculas de lípidos, contribuyendo a la actividad antibacteriana del grafeno [15, 84].

Cuando el GO interactúa con polímeros, el incremento de la hidrofiliidad del material compuesto creado permite adhesión y proliferación celular [9, 13, 14, 19, 86]. Liu y cols [14] plantean que la presencia de grupos hidrofílicos contribuyen a una mejor biocompatibilidad de las láminas de GO. La alta hidrofiliidad de la superficie de un material compuesto, combinado con GO, favorece la adhesión de vitronectina y permite la mantención de la funcionalidad de la fibronectina [19]. Se ha demostrado que la funcionalización de GO para distintas moléculas bioactivas como dopamina y carragenina, que tienen grupos catecoles y sulfatos respectivamente, pueden generar que estos grupos cargados imiten a las proteínas presentes en la matriz extracelular (ME), para inducir mineralización [67]. Rodríguez- Lozano y cols [87], sugieren que la combinación de células troncales dentales humanas, fibroína (proteína de la seda) y GO, tiene un fuerte potencial para ser usado en terapia periodontal regenerativa, particularmente de tejidos que conforman el periodonto de inserción.

Mientras algunos estudios señalan que las partículas en suspensión de GO pueden ser tóxicas para células humanas, animales y bacterianas [14, 20], otros estudios señalan que el GO presenta toxicidad dosis-dependiente sobre fibroblastos humanos o células sanguíneas en una dosis mayor a 50 µg/mL [14, 23, 74, 79, 88, 89]. Chang y cols [90] demostraron que el GO tiene buena cito compatibilidad sobre células A549, incluso con concentraciones de 200 µg/mL. Li y cols [17] demostraron que la presencia de GO en compuestos con HA estimula la proliferación celular, cuando es usado como recubrimiento de superficies de Titanio. Similares resultados se han observado en

relación a adhesión y proliferación de células de mamíferos.

Incluso si el GO es citotóxico, materiales basados en GO deberían no ser citotóxicos, sugiriendo que deberían ser aplicados en bio sistemas en el futuro, sin mayores inconvenientes [7]. Song y cols [91] demostraron que la adhesión de una concentración moderada de GO (0,3 y 0,5 wt%), a un andamio de PCL, tiene una mejora apreciable en la cito compatibilidad para células mesenquimales de médula de ratón (mMSCs) y para feocromocitoma (PC12-L), permitiendo adhesión, proliferación y crecimiento celular.

Además, ha demostrado efecto antibacteriano tanto solo, como asociado a materiales como carnosina, indiocianina verde, hidroxiapatita, quitosano y nano partículas de plata, sobre cepas de *S. mutans* [92- 94]. En particular, presenta propiedades antimicrobianas en contra las bacterias responsables de la caries [92].

1.3 HIPÓTESIS

Vidrio bioactivo (BG), dopado con Li 5% (BGLi), y mezclado con GO, favorecen la bio mineralización de tejidos duros de origen dental, e inhiben el crecimiento de bacterias relacionadas con las enfermedades orales más prevalentes: caries y enfermedad periodontal.

1.4 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la incorporación de litio en un vidrio bioactivo, y el efecto de la presencia de GO, sobre su capacidad remineralizante de esmalte dental; así como sobre la actividad antibacteriana frente a bacterias asociadas a caries y periodontitis.

1.5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Sintetizar y caracterizar BG y BGLi, generados por un método sol-gel.
2. Sintetizar y caracterizar GO, preparado mediante un método de exfoliación de Hummers y Offeman modificado.
3. Evaluar el desempeño del BG y del BGLi, combinado o no con GO, en los procesos de remineralización de esmalte dental, como partículas o mezclados con un poliéster alifático (policaprolactona)
4. Evaluar la capacidad antimicrobiana del BG y del BGLi, combinado o no con óxido de grafeno, sobre *S. mutans*, patobionte representativo de caries, y sobre *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*, patobiontes representativos de enfermedad periodontal.

CAPÍTULO II. MATERIALES Y METODOLOGÍA

2.1 SÍNTESIS DE MATERIALES UTILIZADOS EN EL ESTUDIO

2.1.1 SÍNTESIS DE BG Y BGLi

Los biovidrios fueron sintetizados por un proceso sol-gel, como se ha reportado anteriormente [35], usando Tetraetil ortosilicato (Aldrich, 98%), trietilfosfato (Aldrich, 99,8%), nitrato de sodio (Riedel-de Häen, 99,5%), nitrato de calcio tetra hidratado (Merck, 99%) y nitrato de litio (Merck 99,9%), de acuerdo a las concentraciones que se detallan en la **Tabla 1**. Ácido nítrico (Merck, 65%) 0,25 M, fue usado como catalizador. Para el biovidrio puro (BG), 42,7 mL de TEOS fueron agregados por goteo, dentro de 76 mL de una solución de NH_4OH 0,25 M. Después de cuarenta y cinco minutos, 1,9 mL de TEP fueron agregados por goteo. Los nitratos fueron añadidos en el siguiente orden y lapsos de tiempo: 45 minutos después del TEP, nitrato de sodio fue agregado; luego, después de 45 minutos, nitrato de calcio tetra hidratado fue adicionado. La solución final fue agitada por 60 minutos. Para BGLi, la cantidad de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, usada para biovidrio puro, fue reducida proporcional a la cantidad de LiNO_3 incorporado, como se informó anteriormente para biovidrios ternarios [55]. En este caso, 45 minutos después del nitrato de calcio tetra hidratado, nitrato de litio fue agregado, y la solución final fue agitada 60 minutos. La solución resultante ($\text{pH} = 1$) fue depositada en un horno (VTR 5022. Instrumento Heraeus) por tres días a 60°C . Posteriormente, se dejó durante dos días en el mismo horno a 130°C , para finalizar el proceso de gelificación y eliminar el agua. Los biovidrios se sometieron a tratamiento térmico (Thermolyne Small Benchtop. Thermo Scientific) a 700°C ($0,5^\circ\text{C} / \text{min}$ hasta alcanzar 200°C , y $2^\circ\text{C} / \text{min}$ hasta alcanzar 700°C) y luego se dejaron enfriar lentamente hasta alcanzar la temperatura ambiente, en orden

a estabilizar la estructura. Finalmente, las partículas fueron sometidas a molienda en un mortero analítico (Pulverisette 6. Oberstein Alemania) y tamizadas hasta obtener partículas de menos de 38 μm . Los polvos de BG y BGLi obtenidos fueron caracterizados mediante técnicas DRX, SEM y BET. Mediciones morfométricas de las partículas fueron realizadas usando programa Image J.

Tabla 1. Composición BG y BGLi.

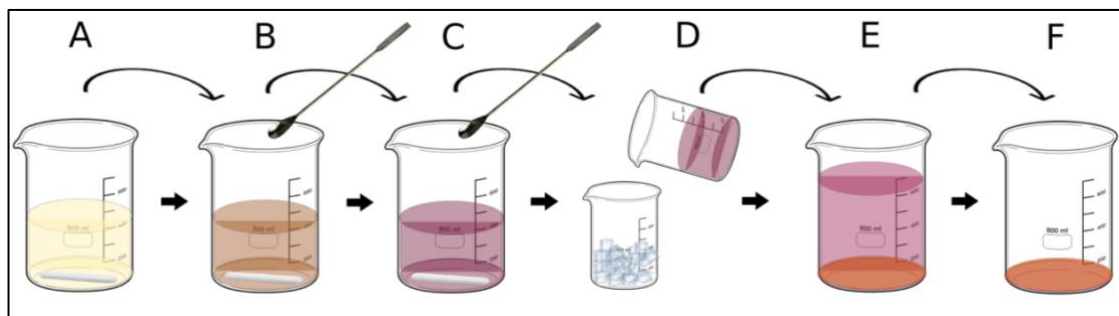
Reactivos		$\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$	$\text{OP}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$	$\text{Na}(\text{NO}_3)$	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	LiNO_3
BG	Concentración (%)	46,1	2,6	24,4	26,9	-
BGLi	Concentración (%)	46,1	2,6	24,4	21,9	5

2.1.2 SÍNTESIS DE GO

Se utilizó una modificación a la técnica de Hummers [77], a partir de la combinación de la técnica propuesta por Marcano y cols. [78] para oxidación de grafito, y los procedimientos de purificación de GO propuestos por Cruz- Silva y cols. [95]. El H_2SO_4 (Merck 98%) y el H_3PO_4 (Emsure 85%), en una razón de 9:1 (360:40 mL), fueron mezclados en agitador magnético a 200 rpm y a 50 °C. A esta mezcla se agregaron 3 grs. de grafito (Merck, 1 wt % equivalente) y posteriormente 18 grs. de KMnO_4 (Emsure, Merck, 6 wt % equivalente). El KMnO_4 fue agregado en pequeñas cantidades y en intervalos de tiempo (1 gr. o 1,5 gr cada 10 minutos), para evitar una reacción excesivamente exotérmica, asegurar la correcta interacción con el grafeno y permitir la oxidación de las partículas exfoliadas por acción de los ácidos. Una vez incorporado

completamente el KMnO_4 , la solución resultante se mantuvo en agitación constante hasta completar 12 horas. Transcurrido el tiempo de agitación, la solución se dejó enfriar hasta llegar a temperatura ambiente. Luego, fue vertida en un vaso conteniendo aproximadamente 400 mL de hielo, y 30 mL de H_2O_2 al 30% (Kadus, 10 volúmenes). La solución resultante se dejó en reposo durante 12 horas, para lograr que se neutralizara completamente el KMnO_4 , y el GO resultante, de color naranja, decantase (**Figura 3**).

Figura 3. Síntesis GO mediante método modificado en base a dos ácidos: **A.** Incorporación de H_2SO_4 y H_3PO_4 (relación 9:1); **B.** Incorporación de grafito; **C.** Incorporación KMnO_4 ; **D.** Vertido solución en vaso con hielo y H_2O_2 al 30%; **E.** Decantado; **F.** Eliminación sobrenadante y rescate GO.

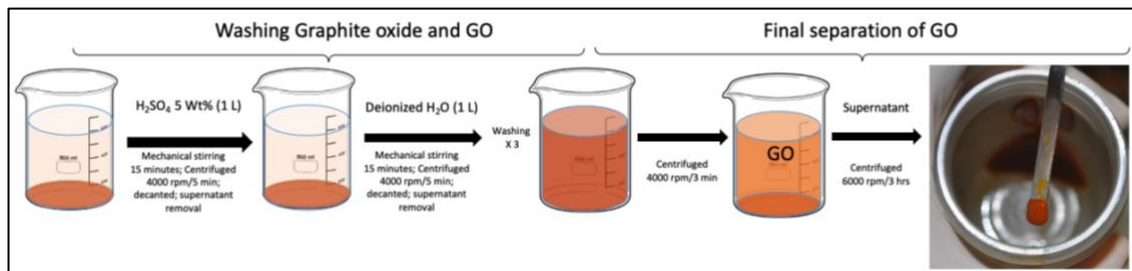


Luego de ser separado del sobrenadante, el barro de GO fue lavado, de acuerdo al siguiente protocolo: primero, el barro de GO fue dispersado en 1 L de H_2SO_4 5 wt%. Esta dispersión fue sometida a agitación mecánica por 15 minutos, y luego, centrifugada a 4000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante fue eliminado y el sedimento obtenido fue sometido a tres nuevos ciclos de lavado y centrifugado, pero esta vez con agua destilada pura. Mientras el ácido es lavado y removido, el GO se expande [95]. Se obtuvo finalmente un barro homogéneo de color anaranjado (**Figura 4**).

El último proceso fue la separación entre GO y óxido de grafito. El barro obtenido fue dispersado en 1 L de agua destilada. Luego, se sometió a centrifugado a 4000 rpm por tres minutos. El sobrenadante obtenido, fue sometido a un nuevo ciclo de centrifugado,

pero esta vez a 6000 rpm por tres horas. Finalmente, el sedimento obtenido fue separado del sobrenadante y posteriormente almacenado.

Figura 4. Proceso de lavado y separación de GO, mediante centrifugado.



El GO obtenido fue depositado en una placa Petri y secado a temperatura ambiente por una semana. Finalmente, fue llevado a molienda manual en mortero de ágata, con el fin de obtener un polvo. Para una cantidad de 3 gramos de grafito, se obtuvo 0,81 gr de polvo de GO altamente funcionalizado (27 % de rendimiento). Los polvos de GO obtenidos fueron caracterizados mediante técnicas DRX, XPS, FTIR y SEM.

2.2 CONFECCIÓN DE MATERIALES COMPUESTOS, USANDO PCL.

Los materiales utilizados fueron: Policaprolactona ($C_6H_{10}O_2$)_n, M_n promedio 80000, PD < 2 (Sigma-Aldrich Co. LLC); BG y BGLi (previamente sintetizados) y GO (previamente sintetizado).

Los materiales compuestos fueron preparados en una mezcladora de dos rodillos (Brabender Cutler Hammer, Series A1, E50DR1). Se mezclaron 34 gr de materiales, por un período de 10 minutos, a una temperatura de 100°C y a 50 rpm. Mediante el uso de una prensa hidráulica, se confeccionaron láminas, las que fueron recortadas para obtener pellets. Los pellets fueron procesados en una prensa a una temperatura de 100°C. Se utilizaron platinas calibradas para obtener placas de 1 mm de espesor, utilizando aproximadamente 18 gr de material compuesto.

A partir de las placas calibradas obtenidas, se confeccionaron cuadrados de 1 cm² de área.

2.3 ENSAYOS DE BIOACTIVIDAD

2.3.1 ENSAYO DE BIOMINERALIZACIÓN ESTÁNDAR SOBRE TABLETAS.

La evaluación estándar de bioactividad se realizó en base al método de Kokubo, para estudiar la formación de especies en la superficie de tabletas preparadas, a partir de los biovidrios sintetizados, combinados o no con GO, luego de la inmersión de éstas en fluido corporal simulado (*Simulated Body Fluid* o SBF) [96, 97]. Las tabletas fueron preparadas compactando 0,25 gramos de los productos previamente tamizados, en una prensa hidráulica (CrushIR Digital Hydraulic Press, PIKE Technologies), por dos minutos. Seis tabletas fueron preparadas por muestra: dos como control negativo, mantenidas sin inmersión (tiempo 0); dos para ser inmersas en SBF por un día (tiempo 1); y dos para ser inmersas en SBF por 14 días (tiempo 14).

La inmersión en SBF fue llevada a cabo en un agitador con termostato, a 37°C y 60 rpm, como se reportó previamente [98]. Una vez retiradas, las tabletas fueron lavadas con acetona y posteriormente secadas y almacenadas. Se midió el pH de la solución de SBF asociada a cada biovidrio o combinación de éstos con GO, y se comparó con un control negativo (SBF sin tabletas). Las tabletas fueron analizadas, posterior al ensayo, mediante DRX, SEM y EDS.

2.3.2 BIOMINERALIZACIÓN SOBRE SUPERFICIE DE MATERIALES COMPUESTOS.

Este ensayo fue realizado utilizando SBF. Se utilizaron trozos de materiales compuestos de 1x1x0,1 cm, confeccionados combinando PCL con los materiales sintetizados (BG, BGLi y GO). Seis muestras fueron preparadas: dos como control negativo (tiempo 0); dos para ser inmersas por 1 día (tiempo 1); y dos para ser inmersas por 56 días (tiempo 56), con intercambio de SBF cada 7 días.

Las muestras sumergidas en SBF se mantuvieron bajo agitación en termostato a 37°C y 60 rpm. Una vez retirados, los trozos de materiales compuestos fueron lavados con acetona, secados, etiquetados y almacenados. El pH de la solución fue también medido desde la solución de SBF asociada a cada muestra sumergida, y se comparó con un control negativo (SBF sin materiales). Las tabletas fueron analizadas mediante DRX, SEM y EDS.

2.3.3 BIOACTIVIDAD *IN VITRO*, A TRAVÉS DE ENSAYO DESMINERALIZACIÓN-REMINERALIZACIÓN, SOBRE ESMALTE DENTARIO.

El protocolo para el ensayo *in vitro* de bioactividad se basó en el modelo propuesto por Zero y cols. [99], que involucra el uso de dientes, previamente desmineralizados por acción de bacterias. Por limitaciones asociadas a la cantidad de dientes disponibles para este ensayo, se evaluó solamente el efecto de BG y BGLi sobre tejidos duros, no siendo considerado el uso de GO.

