



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

**SÍNTESIS DE BIOVIDRIOS POR LA TÉCNICA SOL-GEL CON  
INCORPORACIÓN DE METALES Y ESTUDIO DE SUS PROPIEDADES  
ANTIBACTERIALES**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL QUÍMICO E INGENIERO CIVIL EN  
BIOTECNOLOGÍA

**JAVIER ALONSO PEREZ GONZALEZ**

**PROFESOR GUÍA:**  
HUMBERTO PALZA CORDERO

**MIEMBROS DE LA COMISIÓN:**  
MARIO DIAZ DOSQUE  
BARBARA ANDREWS FARROW

SANTIAGO DE CHILE  
JUNIO 2012

DEDICADA A:  
Mi familia,  
que me ha permitido  
llegar a ser lo que soy.

RESUMEN DE LA MEMORIA  
PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
INGENIERO CIVIL QUÍMICO E  
INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA  
POR: JAVIER PÉREZ GONZÁLEZ  
FECHA: 15/06/12  
PROF. GUÍA: DR. HUMBERTO PALZA

SÍNTESIS DE BIOVIDRIOS POR LA TÉCNICA SOL-GEL CON INCORPORACIÓN DE  
METALES Y ESTUDIO DE SUS PROPIEDADES ANTIBACTERIALES

Los vidrios biocompatibles han sido ampliamente utilizados en el área clínica en variados usos. El uso del método sol-gel, permitió una mayor versatilidad en la síntesis de éstos, otorgó una mayor área superficial y permitió incorporar modificadores que entreguen propiedades adicionales, con por ejemplo, propiedades antibacteriales.

Se sintetizaron biomateriales con la técnica sol gel libre de metales,  $\text{SiO}_2 - \text{CaO} - \text{P}_2\text{O}_5$  (BG) e incorporando plata,  $\text{SiO}_2 - \text{CaO} - \text{P}_2\text{O}_5 - \text{Ag}_2\text{O}$  (AgBG) y cobre,  $\text{SiO}_2 - \text{CaO} - \text{P}_2\text{O}_5 - \text{CuO}$  (CuBG). Además se controló el grado de incorporación de los metales, creando materiales con un 10% y 5% molar de metales: AgBG(2) y AgBG(1), respectivamente para plata, y CuBG(2) y CuBG(1), respectivamente para cobre. Los materiales sintetizados presentaron las proporciones elementales deseadas, son principalmente amorfos y poseen una alta área superficial, de alrededor de  $260 \text{ [m}^2\text{/g]}$ .

El material demostró ser biocompatible *in-vitro*, ya que luego de ser sumergido en SBF (*Simulated Body Fluid*) presentó un desarrollo de una capa de hidroxiapatita en su superficie, lo que, según con lo reportado en la literatura, se correlaciona directamente con la biocompatibilidad.

La incorporación de metales en la síntesis, otorgó a los biovidrios una capacidad bactericida contra la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  y una cepa clínica de *S. mutans*, que no se presenta en la ausencia de éstos (BG). Ésta capacidad, medida mediante la concentración mínima bactericida (CMB), no presentó diferencia entre el grado de incorporación de los respectivos metales y es mayor en el caso de los AgBG, con una CMB para *E. coli*:  $\sim 3 \text{ [mg/mL]}$  en 24 h y  $\sim 0,4 \text{ [mg/mL]}$  en 48 h y para *S. mutans*:  $\sim 1,3 \text{ [mg/mL]}$  en 48 h, con respecto a los CuBG, con una CMB para *E. coli*:  $\sim 125 \text{ [mg/mL]}$  en 24 h y  $\sim 7,5 \text{ [mg/mL]}$  en 48 h y para *S. mutans*:  $\sim 7,5 \text{ [mg/mL]}$  en 48 h. Este

resultado depende de la bacteria y del tiempo de exposición del material a la misma, donde esta diferencia tiende a disminuir con un mayor tiempo de exposición,

Si bien, la plata presentó mejores propiedades antibacteriales que el cobre, este último presentó una tendencia a alcanzar los niveles bactericidas de la plata, además hay que considerar el hecho que el cobre es aproximadamente diez veces más barato y menos tóxico para los seres humanos que la plata.