Los dientes (terceros molares de pacientes apropiadamente informados) fueron cortados en porciones rectangulares de 10x1x2 mm, usando una recortadora (SYJ-150 Low-Speed Diamond Saw, MTI Corporation), y pulidos con discos 3M™ Sof-Lex™ (3M Center, St. Paul, MN 55144-1000) hasta obtener una apariencia especular. Los dientes

pulidos fueron cubiertos con un barniz de uñas comercial (Colorama Maybelline LCC), para protegerlos contra la desmineralización (exceptuando la cara vestibular de esmalte para la prueba de bioactividad *in vitro*), etiquetados y almacenados dentro de tubos de centrifugado Eppendorf. El esmalte de la cara vestibular de cada uno de los dientes fue dividido en tres zonas, nombradas A, B y C (**Figura 5**), para las posiciones media, coronal y cervical, respectivamente. El tercio medio fue usado como control no tratado (zona A), y cubierto con barniz de uñas comercial, antes de la desmineralización *in vitro*; mientras los tercios coronal (zona B) y cervical (zona C) fueron expuestos al proceso de desmineralización *in vitro*. La zona B fue cubierta, una vez terminado el ensayo de desmineralización, con barniz de uñas y el tercio cervical (C) permaneció descubierto durante el ensayo de remineralización. La **Figura 5** muestra un diagrama explicando este protocolo.

En las pruebas de desmineralización *in vitro*, los dientes fueron inmersos, primero en agua destilada durante 30 minutos, y luego en 2 mL de saliva purificada (filtrada y esterilizada por UV) por 30 minutos. Después, los dientes fueron agregados dentro de soluciones conteniendo *S. mutans*, para producir la desmineralización de las zonas B y C, desmineralización asociada al crecimiento de las bacterias sobre la superficie de los dientes [100]. En detalle, los dientes fueron inmersos en placas de cultivo, conteniendo 2 mL de una solución con 9 partes de BHI (*Brain Heart Infusion* 53286. Millipore), 1 parte de una solución de alta pureza al 10% de sacarosa (100 g/L, usando sacarosa con una pureza superior al 95%, de Sigma-Aldrich, y agua destilada) y 0,5 parte de una solución de *S. mutans* ATCC 25125 en TSB a 1 Mc Farland (medido a 560 nm), y agitado durante 36 horas a 37 °C. Después, los dientes fueron inmersos en una solución con 2 mL de BHI y 0,2 mL de una solución de sacarosa al 10% por cinco minutos. Entonces, los dientes fueron lavados con suero fisiológico (0,9%) y luego introducidos dentro de una

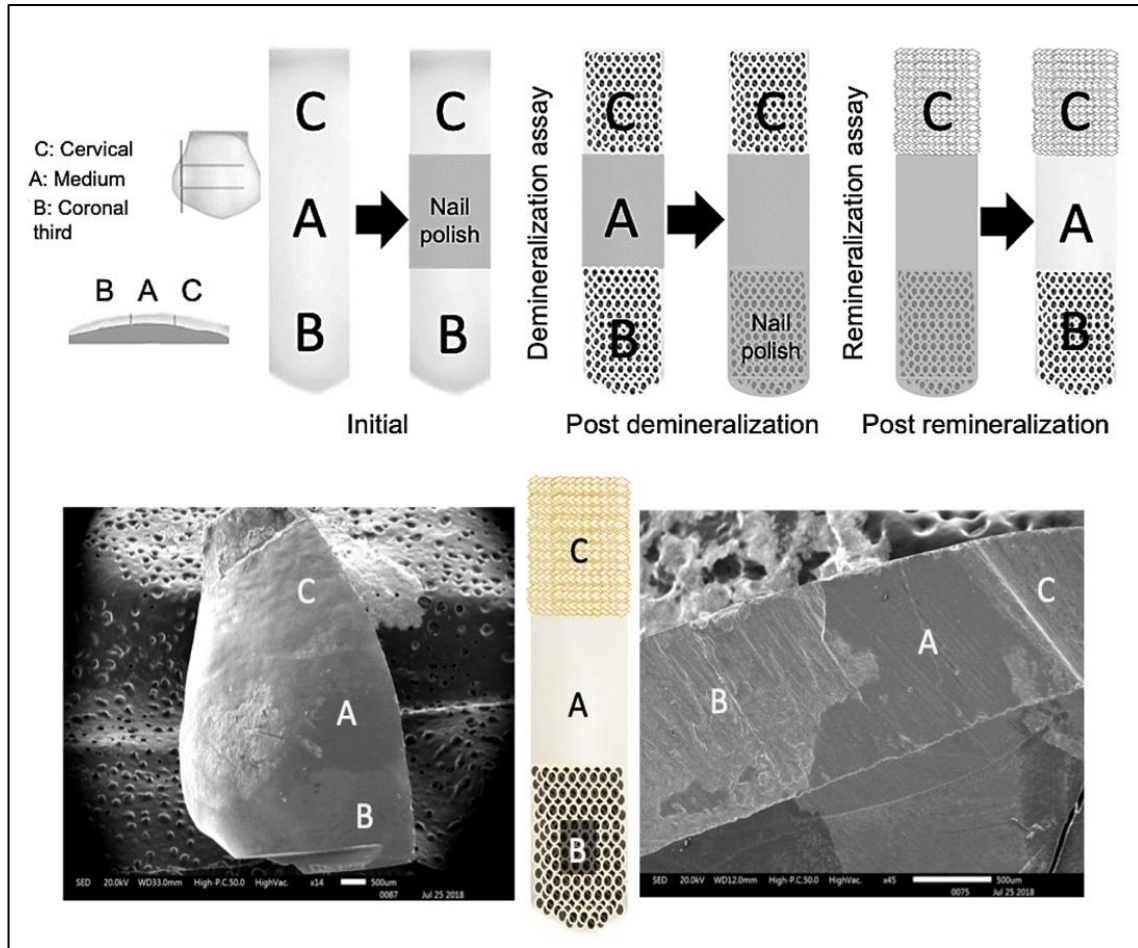
solución con 0,2 mL de solución de glucosa al 10% (100 g/L, usando glucosa con una pureza superior a 99,5%, de Sigma- Aldrich, y agua destilada) y 1,8 mL de BHI. Cada 3 horas, las muestras fueron retiradas e introducidas dentro de suero fisiológico por 5 minutos y nuevamente reingresadas en la solución de glucosa. Este proceso se repitió 4 veces al día y al final de la cuarta vez, las soluciones fueron puestas dentro de una estufa en condiciones capnófilicas toda la noche. Este proceso se repitió durante 3 días. Después, las muestras fueron removidas, lavadas con clorhexidina al 0,12 %, agua desionizada y escobilla suave. Finalmente, la zona B fue cubierta con barniz de uñas comercial.

En el ensayo de remineralización *in vitro* sobre la zona C, los dientes fueron distribuidos de manera aleatoria en tres grupos, dependiendo del protocolo usado: Grupo 1: los dientes fueron inmersos dentro de saliva artificial por 15 días sin ninguna intervención (control); Grupos 2 y 3: el mismo procedimiento que en el grupo 1, pero las muestras fueron removidas desde la saliva dos veces al día, para introducirlas en barras de BG y BGLi respectivamente, en una concentración de 200 mg/mL, por 10 minutos.

Una vez concluido el ensayo, el barniz protector fue removido desde A y B usando acetona. Las muestras de cada grupo fueron preparadas y sometidas a análisis.

Las muestras fueron caracterizadas por micro dureza Vickers (HV) (Duramin *microhardness tester*, Struers) [101], SEM, EDS y DRX. En el caso de la determinación de micro dureza, las mediciones se repitieron cinco veces sobre cada superficie vestibular de esmalte, correspondientes a: tercio medio (inicial), tercio coronal (dureza post desmineralización) y tercio cervical (dureza post remineralización). La micro dureza Vickers fue desarrollada con una carga de fuerza 1,941 N, durante un tiempo de 10 s.

Figura 5. Ensayo de desmineralización-rem mineralización *in vitro*, sobre la superficie de esmalte dental.



2.4 ENSAYO ANTIBACTERIANO.

El efecto antibacteriano fue determinado por concentración mínima inhibitoria (MIC), a través del método de dilución sucesiva. Cepas puras de bacterias obtenidas desde *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA, USA) fueron usadas: *S. mutans* ATCC 25175, *P. gingivalis* ATCC 33277 y *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718-serotipo b. Debido al alto número de bacterias en las soluciones, las diluciones se llevaron a cabo para alcanzar concentraciones que permitieran las mediciones por conteo de bacterias. Cepas de bacterias fueron cultivadas en 3 mL de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) para *S. mutans*, caldo BHI más suero equino al 10% para *A.*

actinomycetemcomitans, y caldo BHI más hemina menadiona para *P. gingivalis* 33277, por 48 horas a 37°C. Para estos cultivos, un inóculo fue tomado y ajustado a una absorbancia de 0,125 Å (560 nm) en 3 mL de caldo, equivalente aproximadamente a $1,5 \times 10^8$ CFU / mL, en el caso de *S. mutans* y *A. actinomycetemcomitans*; y 3×10^8 CFU / mL, en el caso de *P. gingivalis*. Estos caldos ajustados fueron expuestos a diferentes concentraciones de los productos: BG y BGLi (5, 10, 20, 50, 100 y 200 mg/mL) y GO 0,05 mg/mL, y agitados por 15 segundos a 2000 rpm. Fueron usados un control negativo (caldo ajustado con bacterias, pero sin materiales) y un control positivo (Solución bacteriana con clorhexidina al 0,12%). Un inóculo de 100 µL fue extraído desde cada caldo, siendo mezclado con 900 µL de PBS (*Phosphate Buffered Saline*) estéril. Cepas de *S. mutans* y *A. actinomycetemcomitans* fueron cultivadas en placas agar TYC y TSBV respectivamente, en un ambiente de capnofilia, por 48 horas a 37°C. En el caso de cepas de *P. gingivalis*, éstas fueron cultivadas en placas de agar sangre hemina menadiona por siete días, en un ambiente anaeróbico a 37°C. Diluciones seriales fueron obtenidas por muestra (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}).

Imágenes digitales fueron obtenidas desde las placas y las colonias bacterianas fueron contadas, las que fueron procesadas en el programa Image J. Para obtener el número de Unidades Formadoras de Colonias (CFU/mL) de cada muestra, la siguiente ecuación fue usada:

$$CFU/mL = \text{Número de colonias contadas por placa}$$
$$/ (\text{Volumen de una muestra sembrada (VP)} * \text{Factor de Dilución (FD)})$$

Se compararon las diferentes diluciones para establecer si éstas se aproximaban a las otras. Los datos obtenidos desde el análisis fueron expresados en log₁₀ CFU/mL. Para cada muestra, el pH también fue medido.

2.5 SEM y EDS.

Las superficies expuestas a ensayos de biomineralización fueron caracterizadas con un equipo FEI Quanta 250 FEG-SEM (ThermoFisher Scientific). Para este test, las muestras fueron sometidas a deshidratación y secado de punto crítico, montadas bajo un vidrio de magnificación estereoscópica y metalizadas por oro.

El análisis EDS fue realizado usando el programa eZAF Smart Quant, con un voltaje de 20 kV, una resolución de 122,8 eV y un tiempo de 100 s. Para cada muestra, un área representativa fue usada para análisis EDS (alrededor de 5,0 x 4,0 μm). El objetivo del análisis EDS, junto con la caracterización química de las muestras sintetizadas, fue estimar la composición y tipo de estructuras de apatita formadas sobre las superficies de las tabletas, los materiales compuestos y los dientes, antes de la desmineralización y después de la remineralización, por ejemplo, la relación entre Ca y P. Los resultados EDS, obtenidos desde las muestras de dientes tratadas, fueron comparados con un diente con una composición conocida.

Las partículas de BG, BGLi y GO fueron caracterizadas con un equipo Jeol JSM-IT3LV (McCrone Microscopes & Accesories, 850 Pasquinelli Drive WI 60559, USA) en alto vacío, con un voltaje de 26 kV, y un tiempo de 40 s.

2.6 DRX.

Para la difracción por rayos X (DRX), un difractómetro D5000 X-Ray (Siemens) fue usado, usando radiación $k\alpha$ Cu (a 40 kV y 30 mA). Los datos fueron recolectados sobre un rango de $2\theta^\circ = 2^\circ - 80^\circ$, usando un tamaño de paso de $0,02^\circ$ y un tiempo de conteo de 19 s por paso. El análisis DRX de los materiales sintetizados fue realizado usando los polvos tamizados de estos materiales, mientras que las muestras biomineralizadas en el

ensayo estándar, y los compuestos en base a PCL, se caracterizaron desde el lado de la tableta o lámina expuesta a SBF respectivamente. Para el análisis DRX de los test de remineralización *in vitro*, la sección C de los dientes fue usada, además de un diente no tratado, como control. Un análisis DRX fue llevado a cabo para cada muestra.

2.7 FTIR.

El análisis FTIR fue realizado usando un espectrómetro Cary 630 FTIR (Agilent Technologies Inc.) para los materiales sintetizados, siguiendo mediciones de ATR (*attenuated total reflectance*) en el rango entre 4000 y 400 cm^{-1} .

2.8 Área específica BET.

1 mL de polvos de BG y BGLi (0,1187 g y 0,2151 g respectivamente) fueron usados para el ensayo de adsorción- desorción en ambiente de N_2 de Brunauer, Emmett y Teller (BET), usando un equipo Quantachrome NovaWin (NOVA Instruments, Quantachrome Instruments, versión 11.03). El área de superficie específica BET de las muestras fue medido por adsorción de nitrógeno a 273°K.

2.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

En los ensayos de micro dureza Vickers, y en pruebas antibacterianas, se realizaron pruebas t de dos muestras, con varianzas desiguales, con un nivel de significancia de $p < 0,05$.

CAPÍTULO III. RESULTADOS

3.1 CARACTERIZACIÓN

3.1.1 CARACTERIZACIÓN DE PARTÍCULAS DE BG Y BGLi.

La composición de los biovidrios sintetizados por el método sol-gel fue analizada por EDS como se muestra en la **Tabla 2**, mostrando diferencias entre las composiciones experimentales y teóricas. En el caso de BGLi, la concentración de litio no pudo ser medida, debido a limitaciones técnicas.

Tabla 2. Composición experimental y teórica de biovidrios.

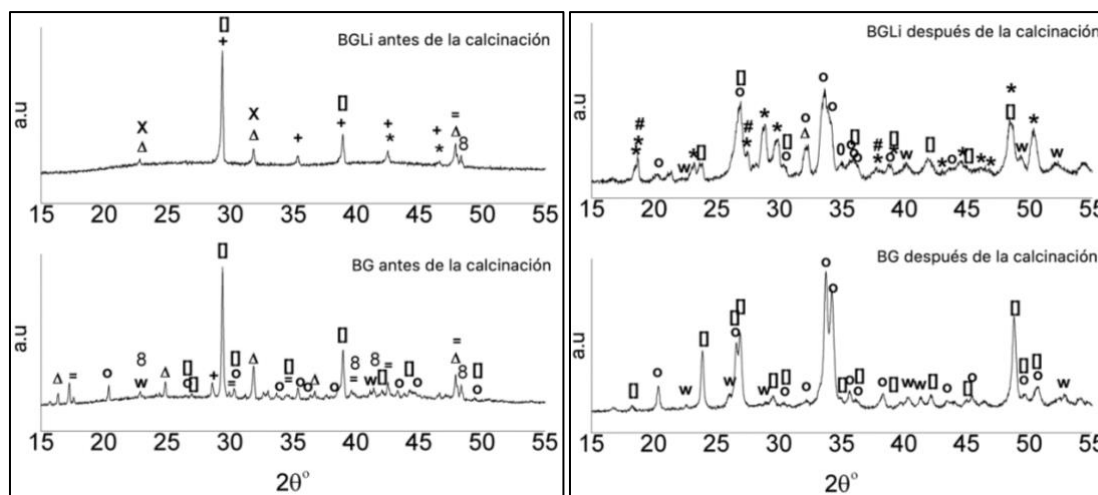
wt%	Si	P	Na	Ca	Li
BG teórico	46,1	2,6	24,4	26,9	-
BGLi teórico	46,1	2,6	24,4	21,9	5
BG experimental	41,7	1,4	18,9	36,3	-
BGLi experimental	44,3	1,3	22,5	31,9	-

El análisis DRX (**Figura 6**) muestra la presencia de diferentes estructuras cristalinas en el BG, como $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$, $\text{Na}_2\text{Ca}_3\text{Si}_6\text{O}_{16}$ y CaSiO_3 [35]. En el caso de BGLi también se observan las fases cristalinas mencionadas anteriormente [35], y además otras estructuras cristalinas como $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ [102], $\text{Li}_2\text{Ca}_4\text{Si}_4\text{O}_{13}$ y Li_2SiO_3 [103]. Estos picos de difracción muestran que nuestro método sol gel produjo biocerámicas semicristalinas, más que un biovidrio amorfo, así como se había reportado previamente [35].

Además, y luego de la síntesis de biovidrios, previo al proceso térmico, los DRX de las partículas, muestran picos característicos de los nitratos utilizados en el método sol-

gel: NaNO_3 (JCPDS 01-079-2056) [104], $\text{Ca}(\text{NO}_2)_3$ (JCPDS [07-0204]) y $\text{Ca}(\text{NO}_2)_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (JCPDS [27-0087]) [105]. Una vez sometidos al proceso térmico, estos picos tienden a desaparecer.

Figura 6. DRX muestra picos característicos de las partículas de BG y BGLi después del proceso térmico, demostrando la presencia de diferentes estructuras: \circ : $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$ (JCPDS N° 22-1455), \square $\text{Na}_2\text{Ca}_3\text{Si}_6\text{O}_{16}$ (JCPDS N° 23-671), $+$ NaNO_3 (01-079-2056), $\mathbf{8}$ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (JCPDS [07-0204]), $=$ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (JCPDS [27-0087]) Δ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (JCPDS N° 70-2064), w CaSiO_3 (JCPDS N° 042-0547), $*$ $\text{Li}_2\text{Ca}_4\text{Si}_4\text{O}_{13}$ (JCPDS N° 82-1106), $\#$ Li_2SiO_3 (JCPDS N° 554-13-2).



Con el fin de complementar la caracterización de estos materiales, el área específica de los polvos de BG y BGLi, mediante el método BET, fue determinada, resultando en valores de $6,42 \text{ m}^2/\text{g}$ y $1,26 \text{ m}^2/\text{g}$ respectivamente (**Tabla 3**). Los valores obtenidos para BGLi son bastante parecidos a los encontrados en la literatura para BG 45S5[®], confeccionados por el tradicional método de fundido, siendo más densos que porosos [106]. Estos valores son bajos, considerando la síntesis por el método sol-gel, posiblemente por la presencia de cristales [106].

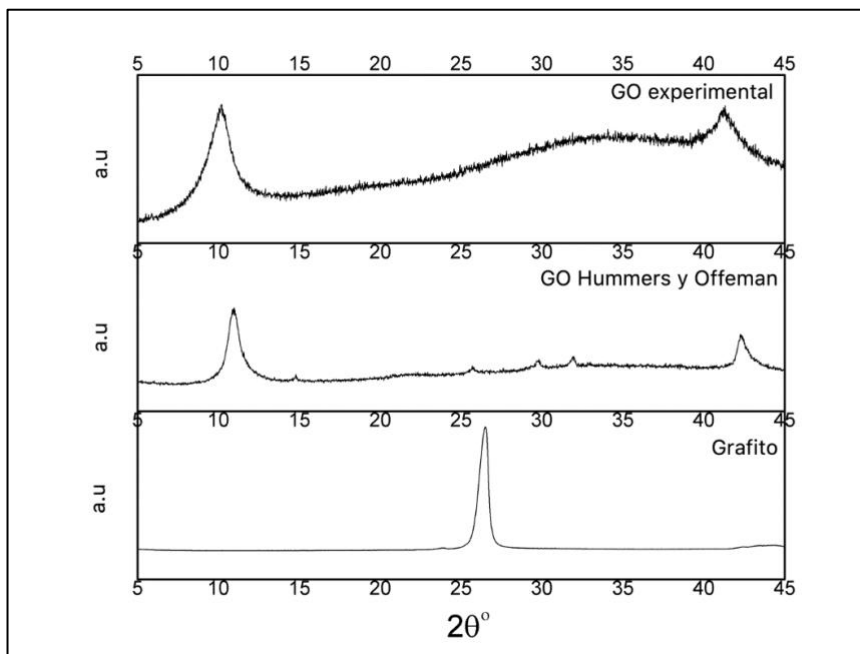
Tabla 3. Área específica BET de biovidrios sintetizados por método sol-gel.

Biovidrio	Área específica BET m²/g
BG	6,42
BGLi	1,26

3.1.2 CARACTERIZACIÓN DE GO.

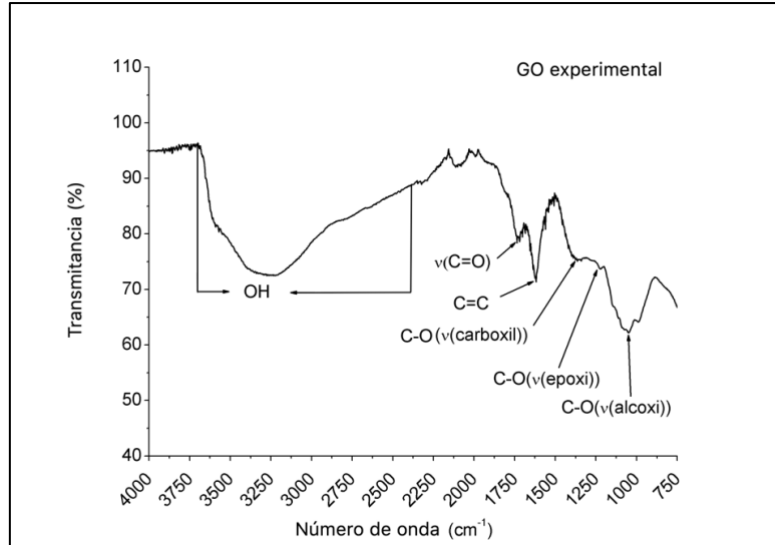
Los patrones de difracción del GO, obtenidos por el método experimental desarrollado en esta tesis, se muestran en la **Figura 7**, donde se compara con el GO obtenido por el método de Hummers y Offeman. El pico de difracción característico para GO, se desplaza a la izquierda en el método experimental: $2\theta^{\circ}= 10, 2^{\circ}$, en comparación a $2\theta^{\circ}= 11^{\circ}$, observado en el GO sintetizado por el método de Hummers. Este pico de difracción observado en el GO obtenido por ambos métodos es característico del plano cristalino (001). El mayor ensanchamiento del pico de difracción observado en el GO propuesto, comparado con el GO obtenido por el método de Hummers, se asocia al incremento de la distancia entre las capas de óxido de grafeno, debido a la introducción de mayor cantidad de grupos conteniendo oxígeno [17, 107]. Se observa un corrimiento hacia la izquierda del pico característico del grafito ($2\theta^{\circ}= 26, 5^{\circ}$), que se asocia a la oxidación del grafito y a un incremento en la distancia entre laminas. Lo anterior se corresponde con lo encontrado en la literatura [17, 108, 109]. La distancia entre dos láminas es un parámetro importante para confirmar cambios en el grafito hacia GO [18].

Figura 7. DRX realizado sobre muestras de GO, sintetizadas por método experimental propuesto. Comparación con GO sintetizado por método de Hummers, y con grafito sin procesar.



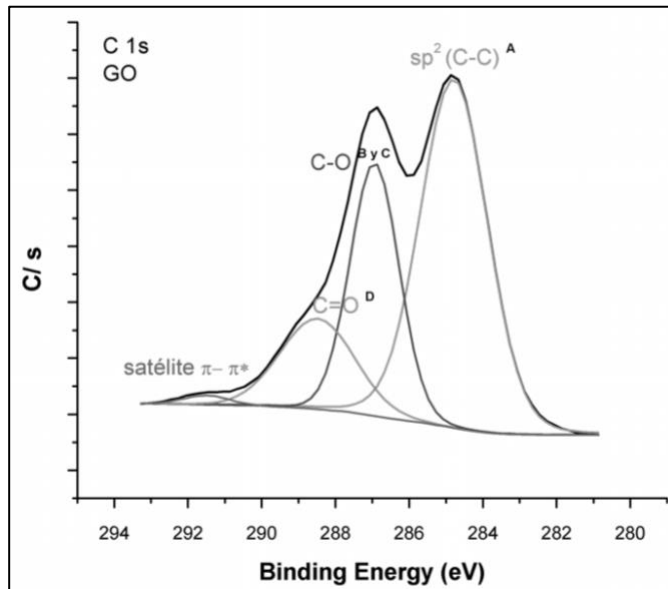
El espectro FTIR para el GO, sintetizado con la técnica experimental propuesta, se muestra en la **Figura 8**. Se observa una amplia banda entre 3700 y 2250 cm^{-1} , correspondiente al estiramiento del grupo hidroxilo. Las vibraciones de los enlaces carbonilo- carboxilo ($\text{C}=\text{O}$) en 1721 cm^{-1} y el estiramiento de enlaces aromáticos ($\text{C}=\text{C}$) en 1620 cm^{-1} son también observados. Las bandas correspondientes a grupos carboxilo ($\text{C}-\text{O}$) en 1378 cm^{-1} ; epoxi ($\text{C}-\text{O}$) en 1217 cm^{-1} ; y alcoxi ($\text{C}-\text{O}$) en 1042 cm^{-1} , confirman la presencia de grupos funcionales conteniendo oxígeno, lo que se corresponde a lo observado en la literatura [110].

Figura 8. FTIR observado en muestra de GO, sintetizado por técnica experimental propuesta.



El ensayo de XPS del GO, sintetizado por el método experimental propuesto, permite observar una señal del espectro en alta resolución de C 1s (**Figura 9**), donde el ajuste de curvas indica la presencia de tres bandas: C-C (284,8 eV), C-O (286,7 eV) y C=O (288,4 eV), lo que se corresponde con lo observado en la literatura [23, 74]. Esto confirma que el método propuesto logra oxidar el grafeno, obteniendo GO.

Figura 9. XPS observado en muestra de GO, sintetizado por técnica experimental.

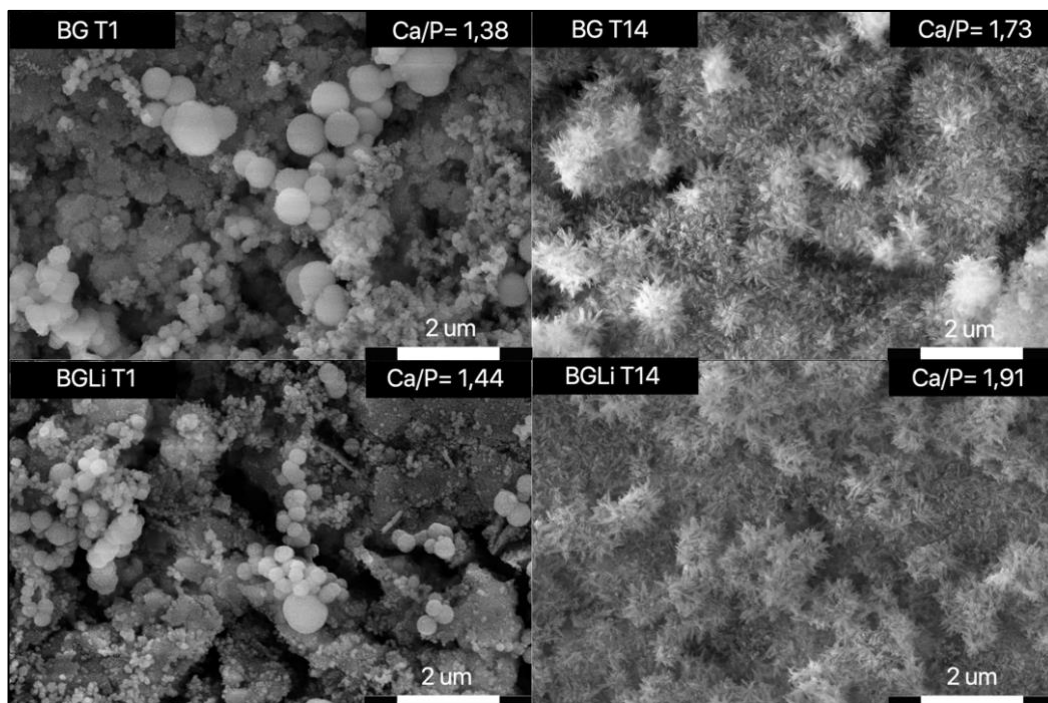


3.2 PRUEBAS DE BIOMINERALIZACIÓN

3.2.1 PRUEBAS DE BIOMINERALIZACIÓN SOBRE TABLETAS DE BIOVIDRIOS

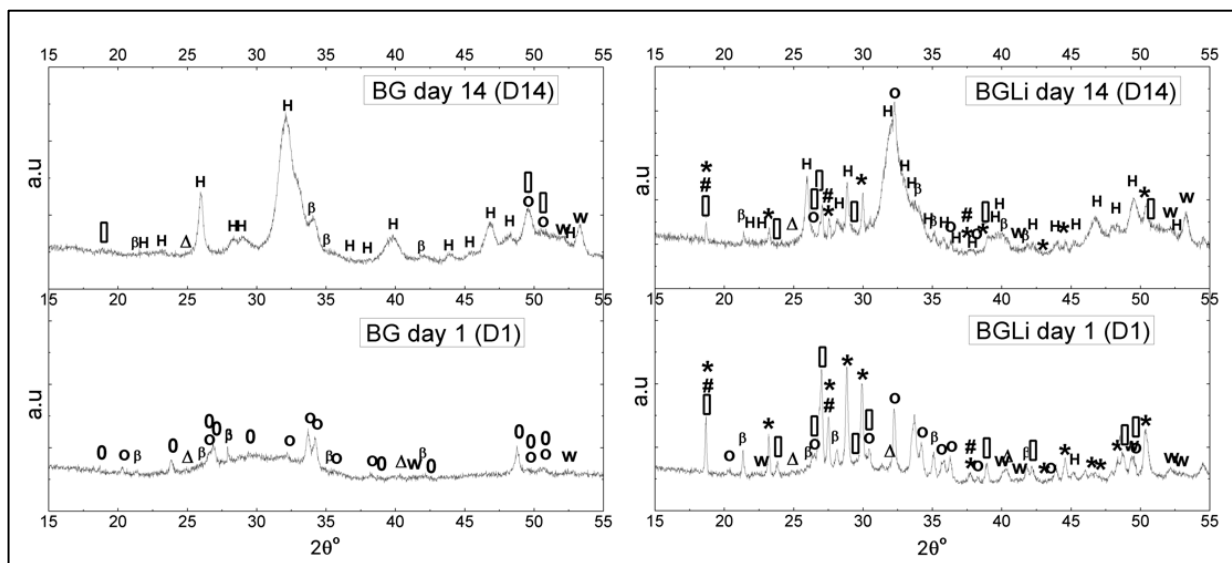
La **Figura 10** muestra micrografías SEM de las superficies de las muestras de BG y BGLi, después de 24 horas de exposición a SBF. Estructuras semiesféricas densas y lisas se observaron principalmente, con tamaños submicrométricos o nanométricos [111]. Las estructuras precipitadas no fueron distribuidas homogéneamente sobre la superficie de la muestra. Después de 14 días, la morfología de estos precipitados cambió a aglomerados pseudo-esféricos, formadas a su vez por estructuras laminares. Cabe destacar que las imágenes SEM muestran que las partículas precipitadas cubren una gran área de superficie, comparado con las muestras inmersas por 24 horas (**Figura 10**).

Figura 10. Pruebas de biomineralización sobre tabletas de biovidrios. Imágenes SEM muestran partículas precipitadas sobre la superficie de las tabletas de BG y BGLi, después de 24 horas (T1) y catorce días (T14). La razón Ca/P de las superficies de biovidrios fue analizada por EDS.



El análisis por EDS confirma la presencia de Ca, P y O, lo que significa que las nuevas partículas corresponden a fosfato de calcio. En las muestras inmersas por 24 horas, la razón Ca/P es de 1,38 y 1,44, para las estructuras formadas sobre tabletas de BG y BGLi, respectivamente. Sin embargo, las partículas formadas después de 14 días tienen una razón Ca/P para BG de 1,73 y para BGLi de 1,91 (**Figura 10**).

Figura 11. DRX muestra picos característicos de diferentes estructuras de BG y BGLi: **o**: $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$ (JCPDS N° 22-1455), **□** $\text{Na}_2\text{Ca}_3\text{Si}_6\text{O}_{16}$ (JCPDS N° 23-671), **Δ** $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (JCPDS N° 70-2064), **w** CaSiO_3 (JCPDS N° 042-0547), * $\text{Li}_2\text{Ca}_4\text{Si}_4\text{O}_{13}$ (JCPDS N° 82-1106), # Li_2SiO_3 (JCPDS N° 554-13-2). Picos de difracción correspondientes a **β** β -TCP (JCPDS N° 09-0169) y **H** HA (JCPDS N° 24-0033) son encontrados también.



El análisis de DRX (**Figura 11**) de las tabletas, después de 14 días de inmersión bajo el test de bioactividad estándar, muestra picos característicos para β -TCP (JCPDS N° 09-0169) y cristales de HA (JCPD N° 24-0033) [112- 116]. Estos picos confirmaron que las estructuras precipitadas sobre las tabletas derivaron desde fosfatos de calcio, en particular hidroxiapatita. Por lo tanto, ambos biovidrios son bioactivos. Para muestras inmersas un día en SBF, estos picos no fueron observados, probablemente debido a la

presencia de fosfato de calcio amorfo. Al lado de estos picos, fueron observados picos de: $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$ (JCPDS N° 22-1455), $\text{Na}_2\text{Ca}_3\text{Si}_6\text{O}_{16}$ (JCPDS N° 23-671), $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (JCPDS N° 70-2064), CaSiO_3 (JCPDS N° 042-0547), $\text{Li}_2\text{Ca}_4\text{Si}_4\text{O}_{13}$ (JCPDS N° 82-1106), y Li_2SiO_3 (JCPDS N° 554-13-2).