## AGRADECIMIENTOS

El término de la memoria es un hito que señala el término del proceso educativo, una etapa que ha dominado gran parte de mi vida. En su recorrido he conocido a grandes personas que me han ayudado a llevarla a buen término y se los agradezco.

Primero agradezco a mi familia, a mis padres, Juan Eduardo y Mónica, quienes no sólo me matricularon en las instituciones de educación respectivas, sino que desde antes y durante el proceso me enseñaron todo lo referente a la vida más allá del colegio y me apoyaron en todo cuanto pudieron, sin dudar jamás de mí. También agradezco a mi hermano Eduardo, por siempre mostrarme una visión diferente de las cosas. A mi tía Carmen y mi primo Felipe quienes colaboraron activamente en mi crianza. Gracias familia por permitirme llegar a ser lo que soy.

También he de agradecer a mis amigos de toda la vida, aquellos que conozco hace tanto tiempo que nuestras historias en conjunto es la historia de nuestras vidas: Carlos Jiménez, Edgardo Lineros, Pablo López, Eric Sierra y Windy Pineda. A aquellos que me han acompañado durante mi estadía universitaria Camilo López, Cesar Nuñez, Alexis Acuña, María Jesús Rubio, Agustín Panes, Cristian Solís, Sebastián Fuente Alba, Nathaly Romero, Felipe Urbina, Gabriela Lazo y Daniela Arancibia. A mis compañeros de departamento Leonardo Stari, María Teresa Buldrini y especialmente a Natalia Jiménez, quien siempre me levanta el ánimo y me ha ayudado desde primer año. Gracias a todos por acompañarme en todas y ayudar a despejar mi mente cuando lo necesité.

Debo agradecer también a Almendra Báez, Cesar Campos, Ivo Balic, Renzo Fuenzalida, Manuel Reyes, Esmeralda Zenteno y aquellos miembros del CRI y de las actividades extracurriculares que constantemente me recordaban que la universidad no es sólo para estudiar.

Gracias también a la gente que conocí en el desarrollo de la memoria, que me ayudaron técnicamente o con ideas a que ésta se llevara a cabo: Matías Álvarez, Julián Bejarano, Juan Benavides, Kathy, Emma Fonseca, Christian Nieva, mi profesor guía Dr. Humberto Palza, mi co-guía Dr. Mario Díaz y Dr. Cristian Covarrubias, quien a pesar de no ser mi profesor, siempre me ayudó en cuanto podía.

Muchas gracias a todos los que me apoyaron y aún siguen haciéndolo.

## INDICE DE CONTENIDOS

1. Introducción.....	<b>1</b>
1.1 Antecedentes generales.....	1
1.1.01 Biomateriales: trasfondo histórico .....	1
1.1.02 Interfaz entre el biomaterial y el tejido .....	2
1.1.03 Materiales bioactivos.....	3
1.1.04 La estructura de los huesos y dientes .....	4
1.1.05 Biocerámicos .....	6
1.1.06 Vidrios bioactivos .....	8
1.1.07 Modificadores.....	9
1.1.08 Técnicas de síntesis de biovidrios .....	10
1.1.09 Bioactividad In-vitro .....	13
1.1.10 La plata.....	14
1.1.11 El cobre .....	15
1.1.12 Infecciones en biomateriales .....	17
1.2. Descripción del proyecto y motivación .....	19
1.3. Objetivos.....	20
1.3.1. Objetivo general .....	20
1.3.2. Objetivos específicos.....	20
1.4. Alcances.....	21
2. Metodología.....	<b>22</b>
2.1 Síntesis de biovidrios .....	22
2.2 Concentración mínima bactericida .....	24
2.2.1 Escherichia coli .....	24
2.2.2 Streptococcus mutans.....	25
2.3 Preparación de SBF y ensayo de biocompatibilidad .....	27
2.4 Ensayo de lixiviación.....	31
2.5 Mediciones externas .....	32
3. Resultados y discusión .....	<b>33</b>
3.1 Caracterización de los materiales sintetizados.....	33
3.1.1 ICP.....	33