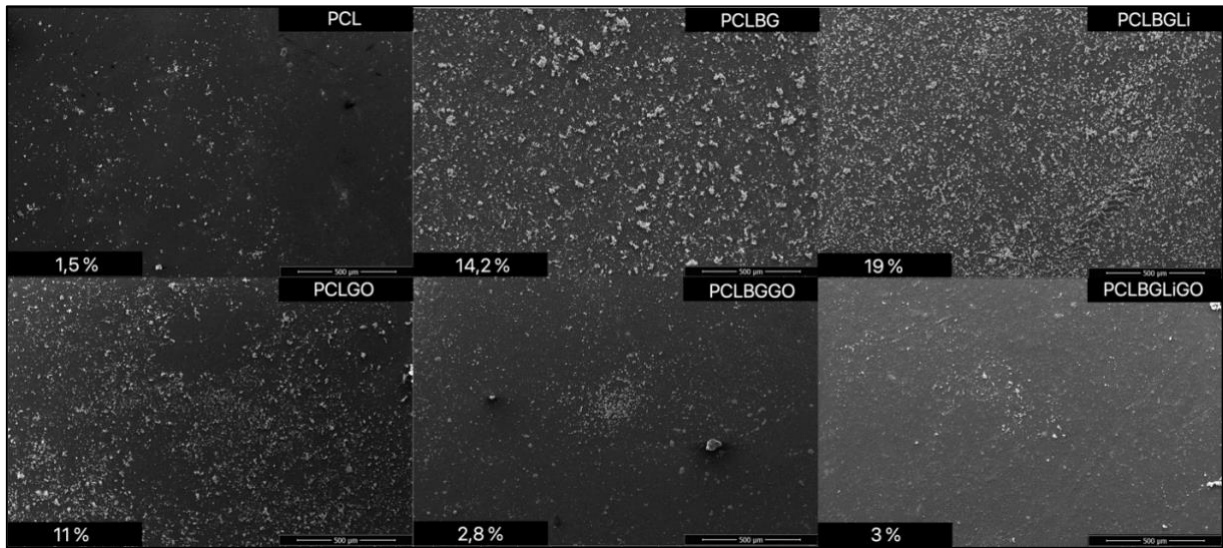
En el caso de las tabletas confeccionadas, combinando BG y BGLi con GO 0,5%, al entrar en contacto con SBF perdieron su integridad, por lo que no fue posible el análisis sobre la superficie de las tabletas, viéndose afectado el resultado obtenido.

3.2.2 PRUEBAS DE BIOMINERALIZACIÓN SOBRE SUPERFICIES DE COMPÓSITOS HECHOS CON PCL/BG/BGLi/GO.

En la **Figura 12** se observa la superficie de los materiales compuestos confeccionados, en una concentración de 200 mg/mL para BG y BGLi, y de 0,05 mg/mL para GO, luego de ser inmersos en SBF durante 56 días. En todas las muestras inmersas, incluida la muestra control (PCL), depósitos de fosfato de calcio o de sus derivados fueron observados sobre sus superficies, luego de 56 días de exposición.

Las imágenes SEM procesadas en el programa Image J, permitieron apreciar que PCL combinado con BGLi presentó el mayor porcentaje de su superficie cubierta con depósitos de partículas (19%), seguida de PCL combinado con BG (14,2%) y PCL combinado con GO (11 %). PCL puro presentó el menor porcentaje de su superficie cubierta por depósitos de fosfato de calcio (1,5%).

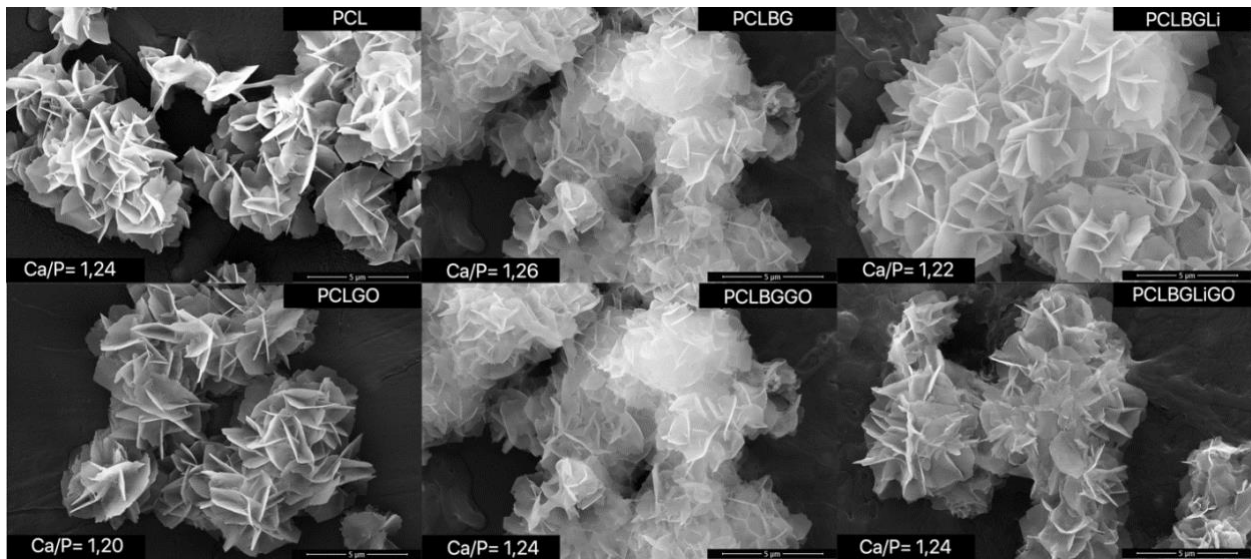
Figura 12. Imágenes SEM materiales compuestos. Porcentaje de área cubierta con depósitos de fosfato de calcio, luego de 56 días de exposición a SBF. **a. PCL** (control); **b. PCLBG** (policaprolactona combinada con BG); **c. PCLBGLi** (policaprolactona combinada con BGLi); **d. PCLGO** (policaprolactona combinada con GO); **e. PCLBGGO** (policaprolactona combinada con BG y GO); **f. PCLBGLiGO** (policaprolactona combinada con BGLi y GO).



Al observar la **Figura 13**, correspondiente a imágenes SEM, con un aumento de 20000X, podemos observar aglomerados pseudo-esféricos de partículas, formados a su vez por estructuras laminares, depositadas sobre las superficies de los materiales compuestos expuestos a SBF. Estas estructuras son muy parecidas a las observadas en el ensayo estándar, realizado sobre tabletas de polvos compactados.

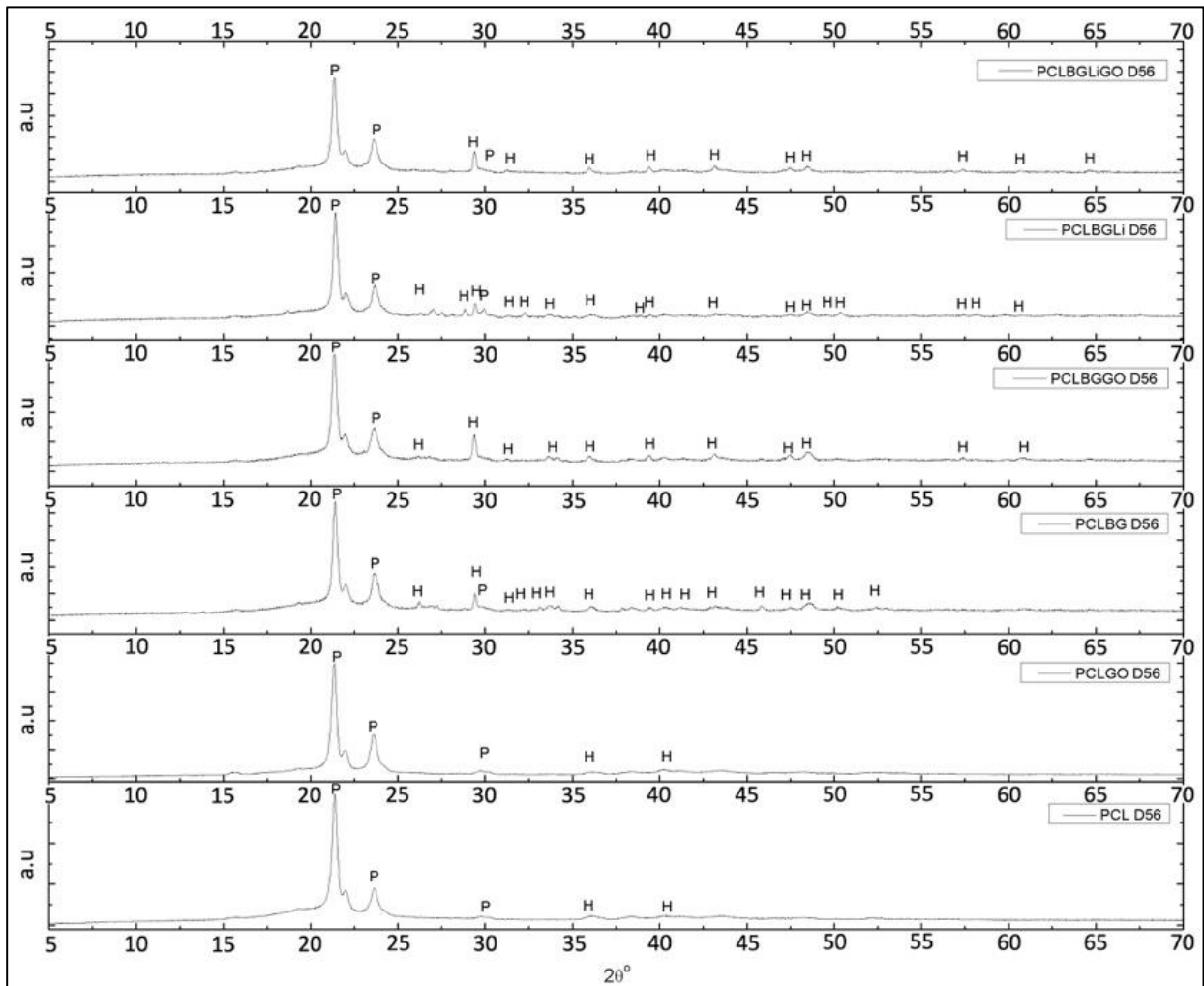
El análisis EDS, realizado sobre estas estructuras, permite observar una relación Ca/P en un rango entre 1,2 (observada en PCL/GO) y 1,26 (observada en PCL/BG).

Figura 13. Imágenes SEM materiales compuestos. Relación Ca/P observada, obtenida por análisis EDS, luego de 56 días de exposición a SBF.



DRX muestra la presencia de picos característicos para ϵ - policaprolactona [117, 118] y para hidroxiapatita, en todas las muestras sometidas al ensayo de biomineralización. En aquellas muestras correspondientes a materiales compuestos confeccionados con BG y BGLi, se observan mayor cantidad de picos correspondientes a HA (**Figura 14**).

Figura 14. DRX de materiales compuestos expuestos a SBF por 56 días. Picos de difracción correspondientes a: **P** ϵ - Policaprolactona (JCPDS N° 0-1431) e **H** HA (JCPDS N° 24-0033).

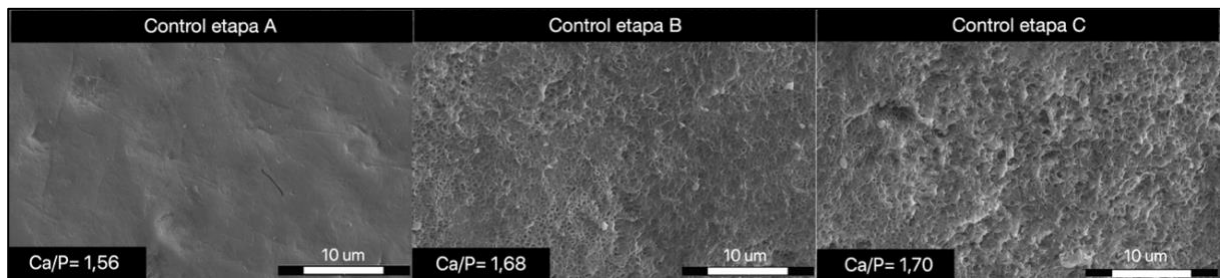


3.2.3 ENSAYO DE REMINERALIZACIÓN *IN VITRO* SOBRE ESMALTE.

La **Figura 15** muestra las imágenes SEM obtenidas por el grupo control durante el test de desmineralización *in vitro*. La **Figura 15.A** mostró la superficie del esmalte dentario, sin ningún tratamiento, exhibiendo una superficie lisa. Después de estar en saliva artificial con una solución de *S. mutans* y sacarosa, la superficie del esmalte presentó una morfología porosa, que significa un proceso de desmineralización (**Figura 15.B**). Incrementando el tiempo de exposición (**Figura 15.C**), la porosidad se incrementó, lo que significó un proceso de desmineralización adicional. Esta Figura confirma que la

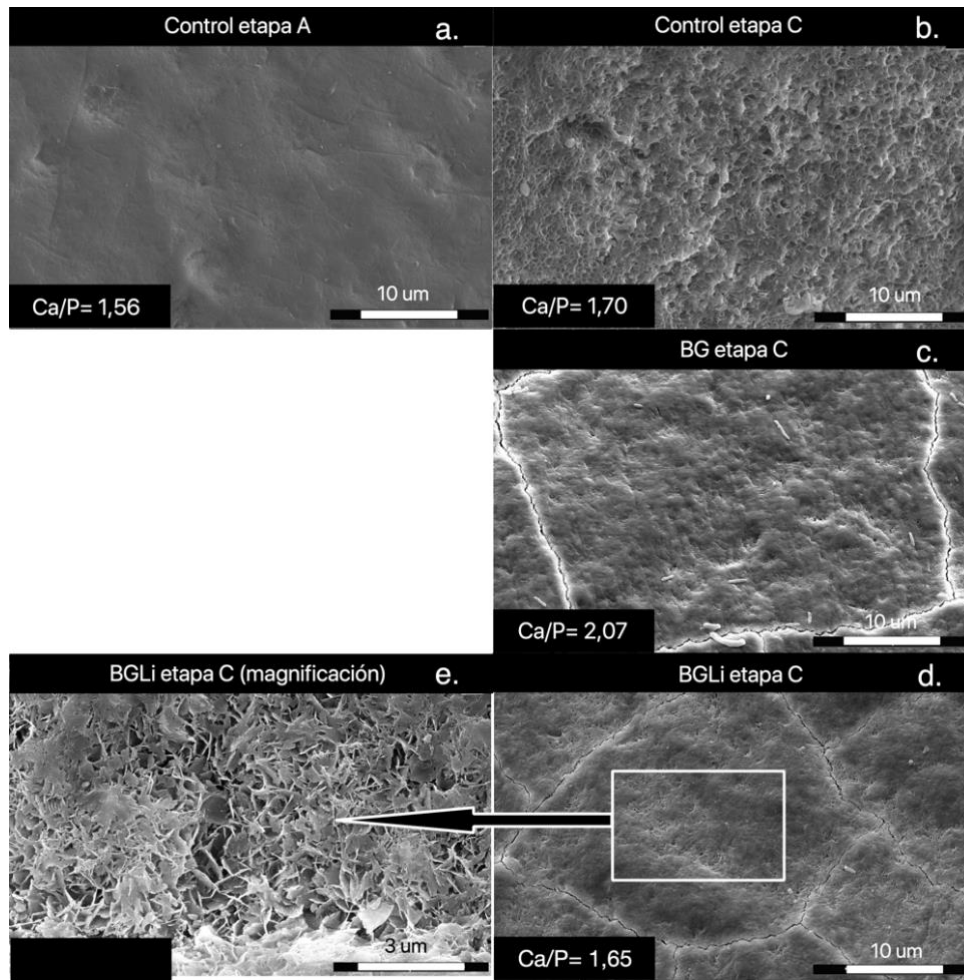
metodología desarrollada imita el proceso de desmineralización, asociado a la caries [119, 120].

Figura 15. Ensayo *in vitro* desmineralización- remineralización sobre esmalte dental. Imágenes SEM del grupo Control (esmalte sin tratamiento y sólo en contacto con saliva artificial): A (inicial), B (post ensayo desmineralización) y C (post ensayo remineralización). Relación Ca/P de superficie de esmalte fue analizada por EDS.



La relación Ca/P de BG y BGLi fue analizada por EDS y se muestra en la Figura 16, donde 16.a muestra la superficie del esmalte, previo al ensayo de desmineralización (etapa inicial); 16.b muestra el esmalte observado en el grupo control, luego del ensayo de remineralización, pero sin ser expuesto a los biovidrios; 16.c, a la superficie de esmalte expuesta a BG, en el ensayo de remineralización (expuesto a BG); 16.d, a la superficie de esmalte expuesta a BGLi, en el ensayo de remineralización; y 16.e, a la superficie de esmalte sometida a ensayo de remineralización (expuesto a BGLi), con un mayor aumento en la imagen.

Figura 16. Ensayo *in vitro* de desmineralización- remineralización sobre esmalte dental. Imágenes SEM: A (inicial) y C (post ensayo de remineralización).



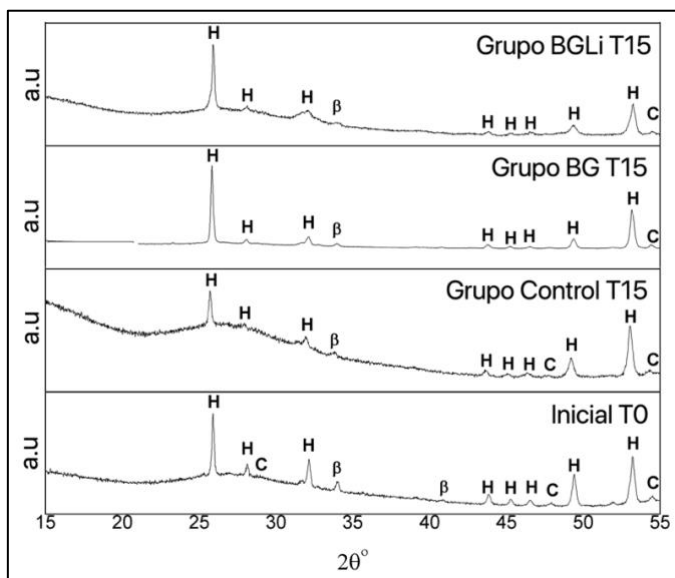
Añadiendo biovidrios para la prueba de remineralización (Zona C en **Figura 16**), se observa un cambio en la morfología de la superficie remineralizada (**Figura 16.c y d**), comparado con la zona desmineralizada (**Figura 16.b**). En particular, se observó un nuevo material cubriendo la superficie del esmalte desmineralizado (**Figura 16.c y d**), cuya estructura laminar (**Figura 16.e**) es muy similar a la observada para HA en el test de bioactividad estándar (ver **Figura 10**). La presencia de esta nueva capa confirma que los biovidrios fueron capaces de remineralizar la superficie del esmalte. Es importante destacar la estabilidad de esta capa, ya que a pesar de que las muestras fueron lavadas

y limpiadas, los depósitos minerales en los grupos experimentales permanecieron adheridos al esmalte desmineralizado.

Para evaluar más a fondo las estructuras formadas durante las pruebas de bioactividad estándar *in vitro*, se llevó a cabo el análisis EDS para medir la relación atómica Ca/P. Aunque esta relación es de 1,67 para HA estequiométrica ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), durante su formación sobre precursores de partículas bioactivas, también se pueden presentar otros valores. La relación Ca/P del diente original y del diente, después de la prueba de desmineralización *in vitro*, resultó ser parecida en sus valores, lo que podría explicarse por qué la composición del tejido intervenido, compuesto por HA, es similar en la superficie y en la masa [121]. Cabe destacar que la relación Ca/P, en el ensayo posterior a la remineralización, es cercana a la observada en los tejidos duros originales, lo que confirma el proceso de remineralización.

El análisis DRX llevado a cabo sobre las muestras estudiadas, confirmó los resultados anteriores (Figura 17). El grupo control muestra picos característicos de HA, al igual que las muestras correspondientes a los grupos experimentales. Sin embargo, estos picos presentan una disminución en su expresión, menor a los observados en las muestras tratadas con BG y BGLi. Esto podría deberse a la disminución de estructuras de hidroxiapatita, asociado al proceso de desmineralización. El diente indemne, sin tratamiento, presentó fuertes picos, principalmente de cristales de hidroxiapatita y algunos pequeños picos de estructuras de β -TCP y CaO [122].

Figura 17. DRX muestra picos característicos de la superficie de esmalte después de 15 días de exposición de biovidrios: **β** β-TCP (JCPDS N° 09-0169), **H** HA (JCPDS N° 24-0033), **C** CaO (JCPDS N° 37-1497).

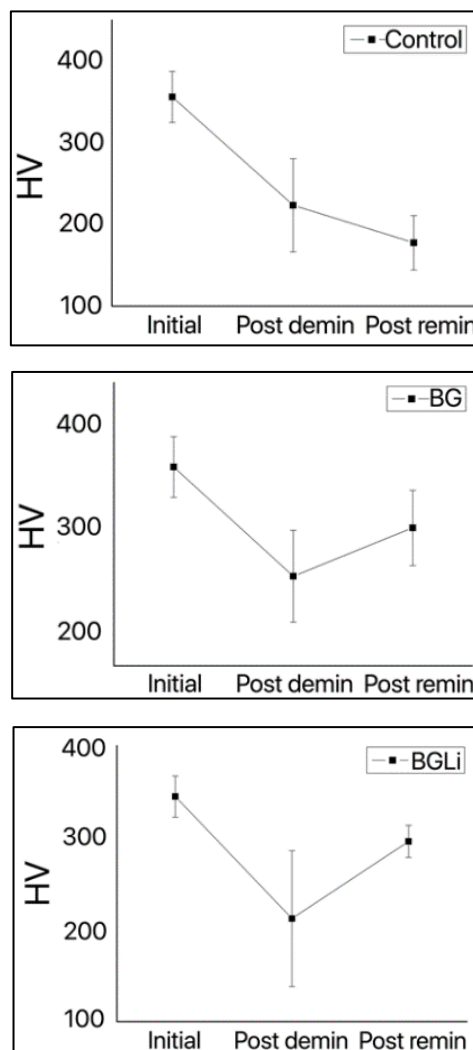


Después de las pruebas de remineralización *in vitro*, se observaron picos de difracción asociados con hidroxiapatita. Algunos picos amplios y pequeños, característicos para β-TCP y CaO fueron también observados [115, 123]. Cabe señalar, que los dientes tratados presentaron DRX similares a las del diente original, posiblemente asociados a un proceso de remineralización.

En relación a los test de micro dureza Vickers (HV) observados en la **Figura 18**, es posible apreciar diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,0001$) entre los valores promedio de micro dureza post- desmineralización y el valor inicial del esmalte dental. HV decreció un 40% en todos los grupos, en relación al valor inicial, validando el método experimental usado para desmineralizar los dientes. Comparando los valores HV entre las muestras desmineralizadas y las muestras tratadas, se concluye un incremento en el proceso de remineralización, equivalente a aproximadamente el 80% del valor de dureza original (82% para las muestras expuestas a BG y 86% para las muestras expuestas a BGLi). Por ejemplo, la diferencia de micro dureza entre muestras desmineralizadas y

muestras tratadas con BGLi fue de 81,8 HV (SD= 15,5); y de 64,1 HV (SD= 18,8) cuando fue usado BG ($p < 0,001$ versus $p < 0,05$ respectivamente), siendo el incremento de dureza de aproximadamente un 28% para los dientes expuestos a BG y de aproximadamente un 38% para los dientes expuestos a BGLi. Sin embargo, este aumento en la micro dureza fue independiente del tipo de biovidrio, dado que, al comparar los valores obtenidos, no se detectaron diferencias significativas entre resultados para BG y BGLi. Por lo tanto, ambos biovidrios fueron capaces de recuperar de la misma manera la HV de los dientes desmineralizados, confirmando el proceso de remineralización.

Figura 18. Valores de dureza Vickers en grupo control y grupos experimentales.



3.3 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

La **Tabla 4** muestra el efecto de las diferentes concentraciones de biovidrios usadas en estos ensayos, sobre la viabilidad de *S. mutans*, *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*. Las partículas de BG y BGLi produjeron un efecto antibacteriano sobre *S. mutans* a una concentración mínima inhibitoria de 50 mg/mL. A estas concentraciones, las partículas además produjeron un cambio en el pH, con valores sobre 7 (**Tabla 5**), lo que produce inhibición del crecimiento bacteriano. En la prueba conducida sobre *P. gingivalis* (**Tabla 4**), la inhibición del crecimiento bacteriano fue observada en caldos expuestos a 200 mg/mL para ambas partículas. Esta inhibición del crecimiento bacteriano también coincide con cambios en el pH, con valores superiores a 8 (**Tabla 5**). Pruebas antibacterianas sobre *A. actinomycetemcomitans* (**Tabla 4**), mostraron resultados de inhibición en el crecimiento bacteriano, con los valores más bajos de concentración, y contrario a las otras bacterias, hubo un efecto significativo para el tipo de partícula, con BGLi mostrando un mayor efecto antimicrobiano que BG (20 y 100 mg/mL, respectivamente).

Para complementar los ensayos anteriores y analizar en mayor detalle el posible efecto de los iones, fueron expuestas las cepas de *A. actinomycetemcomitans* 43718-serotipo b a diferentes nitratos, considerando que los biovidrios se confeccionaron en base a este tipo de sales. Nitratos de Ca, Na, y Li, en concentraciones de 50 mg/mL, concentración intermedia a la observada en los resultados de inhibición del crecimiento de este patobionte al ser expuesto a BGLi y BG (20 mg/mL y 100 mg/mL respectivamente), fueron usados (**Tabla 6**). También se estudió el nitrato de plata como control positivo, por ser un agente de muy alta efectividad antimicrobiana. En este ensayo se pudo apreciar que el nitrato de litio inhibe parcialmente el crecimiento bacteriano, sin alcanzar la inhibición total lograda por el nitrato de plata o de clorhexidina 0,12% (control

positivo o C+), pero con resultados bastante significativos al compararlo con sales de Ca y Na, confirmando que el ion Li genera un efecto antimicrobiano para esta cepa, lo que explicaría que el BGLi tenga un MIC con una menor concentración, respecto al BG.

La **Tabla 7** muestra el efecto de GO, BG y BGLi, en concentraciones consideradas no citotóxicas, sobre cepas de *S. mutans*, *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*.

El GO, en la concentración utilizada (0,05 mg/mL) no logró una inhibición en el crecimiento de cepas de las bacterias estudiadas, pero si redujo su crecimiento, siendo el efecto más significativo el obtenido sobre cepas de *S. mutans* 25075 (log10 igual a 4). En los ensayos sobre cepas de *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*, esta reducción del crecimiento bacteriano fue menor.

Tabla 4. Ensayo antibacteriano: cepas de *S. mutans* ATCC 25175, *P. gingivalis* ATCC 33277 y *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718-serotipo b. Log10 CFU/mL. **C-** (control negativo BHI), **C+** (clorhexidina 0,12% CHX), **BG** (biovidrio 45S5), **BGLi** (biovidrio 45S5 dopado con Li 5 wt%).

Bacteria (log10)		<i>S. mutans</i> ATCC 25175	<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	<i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC 43718- serotipo b
Control negativo (C-)		8,8	6,6	8,1
Control positivo (C+)		-	4,0	1,8
BG (mg/mL)	5	7,9	5,7	7,4
	10	7,9	5,8	7,7
	20	7,7	5,4	7,0
	50	-	5,4	7,3
	100	-	5,3	-
	200	-	-	-
BGLi (mg/mL)	5	7,5	5,9	7,3
	10	7,7	5,7	7,3
	20	7,5	5,6	-
	50	-	5,5	-
	100	-	5,1	-
	200	-	-	-

Tabla 5. pH: cepas de *S. mutans* ATCC 25175, *P. gingivalis* ATCC 33277 y *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718-serotipo b. **C-** (control negativo BHI), **C+** (clorhexidina 0,12% CHX), **BG** (biovidrio 45S5), **BGLi** (biovidrio 45S5 dopado con Li 5 wt%).

Bacteria (pH)		<i>S. mutans</i> ATCC 25175	<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	<i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC 43718- serotipo b
Control negativo (C-)		4,9	7,3	5,7
Control positivo (C+)		6,9	7,0	7,1
BG	5	5,0	7,2	5,8
	10	5,1	7,6	5,9
	20	5,7	7,2	5,7
	50	8,7	7,9	6,9
	100	8,9	8,3	8,8
	200	8,9	8,8	8,8
BGLi	5	5,0	7,4	5,6
	10	5,0	7,0	5,7
	20	5,2	7,5	6,0
	50	8,4	7,5	6,9
	100	8,8	8,1	7,7
	200	8,8	8,8	7,7

Tabla 6. Ensayo antibacteriano hecho sobre cepas de *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718-serotipo b. Log10 UFC / mL utilizando nitratos de **Ca, Na, Li y Ag** en una concentración de 50 mg/mL. **BHI** (control negativo), **CHX** (control positivo).

Bacteria (log10)	<i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC 43718- serotipo b
Control negativo (C-)	8,6
Control positivo (C+)	-
Ca(NO₃)₂	8,7
NaNO₃	8,0
LiNO₃	5,5
AgNO₃	-

Tabla 7. Ensayo antibacteriano hecho sobre cepas de *S. mutans* ATCC 25175, *P. gingivalis* ATCC 33277 y *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718-serotipo b. **C-** (control negativo BHI), **C+** (clorhexidina 0,12% CHX), **GO** (óxido de grafeno), **BG** (biovidrio 45S5), **BGLi** (biovidrio 45S5 dopado con Li 5 wt%).

Bacteria (log10)	<i>S. mutans</i> ATCC 25175	<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	<i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC 43718- serotipo b
Control negativo (C-)	8,6	6,6	7,3
Control positivo (C+)	-	4,0	-
GO 0,05 mg/mL	4,0	6,0	6,5
BG 200 mg/mL	-	-	-
BGLi 200 mg/mL	-	-	-

3.4 DISCUSIÓN GENERAL

Los materiales sintetizados en el presente estudio han demostrado tener propiedades remineralizantes y antibacterianas, las que podrían ser de utilidad en la confección de productos que puedan ser utilizados en la reparación de tejidos dentarios asociados a la enfermedad de caries; o en procesos de regeneración de otros tejidos duros, como hueso, en el tratamiento de pérdida de tejido como consecuencia de la enfermedad periodontal.

Las muestras sintetizadas por el método sol-gel presentan una composición química experimental, próxima a los valores esperados desde la teoría (ver **Tabla 1**). La discordancia observada probablemente pueda ser debida a las características elementales del análisis EDS, incapaz de distinguir entre especies iónicas y no iónicas. Por lo tanto, en los valores de la **Tabla 2**, correspondiente a los observados en la composición experimental de los biovidrios y a la composición teórica de estos, se asumen ciertos estados de oxidación de los átomos medidos, lo que podría explicar el desajuste observado.

Los resultados de la difracción de rayos X (**Figura 5**), muestran que nuestras partículas de biovidrio presentaron cristales que se forman durante el proceso térmico (las muestras sintetizadas sin ser sometidas a este proceso no presentaron estos picos). La presencia de estos cristales no tiene una consecuencia directa sobre la bioactividad, ya que, en otros estudios, los cristales de silicato de calcio indujeron la formación de apatita en SBF [43]. De hecho, la presencia de combeita, asociada a la incorporación de Na a la estructura del biovidrio cuaternario, además de mejorar sus propiedades mecánicas, aumenta la bioactividad del biovidrio [35].

La no relevancia de los cristales presentados en nuestras partículas, se confirmó en las pruebas de biomineralización. La difracción de rayos X sobre las tabletas

confeccionadas, a partir de polvos compactados de BG y BGLi, y sumergidas en SBF por 14 días, confirman que las estructuras depositadas en su superficie son principalmente HA (**Figura 5**), aunque también precipitaron otras estructuras cristalinas, tales como $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$, $\text{Na}_2\text{Ca}_3\text{Si}_6\text{O}_{16}$ y CaSiO_3 [35]. El BGLi, además, mostró precipitación de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ [102], $\text{Li}_2\text{Ca}_4\text{Si}_4\text{O}_{13}$ y Li_2SiO_3 [103], que también contribuyeron a la bioactividad de estos materiales.

Las partículas formadas durante los ensayos de biomineralización, sobre las tabletas de BG y BGLi compactadas, y también sobre los materiales compuestos confeccionados con PCL y polvos de biovidrios, y observadas en las imágenes SEM (**Figuras 9 y 12**), se pueden asociar con la formación de HA en biovidrios y biocerámicas [42, 124]. Similares resultados se observaron en los ensayos de remineralización realizados sobre esmalte (**Figura 16.e**).

Es de destacar que las imágenes de la **Figura 16 (c, d y e)**, correspondientes a la zona de post remineralización *in vitro*, asociadas al efecto de los biovidrios sobre esmalte dental, muestran la deposición superficial de una nueva estructura en el diente, con morfologías laminares similares a la HA precipitada bajo la prueba estándar de bioactividad. Lo anterior fue confirmado por DRX.