3.1.2 Difracción de rayos x (DRX) .....	34
3.1.3 Granulometría.....	36
3.1.4 Área específica (BET).....	37
3.2 Ensayo de lixiviación.....	38
3.2.1. Lixiviación en agua desionizada .....	38
3.2.2. Lixiviación en SBF .....	39
3.3 Ensayo de biocompatibilidad.....	42
3.4 Concentración mínima bactericida .....	44
3.4.1 Escherichia coli .....	44
3.4.2 Streptococcus mutans.....	44
4. Conclusiones.....	<b>47</b>
5. Bibliografía.....	<b>48</b>
6. Anexos .....	<b>52</b>
6.1. Determinación de Fosfatos .....	52

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1	
Estructura de los huesos.....	4
Figura 2	
Estructura de los dientes .....	6
Figura 3	
Usos clínicos de los biocerámicos .....	7
Figura 4	
Principales reacciones de la técnica Sol-Gel .....	12
Figura 5	
Mecanismos de toxicidad del cobre en microorganismos .....	16

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1	
Concentración (mM) y pH de SBF y plasma humano .....	13
Tabla 2	
Composición molar de los materiales a sintetizar .....	22
Tabla 3	
Reactivos para la preparación de SBF .....	27
Tabla 4	
Porcentajes en peso de Si, Ca, P, Cu y Ag medidos por ICP, de los biomateriales sintetizados .....	33
Tabla 5	
Porcentajes en peso de Si, Ca, P, Cu y Ag calculados para los biomateriales sintetizados .....	33
Tabla 6	
Máximos diámetros de partículas para el 10, 50 y 90% de volumen acumulado de los biomateriales molidos .....	37
Tabla 7	
Concentración mínima bactericida para <i>E. coli</i> de los distintos materiales.....	44
Tabla 8	
Concentración mínima bactericida para <i>S. mutans</i> de los distintos materiales .....	44

## INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1	
Difracción de rayos x de los biomateriales .....	35
Gráfico 2	
Distribución de tamaño de partícula de los biomateriales molidos: AgBG(1), AgBG(2), CuBG(1), CuBG(2) y BG.....	36
Gráfico 3	
Lixiviación de Ag en agua desionizada, para AgBG(1) y AgBG(2) .....	38
Gráfico 4	
Lixiviación de Cu en agua desionizada, para CuBG(1) y CuBG(2).....	38
Gráfico 5	
Lixiviación de Ag en SBF, para AgBG(1) y AgBG(2) .....	39
Gráfico 6	
Lixiviación de Cu en SBF, para CuBG(1) y CuBG(2).....	39
Gráfico 7	
Lixiviación de P en SBF, para BG, AgBG(1) y CuBG(1).....	40
Gráfico 8	
Concentración de Ag y Cu en contacto con BG en el tiempo .....	41
Gráfico 9	
Difracción de rayos x de los biomateriales sumergidos en SBF.....	43

# 1. Introducción

## 1.1. Antecedentes generales

### 1.1.01. Biomateriales: trasfondo histórico

Un biomaterial es un material sintético ideado para un contacto íntimo con un tejido viviente. Una definición más precisa de un biomaterial fue dada en 1992, en la segunda conferencia de consensos de la sociedad europea de biomateriales, donde un biomaterial fue definido como “un material ideado para interactuar con los sistemas biológicos, para evaluar, tratar, aumentar o sustituir cualquier tejido, órgano o función del cuerpo” [1].

El uso de materiales sintéticos para reemplazar partes del cuerpo humano data desde miles de años atrás. En Egipto se han encontrado algunas momias con prótesis dentales de oro. Por otro lado, en la era pre-cristiana los “biomateriales” más comúnmente fueron cobre y bronce, los cuales, crearon algunos problemas debido a su toxicidad. Pese a ello, hasta el siglo 19, estos materiales aún seguían siendo los más frecuentemente usados para implantes. La introducción de condiciones asépticas en cirugía en 1860 promovió la investigación de biomateriales aplicados a la medicina. En 1880 se crearon las prótesis de marfil y en 1902 se usaron cápsulas de oro para hacer la articulación de cabeza de prótesis femorales. Desde ese momento, los investigadores comenzaron a buscar materiales estables e inertes con el objetivo de crear dispositivos que pudiesen ponerse en contacto con tejidos humanos. Posteriormente se utilizaron con éxito en aplicaciones ortopédicas prótesis metálicas hechas por aleaciones estables como Vitallium® (60% cobalto, 20% cromo, 5% molibdeno y trazas de otros elementos) y siguen utilizándose en la actualidad [2,3].