Los resultados anteriores, confirman la capacidad de los biovidrios de fomentar la precipitación de partículas bioactivas como HA. El mecanismo está basado en que el biovidrio es un material altamente reactivo en ambientes acuosos, como la saliva [70]. Los iones de calcio y fosfato que se han difundido desde el vidrio forman una capa de fosfato de calcio amorfo sobre la partícula. Esta capa incorpora especies de carbonato presentes en el medio y cristaliza en forma de hidroxiapatita carbonatada, que presenta una relación Ca/P de 1,67 [2]. Esta dinámica formación de HA puede explicar la variación en la relación experimental Ca/P encontrada en nuestro trabajo. Tanto en pruebas de

bioactividad estándar como *in vitro*, las estructuras formadas en la superficie presentaron proporciones Ca/P entre 1,4 y 1,9. El proceso es complejo y dinámico, ya que se pueden formar varias estructuras de fosfato de calcio, dependiendo del tiempo de inmersión [124]. En nuestro caso, en la prueba estándar de bioactividad, se observó una relación Ca/P de 1,38 y 1,41 para BG y BGLi respectivamente, después de 24 horas de inmersión, lo que significa la formación de fosfato de calcio amorfo pobre en Ca, que es una transición hacia estructuras más cristalinas. Sin embargo, después de 14 días de inmersión en SBF, esta relación aumentó a valores de 1,73 y 1,91 para BG y BGLi, respectivamente, lo que significa la presencia de un fosfato de calcio rico en Ca, probablemente estructuras de HA mezcladas con CaO [115]. Popescu y cols [125] establecen que una relación Ca/P entre 1,9 y 2 todavía corresponden a una apatita biológica.

Tanto SBF como saliva artificial, soluciones en las que se realizaron los ensayos en las que se observó biomineralización de los biovidrios, presentan un efecto *buffer*, asociado a su composición. En el caso de SBF, presenta en su formulación Tris (hidroximetil) aminometano y ácido clorhídrico (solución Tris Buffer), a pH 7,4, lo que contribuye a reproducir la formación de fosfato de calcio [126]. La saliva artificial tiene entre sus componentes bicarbonato, fosfato y urea, que actúan modulando el pH, y por lo tanto su capacidad tampón [127]. La liberación de iones presentes en BG (y también en BGLi), ocurre inmediatamente después que estos biomateriales se ponen en contacto con fluidos como SBF o saliva artificial, lo que resulta en un incremento del pH [38]. Esta reacción de lixiviación es común y bien establecida por Hench en los cinco estados propuestos por él [1].

La presencia de Li puede formar una barrera física en las estructuras de sílice reactiva, ya que los compuestos de Li-Si pueden ser insolubles, aumentando la estabilidad

química [128]. Por ejemplo, en sílice reactiva, la presencia de Li impide el ataque de iones hidroxilo [128]. La presencia de esta capa estable, puede explicar la menor bioactividad de biovidrios similares dopados con Li, en comparación con el biovidrio puro [129]. Sin embargo, a pesar de estos antecedentes, nuestros resultados no mostraron una diferencia en la bioactividad de BGLi, en comparación con BG, en las pruebas estándar o *in vitro*. Esta tendencia está más cerca de los resultados recientes de los andamios 3D hechos de $\text{Li}_2\text{Ca}_4\text{Si}_4\text{O}_{13}$ puro, que poseen una biodegradabilidad controlada y una buena capacidad de mineralización de apatita [103]. En este estudio, en donde se sintetizaron, mediante método sol-gel, cristales de $\text{Li}_2\text{Ca}_4\text{Si}_4\text{O}_{13}$ y Li_2SiO_3 , se observó una liberación controlada de iones de litio, desde estas estructuras cristalinas, lo que contribuyó a la posterior formación de HA. Estos procesos de disolución de los cristales de Li, explican su liberación. Los iones de Li liberados se suman a los procesos complejos de disolución del biovidrio puro, que cuando se sumerge en una solución acuosa, tres procesos le ocurren: lixiviación, disolución y precipitación (ver Figura 1). Estos materiales producen un intercambio entre cationes, de elementos alcalinos o alcalinos térreos, con iones H^+ o H_3O^+ . Este intercambio de iones se facilita debido a los cationes que no forman parte de la red del vidrio, y sólo modifican la red formando enlaces de oxígeno no puente. En el caso de los biovidrios, como el 45S5 (tipo A), esta liberación de iones modificadores de red es rápida [1].

La presencia de litio genera un incremento de la parte polar en la superficie, lo que determina un incremento en la humectabilidad, contribuyendo a una superficie hidrofílica y favoreciendo una rápida regeneración ósea [125].

Lo más relevante respecto al efecto del dopaje con Li, dice relación con que a pesar de que estudios previos mostraban que su presencia disminuye la bioactividad del biovidrio, nuestros resultados no mostraron diferencias. Esto, a pesar de que el BGLi

presenta una menor área específica (**Tabla 3**), asociada a una mayor densidad del material. Rezabeigi y cols **[106]** lograron sintetizar BG con un área de superficie de 11,75 m²/g, 10 veces mayor al obtenido en métodos de síntesis de BG por fundido. Al compararlo con los biovidrios sintetizados en el presente trabajo, se concluye que tanto BG como BGLi resultaron ser más densos, siendo los valores de BGLi muy similares al BG obtenido por fundido **[124, 130]**.

Las lesiones erosivas dentales tempranas se caracterizan por una pérdida completa del tejido dental externo y un área subsuperficial ligeramente desmineralizada, lo que produce propiedades mecánicas deficientes. Sin embargo, la remineralización puede mejorar y restaurar las propiedades micromecánicas **[131]**, lo que podría tener una aplicación en el tratamiento de lesiones tempranas de esmalte, mediante el uso de estos materiales sintetizados en dentífricos o mediante aplicación directa, en la zona dental afectada, por un profesional. En este contexto, las mediciones de dureza proporcionan información sobre la densidad mineral y las propiedades mecánicas de las superficies de tejido duro, siendo bien conocidas por los estudios sobre lesiones desmineralizadas de esmalte y dentina **[132]**. Nuestros resultados de micro dureza confirman la fuerte capacidad de restauración de los biovidrios, como se informó anteriormente, asociada al alto contenido de calcio y fosfato, que son agentes con alta penetración, y a la alta capacidad de remineralización, en las lesiones sub superficiales de esmalte. La disminución de la micro dureza durante la desmineralización, se debe a la pérdida de Ca²⁺ y PO₄³⁻, y la posterior disolución de la apatita, mientras que la remineralización aumenta el comportamiento mecánico a través de una ganancia de estos iones y la posterior cristalización de la apatita **[71]**. El aumento de la micro dureza, debido a la presencia de biovidrios, está por lo tanto directamente asociado a la presencia de un nuevo depósito mineral, hidroxiapatita en nuestro caso **[132]**.

El PCL es un poliéster alifático, muy utilizado en aplicaciones médicas, debido a que se puede degradar en cadenas pequeñas por hidrólisis, siendo su tasa de degradación predecible [133]. En películas sólidas y no porosas, como las preparadas en la presente tesis, este polímero, combinado con biovidrios, ha demostrado el depósito de fosfato de calcio, de manera similar a lo observado en un estudio semejante [134], y a lo observado en nuestro caso en la **Figura 12**. La interacción entre las partículas de relleno expuestas en los compósitos de PCL-BG y PCL-BGLi, y el medio de inmersión pueden explicar este fenómeno. La duración del ensayo, de tan sólo ocho semanas, no nos permitió observar un fenómeno cuantificable de degradación del polímero, pero la distribución homogénea de depósitos asociados a Ca y P nos permiten suponer que parte de la superficie del polímero sufrió del fenómeno de hidrólisis. Las partículas de biovidrios, tal como sucede con otros silicatos de calcio, contribuyen a acelerar la degradación de la matriz polimérica [135], lo que podría ser de utilidad para la confección de andamios o membranas reabsorbibles, de uso en regeneración de estos tejidos.

Llama la atención, el alto porcentaje de biomineralización alcanzado por el material compuesto por PCL y GO (PCLGO) (11 %, versus un 19% y un 14,2% de compuestos de PCL-BGLi y PCL-BG respectivamente). Posiblemente, la presencia de grupos funcionales aniónicos presentes en el GO (carboxilo, epoxi y alcoxi) faciliten la nucleación de fosfato de calcio, al atraer un mayor número de cationes de Ca^{2+} sobre la superficie del compósito, lo que a su vez permitirá el depósito de PO_4^{3-} [136].

Al combinar PCL con biovidrios y GO, el depósito de partículas disminuye, situándose por debajo de los valores observados para PCL combinado con GO. Lo anterior puede deberse a la interacción entre iones de ambos materiales, compitiendo con las sales de Ca y P presentes en el medio. Tal como en otros estudios, también es posible apreciar depósitos de fosfato de calcio sobre PCL puro [136].

Otro aspecto destacado observado en el presente estudio, es la validación del ensayo *in vitro* de desmineralización, realizado para replicar una lesión de caries y posterior bioactividad, lo que se confirmó observando el proceso del esmalte dental (**Figuras 15 y 16.b**), correspondientes al grupo no expuesto a BG y BGLi (grupo Control). El cambio desde una superficie lisa en los dientes originales hasta una superficie de esmalte porosa y rugosa, es similar a estudios anteriores, y confirma que existió desmineralización bacteriana [119]. Hay que destacar que, al aumentar el tiempo de inmersión del diente sin ningún tratamiento, se incrementa la porosidad y rugosidad (**Figura 15.c**), tendencia similar a lo observado en las superficies del esmalte acondicionadas con ácido fosfórico [120]. Estos resultados confirman que el uso de un modelo microbiológico es una forma eficaz y replicable de desarrollar lesiones de caries en el esmalte dental. En particular, el uso de *S. mutans* se validó como un método eficaz en el desarrollo de un modelo de desmineralización microbiológica [99].

En relación a los ensayos antibacterianos, las **Tablas 4 y 7** muestran que los biovidrios fueron capaces de matar las bacterias más relevantes asociadas a enfermedades dentales: caries y periodontitis. La liberación de iones de los biovidrios pudo cambiar el pH [63] (**Tabla 5**), que conduce al daño bacteriano a través del aumento de la presión osmótica local [137].

Waltimo y cols [124] confirmaron que el tamaño de las partículas de biovidrio a escala nanométrica aumentan la liberación de iones alcalinos, y por tanto aumentan el pH, siendo muy importante en la reducción del crecimiento bacteriano. Estos resultados muestran la relevancia del pH en el mecanismo antimicrobiano de biovidrios, asociados a las condiciones óptimas para cada bacteria. El pH extracelular determina parcialmente el pH intracelular o citoplasmático [138]. Por ejemplo, la cepa *S. mutans*, asociada con la caries, se considera una bacteria acidófila, un organismo que crece de manera óptima

dentro del rango de pH de 0,5 a 5 [138]. Por otro lado, las condiciones óptimas para el crecimiento de *P. gingivalis* son condiciones neutras o ligeramente alcalinas (valores de pH entre 7 y 8,3) [139]. En el caso de *A. actinomycetemcomitans*, se necesita un ambiente capnofílico, con valores de pH < 6 [140].

En las dos primeras bacterias, la presencia de los biovidrios logró cambiar el pH a valores que explican su desempeño antimicrobiano, en las concentraciones que generaron inhibición de su crecimiento. Sin embargo, en la bacteria *A. actinomycetemcomitans*, aunque BGLi presentó una concentración menor para inhibir el crecimiento bacteriano, comparado con BG, los valores de pH fueron muy similares para ambos biovidrios, mostrando que se deben considerar otros factores, además del pH, como la presencia de litio en el biovidrio. Dentro de estos factores, el efecto antibacteriano del Li es el más relevante, como se demostró con los resultados de la **Tabla 6**.

Lo anterior muestra que además del pH, los iones específicos de los biovidrios son también relevantes para el efecto antimicrobiano. A menor tamaño de los iones, existirá una mayor acción sobre los poros de las membranas bacterianas. El ion litio es un ion pequeño, que puede pasar fácilmente a través de las membranas biológicas, alcanzando sitios blancos [125]. En general, los cationes provenientes de los óxidos metálicos se van acumulando en la pared celular, generando un cambio en la permeabilidad asociada a la liberación sostenida de lipopolisacáridos, proteínas de la membrana y factores intracelulares; por otra parte, se interrumpe la replicación de ATP y ADN bacteriano, lo que finalmente genera su muerte [141- 143]. Además, cuando las bacterias tienen un exceso de metales o iones metálicos, se generará un desorden en sus funciones metabólicas, mediante la alteración por acción directa sobre ADN, al unirse y alterar la

naturaleza helicoidal de esta, y al aumentar la permeabilidad de la membrana externa [141- 143].

Desde el punto de vista del mecanismo antibacteriano, Lieb [144] propone que Li^+ es un antagonista de la prostaglandina E2 (PGE2), que se encarga de activar los microorganismos, y suprime la respuesta inmunitaria (humoral y celular). El litio, al ser un inhibidor de la PGE2 generaría, por tanto, un efecto antibacteriano de amplio espectro. Además, las proteínas de transporte de membrana reconocen cationes como Li^+ (gradientes mediados por protones) que compiten con Na^+ y otros cationes, lo que afecta la función regular de transporte en la membrana [145]. Li^+ estimula el transporte intracelular de prolina, un aminoácido asociado con la biopelícula bacteriana y a la adhesión a la superficie del diente, transporte que se produce en presencia de glucosa y succinato como fuentes de carbono. El ingreso intracelular del sistema Li^+ /prolina induce una disminución del potencial de membrana, por un flujo de protones y una salida de protones a la matriz extracelular, aumentando el pH extracelular y generando el efecto antibacteriano [145]. Por otra parte, el Li^+ se acopla con melibiosa, lo que genera el transporte intracelular de este complejo, y un aumento en la absorción de litio. Esto altera el acoplamiento de cationes, haciendo que la célula dependa de Li^+ y no de Na^+ u otros cationes [145]. Este último proceso también puede favorecer su entrada a la célula, en detrimento de la entrada de carbohidratos y otros aminoácidos [146]. El litio tiende a revertir la producción de polisacáridos extracelulares en *Streptococcus mutans* y *Actinomyces viscosus*, reduciendo por lo tanto su adhesión y crecimiento [145, 147]. Además, la compactación de la red generada por la incorporación de litio podría contribuir a una superficie menos porosa, lo que reduciría el área de contacto y disminuiría la adhesión bacteriana [137]. Todo lo anterior podría explicar el comportamiento antibacteriano del nitrato de litio en el ensayo complementario, realizado sobre cepas de

A. actinomycescomitans (**Tabla 6**), que disminuyó el crecimiento bacteriano de manera considerable, aunque sin lograr alcanzar los valores del control positivo, o del nitrato de plata. Sin embargo, otras sales de Ca y Na no presentaron ningún efecto antimicrobiano, confirmando que el Li⁺ es un agente con potencial antimicrobiano. Todas estas sales lograron disolverse en los ensayos.

En relación al óxido de grafeno, la acción antibacteriana de este material asociada a los aspectos físico químicos señalados en el estado del arte [8,13, 15,16,74] pueden explicar el efecto obtenido sobre cepas de *S. mutans*, en donde la concentración del material juega un papel importante en el efecto antibacteriano [91].

CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES.

4.1 CONCLUSIONES

Las partículas de BG y BGLi, producidas por el método sol-gel, permitieron la deposición de fosfato de calcio (en particular HA) sobre sus superficies, después de la inmersión en SBF o en saliva artificial, de una forma asimilable a la que ocurre durante de los procesos de biomineralización. Esta característica fue confirmada en un modelo de caries *in vitro*, implementado en esmalte dental. En particular, la presencia de ambos biovidrios indujo la precipitación de β -TCP y cristales de HA sobre la superficie del diente desmineralizado. Estas estructuras de fosfato de calcio, depositadas sobre la superficie del esmalte, fueron capaces de incrementar los valores de HV, logrando una recuperación parcial de la dureza inicial, debido a la acción de estas bio partículas. La bioactividad y la remineralización característica no fue afectada por la presencia de Li, con resultados diferentes a los obtenidos en otros estudios. En relación al efecto antibacteriano, BG y BGLi fueron capaces de inhibir el crecimiento de las bacterias asociadas a las enfermedades orales más prevalentes, desplegando un efecto antibacteriano similar contra cepas de *S. mutans* y *P. gingivalis*, asociadas a caries y periodontitis, respectivamente, efecto asociado a cambios en el pH. Sin embargo, BGLi presentó un mejor comportamiento antibacteriano sobre cepas de *A. actinomycetemcomitans*, bacteria asociada con periodontitis, posiblemente debido a la presencia de iones de Li. Nuestros hallazgos muestran que estos biovidrios pueden ser usados en el tratamiento de dos de las más prevalentes enfermedades orales: caries y periodontitis, promoviendo la remineralización de los dientes, y matando a los mencionados patógenos.