La llegada de materiales poliméricos abrió nuevas posibilidades en la ciencia de los biomateriales. En los años 30, se comenzó a utilizar en odontología el polimetilmetacrilato (PMMA). Por otra parte, el PMMA, ha sido usado como cemento para anclar prótesis metálicas a hueso y hacer implantes ortopédicos permanentes. Las prótesis metálicas cementadas fueron especialmente usadas como remplazo de cadera o rodilla. Otra posibilidad que fue explorada en los años 70 fue el uso de materiales cerámicos inertes como alumina y zirconia. Sin embargo, estas prótesis no duraron mucho tiempo, debido a que la sujeción entre

el dispositivo protésico y el tejido huésped era sólo mecánica y tendía a debilitarse después de unos pocos años de implantación.

En las últimas décadas, la edad promedio de la población ha aumentado, y la demanda por nuevos tipos de biomateriales que puedan durar mucho tiempo una vez implantados se ha vuelto más y más urgente [2,4].

El principal problema a enfrentar ha sido el fracaso en lograr una unión apropiada en la interfaz entre el biomaterial y el tejido huésped, ya que es en esta región donde el material está más expuesto a tensiones, ocurriendo incluso en implantes cementados movimiento entre el dispositivo implantado y el tejido. Por otro lado, es en la interfaz entre el material sintético y el tejido vivo, donde la compatibilidad bioquímica es puesta a prueba.

### **1.1.02. Interfaz entre el biomaterial y el tejido.**

Por muchos años se pensó que interacciones entre los implantes y el cuerpo podría sólo causar reacciones indeseables, como irritación de tejidos, daño y finalmente muerte. Por este motivo, el principio central usado en el desarrollo de biomateriales en un comienzo fue que éstos debían ser tan químicamente inertes como fuera posible [5]. Sin embargo, incluso el material más inerte provoca una reacción en el cuerpo una vez implantado [6,7]. Una delgada cápsula fibrosa no adherente se desarrolla en los materiales bioinertes luego de permanecer un tiempo en contacto con el medioambiente del cuerpo. Ésta previene posibles interacciones con los tejidos, impidiendo una eventual unión química o el crecimiento celular en el material. Pese a esto, ya sea por desgaste mecánico o por degradación química, eventualmente ocurre un deterioro del material, y se hace necesario remover quirúrgicamente el dispositivo. Por esta razón, la investigación en biomateriales cambió hacia el desarrollo de biomateriales que pudieran interactuar con el cuerpo, induciendo una respuesta deseable en el tejido huésped [2].

Se puede lograr una fijación biológica con materiales porosos, donde se obtiene sólo una unión mecánica y no química, debido al crecimiento de hueso entre los poros del biomaterial, si éstos tienen un diámetro mayor a 100 [µm] [8]. Al aumentar del área interfacial entre el implante y el tejido, aumenta la resistencia al movimiento entre el dispositivo y el tejido, mejorando su unión, ya que ésta es más fuerte en la interfaz. A pesar de todo, los materiales porosos no duran mucho tiempo una vez implantados, dado que su resistencia mecánica no es

tan alta como los materiales densos y están propensos a una mayor corrosión debido a una amplia área superficial expuesta a los fluidos corporales, lo que disminuye su fuerza [2].

Por otro lado, los biocerámicos reabsorbibles son materiales ideados para explotar y aumentar la capacidad del cuerpo de autoreparación. Éstos se degradan gradualmente en un período de tiempo y son reemplazados por el tejido huésped natural, siendo importante que los productos de la reabsorción sean biocompatibles y que ésta ocurra a una tasa similar al metabolismo celular. Dado que es difícil cumplir éstos requerimientos, no muchos materiales reabsorbibles son aplicados clínicamente.