GO por otra parte, no demostró tener los efectos alcanzados por los biovidrios, al ser usado en una concentración no considerada citotóxica. Sin embargo, demostró un efecto

antibacteriano significativo sobre cepas de *S. mutans*, y además favoreció el depósito de estructuras de fosfato de calcio o sus derivados, en los ensayos de biomineralización hechos sobre materiales compuestos.

La combinación de GO y biovidrios no logró una sinergia, al evaluar los resultados en los ensayos desarrollados en el estudio, observándose mejores resultados al trabajar con estos materiales por separado.

CAPÍTULO V. BIBLIOGRAFÍA

5.1 BIBLIOGRAFÍA

1. Hench, L.L. 2013. An Introduction to Bioceramics, Second Edition. London, Imperial College Press. 600 p.
2. Rahaman M, Day D, Bal B, Fu Q, Jung S, Bonewald L, Tomsia A. 2011. Bioactive glass in tissue engineering. *Acta Biomater.* 7 (6): 2355–73.
3. Zhao M, Shan T, Wu Q, Gu L. 2020. The antibacterial effect of graphene oxide on *Streptococcus mutans*. *J Nanosci. Nanotechnol.* 20 (4): 2095-2013.
4. Zhan D, Ni Z, Chen W, Sun L, Luo Z, Lai L, Yu T, Wee A, Shen Z. 2011. Electronic structure of graphite oxide and thermally reduced graphite oxide. *Carbon.* 49: 1362–66.
5. Dong HS, Qi SJ. 2015. Realising the potential of graphene-based materials for bio surfaces – A future perspective. *Biosurface and Biotribology.* 1: 229–48.
6. Dreyer D, Park S, Bielawski W, Ruo R. 2010. The chemistry of graphene oxide. *Chemical Society Review.* 39: 228–40.
7. Li J, Zeng X, Ren T, van der Heide E. 2014. The preparation of graphene oxide and its derivatives and their application in bio-tribological systems. *Lubricants.* 2: 137–61.
8. Marković Z, Matijašević D, Pavlović V, Jovanović S, Holclajtner-Antunović I, Špitalský Z, Mičušik M, et al. 2017. Antibacterial potential of electrochemically exfoliated graphene sheets. *Journal of Colloid and Interface Science.* 500: 30–43.
9. Pinto A, Gonçalves I, Magalhães F. 2013. Graphene-based materials biocompatibility: a review. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 111: 188–202.
10. He L, Dumée L, Feng C, Velleman L, Reis R, She F, Gao W, Kong L. 2015. Promoted water transport across graphene oxide-poly (amide) thin film composite membranes and their antibacterial activity. *Desalination.* 365: 126–35.
11. He J, Zhu X, Qi Z, Wang C, Mao X, Zhu C, He Z, Li M, Tang Z. 2015. Killing dental pathogens using antibacterial graphene oxide. *ACS Applied Materials and Interfaces.* 7 (9): 5605–11.
12. Shih S, Li Y, Jang H, Khoshakhlagh P, Akbari M, Nasajpour A, Zhang Y, Tamayol A, Khademhosseini A. 2016. Graphene-based materials for tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 105: 255–74.
13. Shih S, Chen C, Lin Y, Lee J, Chung R. 2016. Investigation of bioactive and antibacterial effects of graphene oxide-doped bioactive glass. *Adv Powder Technol. The Society of Powder Technology Japan.* 27(3):1013–20.
14. Liu S, Zeng T, Hofmann M, Burcombe E, Wei J, Jiang R. 2011. Antibacterial activity of graphite, graphite, and reduced graphene oxide : membrane and oxidative stress. *ACS Nano.* 5(9):6971–80.
15. Ji H, Sun H, Qu X. 2016. Antibacterial applications of graphene-based nanomaterials: recent achievements and challenges. *Adv Drug Deliv.* 105(Part

- B):176–89.
16. Hegab H, ElMekawy A, Zou L, Mulcahy D. 2016. The controversial antibacterial activity of graphene-based materials. *Carbon*. 105: 362–76.
 17. Li M, Liu Q, Jia Z, Xu X, Cheng Y, Zheng Y, Xi T, Wei S. 2014. Graphene oxide/hydroxyapatite composite coatings fabricated by electrophoretic nanotechnology for biological applications. *Carbon*. 67: 185–97.
 18. Gurunathan S, Han J, Eppakayala V, Kim J. 2013. Microbial reduction of graphene oxide by *Escherichia coli*: a green chemistry approach. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 102: 772–77.
 19. Pinto A, Moreira S, Gonçalves I, Gama F, Mendes A, Magalhães F. 2013. Biocompatibility of poly (lactic acid) with incorporated graphene-based materials. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 104:229–38
 20. Feriencikova L, Xu S. 2012. Deposition and remobilization of graphene oxide within saturated sand packs. *J Hazard Mater*. 235–236:194–200.
 21. Feng L, Chen Y, Ren J, Qu X. 2011. A graphene functionalized electrochemical aptasensor for selective label-free detection of cancer cells. *Biomaterials*. 32: 2930–7.
 22. Singh V, Joung D, Zhai L, Das S, Khondaker S, Seal S. 2011. Graphene based materials: past, present and future. *Progress in Materials Science*. 56: 1178–1271.
 23. Akhavan O, Ghaderi E, Emamy H, Akhavan F. 2013. Genotoxicity of graphene nanoribbons in human mesenchymal stem cells. *Carbon*. 54: 419–31.
 24. Akhavan O, Ghaderi E, Akhavan A. 2012. Size-dependent genotoxicity of graphene nanoplatelets in human stem cells. *Biomaterials*. 33(32): 8017–25
 25. Ionita M, Pandele M, Iovu H. 2013. Sodium alginate/graphene oxide composite films with enhanced thermal and mechanical properties. *Carbohydr Polym*. 94(1): 339–44.
 26. Hench L.L, Best S.M. 2004. *Classes of Materials Used in Medicine*. En: Ratner B.D, Schoen J.F, Hoffman A.S and Lemon J.E. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. Third Edit. San Diego, Elsevier. pp 128–151.
 27. Baino F, Fiorilli S, Vitale- Brovarone C. 2016. Bioactive glass-based materials with hierarchical porosity for medical applications: review of recent advances. *Acta Biomaterialia*. 42: 18–32.
 28. Navarro-Baena I, Sessini V, Dominici F, Torre L, Kenny J, Peponi L. 2015. Design of biodegradable blends based on PLA and PCL: From morphological, thermal and mechanical studies to shape memory behavior. *Polym Degrad Stab*. 132.
 29. Hoppe A, Güldal N, Boccaccini A. 2011. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials*. 32 (11): 2757–74.
 30. Pintado-Palomino K, Peitl O, Dutra E, Tirapelli C. 2015. A clinical, randomized, controlled study on the use of desensitizing agents during tooth bleaching. *J Dent*. 43(9):1099–105.
 31. Jones J.R, Clare A.G (Editors). 2012. *Bio-Glasses: An introduction*. New York,

Wiley. 272 p.

32. Fernandes J, Gentile P, Pires R, Reis R, Hatton P. 2017. Multifunctional bioactive glass and glass-ceramic biomaterials with antibacterial properties for repair and regeneration of bone tissue. *Acta Biomaterialia*. 59: 2–11.
33. Eqtesadi S, Motealleh A, Pajares A, Guiberteau F, Miranda P. 2015. Influence of sintering temperature on the mechanical properties of ϵ -PCL-impregnated 45S5 bioglass-derived scaffolds fabricated by robocasting. *J Eur Ceram Soc*. 35:3985–93.
34. Stevels J. 1952. The Structure of Glass. *Phillips Tech Rev*. 3(10):293–300.
35. Chen Q, Li Y, Jin L, Quinn J, Komesaroff P. 2010. A new sol-gel process for producing Na₂O-containing bioactive glass ceramics. *Acta Biomater*. 6: 4143–53.
36. Chen Q, Roether J, Boccaccini A. 2008. Tissue engineering scaffolds from bioactive glass and composite materials. *Top Tissue Eng*. 4(6):1–27.
37. Lopes H; Mazali I; Landers R. 2013. Structural Investigation of the Surface of bioglass 45S5 enriched with calcium ions. *J Am Ceram Soc*. 96(5):1464–9.
38. Gabbai-Armelin P, Souza M, Kido H, Tim C, Bossini P, Fernandes K, et al. 2015. Characterization and biocompatibility of a fibrous glassy scaffold. *J Tissue Eng Regen Med*. 2 :408–17.
39. Owens G, Singh R, Foroutan F, Alqaysi M, Han C, Mahapatra C, Kim H, Knowles J. 2016. Sol-gel based materials for biomedical applications. *Progress in Materials Science*. 77: 1–79.
40. Gabbai-Armelin P, Alves D; Zanutto E, Peitl O, Leeuwenburgh, S, Jansen J, Renno A, van den Beucken J. 2014. Injectable composites based on Biosilicate® and alginate: handling and *in vitro* characterization. *RSC Adv. Royal Society of Chemistry*. 4:45778–85.
41. Gunawidjaja P, Mathew R, Lo A, Izquierdo-Barba I, García A, Arcos D, et al. 2012. Local structures of mesoporous bioactive glasses and their surface alterations *in vitro*: inferences from solid-state nuclear magnetic resonance. *Phil Trans R Soc A*. 370:1376–99.
42. Moghanian A, Firoozi S. 2018. A comparative study on the *in vitro* formation of hydroxyapatite, cytotoxicity and antibacterial activity of 58S bioactive glass substituted by Li and Sr. *Materials Science and Engineering C*. 91 (1): 349–60.
43. Faure J, Drevet R, Lemelle A, Ben Jaber N, Tara A, El Btaouri H, Benhayoune H. 2015. A new sol – gel synthesis of 45S5 bioactive glass using an organic acid as catalyst preparation of powder gel. *Materials Science and Engineering C*. 47: 407–12.
44. Kim G, Park Y, Lee S, El-Fiqi A, Kim J, Lee E, et al. 2014. Odontogenic stimulation of human dental pulp cells with bioactive nanocomposite fiber. *J Biomater Appl*. 29(6): 854–66.
45. Rath S, Brandl A, Hiller D, Hoppe A, Gbureck U, Horch R, Boccaccini A, Kneser U. 2014. Bioactive copper-doped glass scaffolds can stimulate endothelial cells in co-culture in combination with mesenchymal stem cells. *PLoS ONE*. 9(12): e1133319.

46. Stähli C, James-Bhasin M, Hoppe A, Boccaccini A, Nazhat S. 2015. Effect of ion release from Cu-doped 45S5 Bioglass on 3D endothelial cell morphogenesis. *Acta Biomater.* 19:15–22.
47. Wu C, Zhou Y, Xu M, Han P, Chen L, Chang J, et al. 2013. Biomaterials Copper-containing mesoporous bioactive glass scaffolds with multifunctional properties of angiogenesis capacity, osteostimulation and antibacterial activity. *Biomaterials.* 34(2):422–33.
48. Kuttappan S, Mathew D, Nair M. 2016. Biomimetic composite scaffolds containing bioceramics with collagen and gelatin for bone tissue engineering – A mini review. *Int J Biol Macromol.* Elsevier B.V. 93 (part B):1390–401.
49. Vyas V, Sampath K, Singh S, Pyare R. 2016. Effect of cobalt oxide substitution on mechanical behavior and elastic properties of bioactive glass and glass-ceramics. *Trans Indian Ceram Soc.* 75(1):12–9.
50. Wu C, Zhou Y, Fan W, Han P, Chang J, Yuen J, et al. 2012. Hypoxia-mimicking mesoporous bioactive glass scaffolds with controllable cobalt ion release for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 33(7):2076–85.
51. Wu C, Miron R, Sculean A, Kaskel S, Doert T, Schulze R, et al. 2011. Proliferation, differentiation and gene expression of osteoblasts in boron-containing associated with dexamethasone deliver from mesoporous bioactive glass scaffolds. *Biomaterials.* 32(29):7068–78.
52. Shruti S, Salinas A, Lusvardi G, Malavasi G, Menabue L, Vallet-Regil M. 2013. Mesoporous bioactive scaffolds prepared with cerium-, gallium- and zinc-containing glasses. *Acta Biomater.* 9(1):4836–44.
53. Palza H, Escobar B, Bejarano J, Bravo D, Diaz-Dosque M, Perez J. 2013. Designing antimicrobial bioactive glass materials with embedded metal ions synthesized by the sol–gel method. *Materials Science and Engineering C.* 33: 3795–3801.
54. Wu C, Fan W, Zhu Y, Gelinsky M, Chang J, Cuniberti G, et al. 2011. Multifunctional magnetic mesoporous bioactive glass scaffolds with a hierarchical pore structure. *Acta Biomater.* 7(10):3563–72.
55. Han P, Wu C, Chang J, Xiao J. 2012. The cementogenic differentiation of periodontal ligament cells via the activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway by Li^+ ions released from bioactive scaffolds. *Biomaterials.* 33: 6370–79.
56. Miguez-Pacheco V, Büttner T, Maçon A, Jones J, Fey T, De Ligny D, et al. 2016. Development and characterization of lithium-releasing silicate bioactive glasses and their scaffolds for bone repair. *J Non Cryst Solids.* 432:65–72.
57. Zhu Y, Zhang Y, Wu C, Fang Y, Yang J, Wang S. 2011. The effect of zirconium incorporation on the physiochemical and biological properties of mesoporous bioactive glasses scaffolds. *Microporous Mesoporous Mater.* 143(2–3):311–9.
58. Du J, Xiang Y. 2012. Effect of strontium substitution on the structure, ionic diffusion and dynamic properties of 45S5 bioactive glasses. *J Non Cryst Solids.* 358(8):1059–71.

59. Zhang J, Zhao S, Zhu Y, Huang Y, Zhu M, Tao C, Zhang C. 2014. Three-dimensional printing of strontium-containing mesoporous bioactive glass scaffolds for bone regeneration. *Acta Biomaterialia*. 10: 2269–81.
60. Tevlin R, McArdle A, Atashroo D, Walmsley G, Senarath-Yapa K, Zielins E, et al. 2014. Biomaterials for craniofacial bone engineering. *J Dent Res*. 93(12):1187–95.
61. Daguano J, Milesi M, Rodas A, Weber A, Sarkis J, Hortellani M, Zanotto E. 2019. *In vitro* biocompatibility of new bioactive lithia-silica glass-ceramics. *Materials Science and Engineering: C*. 94: 117–25.
62. Covarrubias C, Durán JP, Maureira M. 2018. Facile synthesis of lithium carbonate nanoparticles with potential properties for bone repair applications. *Material Letters* 219: 205–208.
63. Allan I, Newman H, Wilson M. 2001. Antibacterial activity of particulate Bioglass® against supra- and subgingival bacteria. *Biomaterials*. 22: 1683–1687.
64. Bach R.O, Gallicchio V.S. 1990. *Lithium and cell physiology*. New York, Springer. 181 p.
65. Birch N.J. 2012. *Lithium and the Cell: Pharmacology and Biochemistry*. London, Academic Press Limited. 351 p.
66. Bellantone M, Williams H, Hench L. 2002. Broad-spectrum bactericidal activity of Ag₂O-doped bioactive glass. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46 (6): 1940–45.
67. Shadjou N, Hasanzadeh M. 2016. Graphene and its nanostructure derivatives for use in bone tissue engineering: Recent advances. *J Biomed Mater Res A*. 104A (5):1250–75.
68. Wu C, Xia L, Han P, Xu M, Fang B. 2015. Graphene-oxide-modified β -tricalcium phosphate bioceramics stimulate *in vitro* and *in vivo* osteogenesis. *Carbon N Y*. 93:116–29.
69. Fabbri P, Valentini L, Hum J, Detsch R, Boccaccini A. 2013. 45S5 Bioglass® - derived scaffolds coated with organic – inorganic hybrids containing graphene. *Mater Sci Eng C*. 33(7):3592–600.
70. Taha A, Patel M, Hill R, Fleming P. 2017. The effect of bioactive glasses on enamel remineralization: a systematic review. *Journal of Dentistry*. 67: 9–17.
71. Fernando D, Attik N, Pradelle-Plasse N, Jackson P, Grosogeat B, Colon P. 2017. Bioactive glass for dentin remineralization: a systematic review. *Materials Science and Engineering C*. 76: 1369–77.
72. Jang J, Lee M, Ferracane J, Davis H, Bae H, Choi D, Kim D. 2018. Effect of bioactive glass-containing resin composite on dentin remineralization. *Journal of Dentistry*. 75: 58–64.
73. Valappil S, Coombes M, Wright L, Owens G, Lynch R, Hope C, Higham S. 2012. Role of gallium and silver from phosphate-based glasses on *in vitro* dual species oral biofilm models of *Porphyromona gingivalis* and *Streptococcus gordonii*. *Acta Biomaterialia*. 8: 1957–65.