Una posible solución al problema de lograr una interfaz estable entre el implante y el tejido es la fijación bioactiva, que puede ser obtenida utilizando materiales bioactivos.

### **1.1.03. Materiales bioactivos**

“Un material bioactivo es aquel que produce una respuesta biológica específica en la interfaz del material, que resulta en la formación de un enlace entre los tejidos y el material” [9]. Hench y su grupo descubrieron que ciertas composiciones de vidrios no porosos basados en  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CaO}$ ,  $\text{Na}_2\text{O}$ ,  $\text{P}_2\text{O}_5$  son capaces de formar un enlace estable con el hueso una vez implantados. Cuando estos vidrios se ponen en contacto con fluidos biológicos, una capa de hidroxiapatita (HA) análoga a la fase mineral de los huesos se deposita en su superficie. Moléculas de colágeno se incorporan en esta capa y se puede formar una unión biológica. Posteriormente Wilson y Nolletti mostraron que también se puede lograr una unión con tejido blando, si la velocidad de formación de apatita es suficientemente alta [10].

La tasa de unión de los vidrios bioactivos depende de varios factores. Uno de ellos es la composición: las tasas más rápidas de unión para vidrios bioactivos compuestos de  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CaO}$ ,  $\text{Na}_2\text{O}$  y  $\text{P}_2\text{O}_5$  se obtienen con contenidos de  $\text{SiO}_2$  entre 45 y 52% en peso. En este rango de composiciones una unión a tejido blando y duro ocurre entre 5 y 10 días. Aquellos con una composición entre 55 y 60% de  $\text{SiO}_2$  requieren un período de tiempo mayor para formar una unión con huesos y no forman unión con tejidos blandos. Y aquellos con más de 60% de  $\text{SiO}_2$  no forman unión con tejidos duros ni blandos y promueven la formación de una cápsula interfacial fibrosa no adherente. [11].

#### 1.1.04. La estructura de los huesos y dientes

Es difícil conseguir una compatibilidad entre las propiedades elásticas del material con las propiedades del hueso, debido a que la estructura del hueso es compleja [12]. La matriz del hueso está hecha de una parte inorgánica (micro cristales de fosfato de calcio, similar a hidroxiapatita) y una parte orgánica (moléculas de colágeno). La parte más interna del hueso contiene la médula, el hueso compacto rodea la médula y cerca del extremo del hueso se encuentra el hueso esponjoso (Figura 1).