74. Liao K, Lin Y, Macosko C, Haynes C. 2011. Cytotoxicity of graphene oxide and graphene in human erythrocytes and skin fibroblasts. *Applied Materials & Interfaces*. 3: 2607–15.
75. Wei M, Tian D, Liu S, Zheng X, Duan S, Zhou C. 2014. Cyclodextrin functionalized graphene material: a novel electrochemical sensor for simultaneous determination of 2-chlorophenol and 3-chlorophenol. *Sensors Actuators, B Chem*. 195: 452–8.
76. Gong C, Guo C, Jiang D, Tang Q, Liu C, Ma X. 2014. Graphene-cyclodextrin-cytochrome C layered assembly with improved electron transfer rate and high supramolecular recognition capability. *Mater Sci Eng C*. 39(1): 281–7.
77. Hummers W, Offeman R. 1958. Preparation of graphitic oxide. *J Am Chem Soc*. 80 (6): 1339.
78. Marcano D, Kosynkin D, Berlin J, Sinitskii A, Sun Z, Slesarev A, Alemany L, Lu W, Tour J. 2010. Improved synthesis of graphene oxide. *ACS NANO*. 4 (8): 4806–14.
79. Ming, L; Liu, Q; Jia, Z; Xu, X; Cheng, Y; Zheng, Y; Xi, T; Wei S. 2014. Graphene oxide / hydroxyapatite composite coatings fabricated by electrophoretic nanotechnology for biological applications. *Carbon N Y*. 67: 185–97.
80. Kaur G, Pickrell G, Kimsawatde G, Homa D, Allbee H, Sriranganathan N. 2014. Synthesis, cytotoxicity, and hydroxyapatite formation in 27-Tris-SBF for Sol-Gel Based CaO-P₂O₅-SiO₂-B₂O₃-ZnO bioactive glasses. *Sci Rep*. 4(4392): 1–14.
81. Cao K, Jiang Z, Zhao J, Zhao C, Gao C, Pan F, et al. 2014. Enhanced water permeation through sodium alginate membranes by incorporating graphene oxides. *J Memb Sci*. 469: 272–83.
82. Lopresti F, Maio A, Botta L, Scaffaro R. 2016. Preparation and mechanical characterization of polycaprolactone/graphene oxide biocomposite nanofibers. *AIP Conf Proc*. 1736: 1–5.
83. Li Y, Liu Y, Fu Y, Wei T, Le Guyader L, Gao G, et al. 2012. The triggering of apoptosis in macrophages by pristine graphene through the MAPK and TGF-beta signaling pathways. *Biomaterials*. 33(2): 402–11
84. Tegou E, Magana M, Katsogridaki A, Ioannidis A, Raptis V, Jordan S, et al. 2016. Terms of endearment: bacteria meet graphene nanosurfaces. *Biomaterials*. 89: 38–55.
85. Katsikogianni M, Missirlis Y. 2004. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur Cells Mater*. 8: 37–57.
86. Notley S.M, Crawford R.J, Ivanova E.P. 2013. Bacterial interaction with graphene particles and surfaces. En: Aliofkhazraei M. *Advances in graphene science*. Croatia, Intech Open. pp 99-118
87. Rodriguez-Lozano F, García- Bernal D, Aznar- Cervantes S, Ros- Roca M, Algueró M, Atucha N, Lozano- García A, Moraleda J, Cenis J. 2014. Effects of composite films of silk fibroin and graphene oxide on the proliferation, cell viability and mesenchymal phenotype of periodontal ligament stem cells. *J Mater Sci Mater Med*. 25: 2731–41.

88. Li Y, Du Q, Liu T, Sun J, Wang Y, Wu S, et al. 2013. Methylene blue adsorption on graphene oxide/calcium alginate composites. *Carbohydr Polym.* 95(1): 501–7.
89. Hu W, Peng C, Luo W, Lu M, Li X, Li D, et al. 2010. Graphene-based antibacterial paper. *ACS Nano.* 4(7): 4317–23.
90. Chang Y, Yang S, Liu J, Dong E, Wang Y, Cao A, et al. 2011. *In vitro* toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells. *Toxicol Lett.* 200(3): 201–10.
91. Song J, Gao H, Zhu G, Cao X, Shi X, Wang Y. 2015. The preparation and characterization of polycaprolactone/graphene oxide biocomposite nanofiber scaffolds and their application for directing cell behaviors. *Carbon N Y.* 95: 1039–50.
92. Bregnocchi A, Zanni E, Uccelletti D, Marra F, Cavallini D, De Angelis F, De Bellis G, Bossù M, Ierardo G, Polimeni A, Sarto M. 2017. Graphene-based dental adhesive with anti-biofilm activity. *J Nanobiotechnol.* 15:89.
93. Gholibegloo E, Karbasi A, Pourhajibagher M, Chiniforush N, Ramazani A, Akbari T, Bahador A, Khoobi M. 2018. Carnosine-graphene oxide conjugates decorated with hydroxyapatite as promising nanocarrier for ICG loading with enhanced antibacterial effects in photodynamic therapy against *Streptococcus mutans*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 181: 14–22.
94. Khawaja H, Zahir E, Asghar M, Asghar M. 2018. Graphene oxide, chitosan and silver nanocomposite as a highly effective antibacterial agent against pathogenic strains. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.* 555: 246–55.
95. Cruz-Silva R, Morelos-Gomez A, Kim H, Jang H, Tristan F, Vega-Diaz S, Rajukumar L, Elias A, Perea-López N, Suhr J, Endo M, Terrones M. 2014. Super-stretchable graphene oxide macroscopic fibers with outstanding knotability fabricated by dry film scrolling. *ASC NANO.* 8 (6): 5959–67.
96. Plewinski M, Schickle K, Lindner M, Kirsten A, Weber M, Fischer H. 2013. The effect of crystallization of bioactive bioglass 45S5 on apatite formation and degradation. *Dental Materials.* 29 (12): 1256–64.
97. Kokubo T, Takadama H. 2006. How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity? *Biomaterials.* 27 (15): 2907–15.
98. Rocton N, Oudadesse H, Lefeuvre B, Peisker H, Rbii K. 2020. Fine analysis of interaction mechanism of bioactive glass surface after soaking in SBF solution: AFM and ICP-OES investigations. *Applied Surface Science.* 505: 144076.
99. Zero D, van Houte J, Russo J. 1986. Enamel demineralization by acid produced from endogenous substrate in oral *Streptococci*. *Archives of Oral Biology.* 31 (4): 229–34.
100. Steiner-Oliveira C, Maciel F, Rodrigues L, Napimoga M, Pimenta L, Höfling J, Gonçalves R. 2007. An *in vitro* microbial model for producing caries-like lesions on enamel. *Brazilian Journal of Oral Sciences.* 6 (22): 1392–96.
101. Zhou S, Zhou J, Watanabe S, Watanabe K, Wen L, Xuan K. 2012. *In vitro* study of the effects of fluoride-releasing dental materials on remineralization in an enamel erosion model. *Journal of Dentistry.* 40: 255–263.
102. Yelten A, Yilmaz S. 2019. A novel approach on the synthesis and characterization

- of bioceramic composites. *Ceramics International*. 45 (12): 15375–84.
103. Chen L, Deng C, Li J, Yao Q, Chang J, Wang L, Wu C. 2019. 3D printing of a lithium-calcium-silicate crystal bioscaffold with dual bioactivities for osteochondral interface reconstruction. *Biomaterials*. 196: 138–50.
 104. Álvarez L, Rosas F, Márquez E, et al. 2014. Chemical and mineralogical modifications of simplified radioactive waste calcine during heat treatment. *Av en Quim*. 12(1):13-21
 105. Voicu G, Bădănoiu A, Andronescu E, Chifiruc C. 2013. Synthesis, characterization and bioevaluation of partially stabilized cements for medical applications. *Cent Eur J Chem*. 11(10):1657-1667.
 106. Rezabeigi E, Wood-Adams P, Drew R. 2014. Synthesis of 45S5 bioglass?? Via a straightforward organic, nitrate-free sol-gel process. *Materials Science and Engineering C*. 40: 248–52.
 107. Johra F, Lee J, Jung W. 2014. Facile and safe graphene preparation on solution-based platform. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 20: 2883–87.
 108. Hsieh C, Chen Y, Lee C, Chiang Y, Teng H. 2016. Thermal transport in stereo carbon framework using graphite nanospheres and graphene nanospheres. *Carbon*. 106: 132–41.
 109. Ye X, Qin X, Yan X, Guo J, Huang L, Chen D, Wu T, Shi Q, Tan S, Cai X. 2016. π - π conjugations improve the long-term antibacterial properties of graphene oxide/quaternary ammonium salt nanocomposites. *Chemical Engineering Journal*. 304: 873–81.
 110. Kumar S, Azam D, Raj S, Kolanthai E, Vasu K, Sood A, Chatterjee K. 2016. 3D scaffold alters cellular response to graphene in a polymer composite for orthopedic applications. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*. 104 (B): 732–49.
 111. Saabari A, Rabiee M, Moztafzadeh F, Sheikhi M, Tahriri M, Karimi M. 2009. Synthesis, characterization and *in vitro* bioactivity of sol-gel derived SiO₂-CaO-P₂O₅-MgO bioglass. *Materials Science and Engineering: C*. 29(1): 335-340.
 112. Celaletdin E, Evis Z, Webster T, Sahin F. 2011. Synthesis and microstructural characterization of nano-size calcium phosphates with different stoichiometry. *Ceramics International*. 37 (3): 971–77.
 113. Zhang H, Zhang M. 2011. Characterization and thermal behavior of calcium deficient hydroxyapatite whiskers with various Ca/P ratios. *Materials Chemistry and Physics*. 126 (3): 642–48.
 114. Kannan S, Rocha J, Ventura J, Lemos A, Ferreira J. 2005. Effect of Ca/P ratio of precursors on the formation of different calcium apatitic ceramics- An X-ray diffraction study. *Scripta Materialia*. 53 (11): 1259–62.
 115. Lee I, Whang C, Kim H, Park J, Song J, Kim S. 2002. Various Ca/P ratios of thin calcium phosphate films. *Materials Science and Engineering C*. 22 (1): 15–20.
 116. Zyman Z, Epple M, Goncharenko A, Rokhmistrov D, Prymak O, Loza K. 2016. Thermally induced crystallization and phase evolution in powders derived from

- amorphous calcium phosphate precipitates with a Ca/P ratio of 1:1. *Journal of Crystal Growth*. 450: 190–96.
117. Abdelrazek E, Hezma A, El-khodary A, Elzayat A. 2016. Spectroscopic studies and thermal properties of PCL/PMMA biopolymer blend. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*. 3 (1): 10–15.
 118. Ravi M, Song S, Wang J, Nadimicherla R, Zhang Z. 2016. Preparation and characterization of biodegradable poly (ϵ -caprolactone)-based gel polymer electrolyte films. *Ionics*. 22 (5): 661–70.
 119. Bakry AS, Takahashi H, Otsuki M, Tagami J. 2014. Evaluation of new treatment for incipient enamel demineralization using 45S5 Bioglass. *Dental Materials*. 30 (3): 314–20.
 120. Yao C, Ahmed M, Yoshihara K, Mercelis B, Gré C, Van Landuyt K, Huang C, Van Meerbeek B. 2019. Bonding to enamel using alternative enamel conditioner/etchants. *Dental Materials*. 35(10): 1415–29.
 121. Lei L, Zheng I, Xiao H, Zheng J, Zhou Z. 2020. Wear mechanism of human tooth enamel: The role of interfacial protein bonding between HA crystals. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 110: 103845.
 122. Ibrahim N, Mohamad H, Noor S, Ahmad N. 2017. Apatite formation on melt-derived bioactive glass powder based on $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$ system. *Ceramics International*. 43: 11676–85.
 123. Moghanian A, Firoozi S, Tahriri M. 2017. Synthesis and *in vitro* studies of sol-gel derived lithium substituted 58S bioactive glass. *Ceramics International*. 43 (15): 12835–43.
 124. Waltimo T, Brunner T, Vollenweider M, Stark W, Zehnder M. 2007. Antimicrobial effect of nanometric bioactive glass 45S5. *Journal of Dental Research*. 86 (8): 754–57.
 125. Popescu A, Florian P, Stan G, Popescu-Pelin G, Zgura I, Enculescu M, Oktar F, Trusca R, Sima L, Roseanu A, Duta L. 2018. Physical-chemical characterization and biological assessment of simple and lithium-doped biological-derived hydroxyapatite thin films for a new generation of metallic implants. *Applied Surface Science*. 439: 724–735
 126. Kim H, Himeno T, Kawashita M, Kobubo T, Nakamura T. 2004. The mechanism of biomineralization of bone like apatite on synthetic hydroxyapatite: an *in vitro* assessment. *J. R. Soc. Interface*. 1: 17-22.
 127. Humphrey S, Williamson R. 2001. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent*. 85:162-9.
 128. Kim T, Olek J. 2016. The effects of lithium ions on chemical sequence of alkali-silica reaction. *Cement and Concrete Research*. 79: 159-168.
 129. Khorami M, Hesarak S, Behnamghader A, Nazarian H, Shahrabi S. 2011. *In vitro* bioactivity and biocompatibility of lithium substituted 45S5 bioglass. *Materials Science and Engineering: C*. 31: 1584-1592.
 130. Arcos D, Greenspan D, Vallet-Regí M. 2003. A new quantitative method to

- evaluate *in vitro* bioactivity of melt and sol- gel derived silicate glasses. J Biomed Mater Res. 65(A): 344-351.
131. Bakry A, Takahashi H, Otsuki M, Tagami J. 2014. Evaluation of new treatment for incipient enamel demineralization using 45S5 Bioglass. Dental Materials. 30 (3): 314-20.
 132. Milly H, Festy F, Watson T, Thompson I, Banerjee A. 2014. Enamel white spots lesions can remineralize using bioactive glass and polyacrylic acid modified bio active glass powders. Journal of Dentistry. 42: 1458-1463.
 133. Ulery B, Nair L, and Laurecin C. 2011. Biomedical applications of biodegradable polymers. J Polym Sci B Polym Phys. 49 (12):832–64.
 134. Chouzouri G and Xanthos M. 2007. *In vitro* bioactivity and degradation of polycaprolactone composites containing silicate fillers. Acta Biomaterialia 3:745–756.
 135. Seregin V, Coffey J. 2006. Biomineralization of calcium disilicide in porous polycaprolactone scaffolds. Biomaterials 27: 4745–4754
 136. Wan C and Chen B. 2011. Poly (ϵ -caprolactone)/graphene oxide biocomposites: mechanical properties and bioactivity. Biomed. Mater. 6: 055010 (8pp).
 137. Siqueira R, Silva P, da Silva T, Assirati L, Nicodemos S, Peitl O, Gomes C, Zanotto E. 2019. Cation-doped bioactive ceramics: *in vitro* bioactivity and effect against bacteria of the oral cavity. Ceramics International. 45 (7): 9231–44.
 138. Slonczewski J, Fujisawa M, Dopson M, Krulwich T. 2009. Cytoplasmic pH measurement and homeostasis in bacteria and archaea. Advances in Microbial Physiology. Vol. 55.
 139. Takahashi N, Schachtele CF. 1990. Effect of pH on the growth and proteolytic activity of *Porphyromona gingivalis* and *Bacteroides intermedius*. Journal of Dental Research. 69 (6): 1266–69.
 140. Bhattacharjee M, Childs C, Ali E. 2011. Sensitivity of the periodontal pathogen *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* at mildly acidic pH. Journal of Periodontology. 82 (6): 917–25.
 141. Lemire J, Harrison J, Turner R. 2013. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. Nature Reviews Microbiology. DOI: 10.1038/nrmicro3028.
 142. Hemeg H. 2017. Nanomaterials for alternative antibacterial therapy. International Journal of Nanomedicine. 12: 8211-8225.
 143. Stankic S, Suman S, Haque F, Vidic J. 2016. Pure and multi metal oxide nanoparticles: synthesis, antibacterial and cytotoxic properties. J Nanobiotechnol. 14:73. DOI 10.1186/s 12951-016-0225-6.
 144. Lieb J. 2004. The immunostimulating and antimicrobial properties of lithium and antidepressants. Journal of Infection. 49: 88–93.
 145. Birch N.J (editor). 1991. Lithium and the Cell: Pharmacology and Biochemistry. London, Academic Press Limited. 351 pp.
 146. Marmol F. 2008. Lithium: bipolar disorder and neurodegenerative diseases

possible cellular mechanisms of the therapeutic effects of lithium. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 32 (8): 1761–71.

147. Treasure P. 1981. Effects of fluoride, lithium and strontium on extracellular polysaccharide production by *Streptococcus mutans* and *Actinomyces viscosus*. *J Dent Res*. 60 (C): 1601-1610.