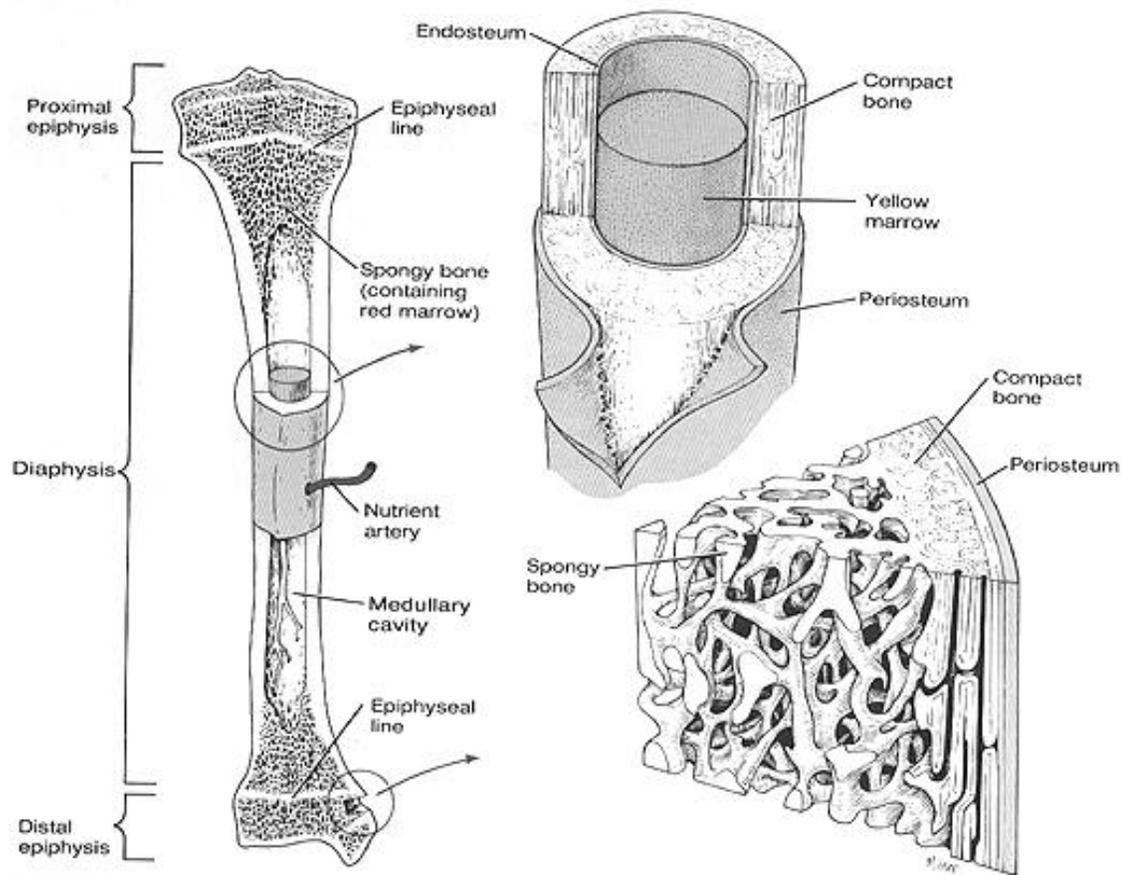


Figura 1. La estructura de los huesos [13].

Los materiales usados para prótesis ortopédicas tienen que soportar cargas cíclicas, más precisamente, esfuerzos de corte cíclicos en la interfaz con el hueso. En los ligamentos cruzados, usualmente se desarrollan millones de ciclos por año por el hecho de caminar y la carga puede variar entre 70 y 700 N, entre subidas de escaleras y sacudidas [14].

El hueso es un material viviente, que está regenerándose continuamente. Aproximadamente un 10% de la masa ósea es renovada cada año, en respuesta a las tensiones aplicadas sobre el hueso en si.

El módulo de elasticidad del hueso compacto varía entre 0,5 y 17,7 GPa [14], mientras que el módulo de elasticidad de los cerámicos inertes o los metales usados para implantes ortopédicos varía entre 116 (aleación de titanio) y 380 (Alúmina). Esta diferencia puede causar problemas a los huesos, dado que el hueso tiene que resistir una carga menor con respecto a las condiciones normales de funcionalidad. Este problema, llamado *stress-shielding*, detiene la remodelación del hueso [15, 16]. El proceso de regeneración no ocurre, por lo que el hueso se debilita y fragmenta en la interfaz. Otros materiales menos rígidos, como polímeros, tendrían una mejor compatibilidad con el módulo de elasticidad del hueso [17].

Hench propuso una clasificación de bioactividad específica para biomateriales a ser utilizados en implantes ortopédicos. Los materiales pertenecientes a la “clase A” presentan osteoproducción, lo que significa que su superficie es colonizada por células osteogénicas cuando es puesto en contacto con tejido vivo. Por otro lado, los materiales pertenecientes a la “clase B” presentan sólo osteoconducción, es decir, el material funciona sólo como un sustrato al cual las células migran.

Los materiales bioactivos de la clase A liberan Silicio (Si) cuando están inmersos en fluidos corporales. Experimentos han mostrado que el Si tiene un rol metabólico específico, relacionado al crecimiento óseo [18, 19]. Esto desencadena una respuesta intracelular debido al abundante Si liberado. Los efectos extracelulares están principalmente relacionados a la posibilidad de adsorber proteínas de crecimiento de hueso en la superficie del implante. Estos factores pueden ser adsorbidos debido a la alta área superficial de una capa rica en SiO<sub>2</sub>.

La estructura dental es similar a los huesos, ya que también los dientes son materiales bioinorgánicos. Un diente está compuesto por una parte expuesta (corona) y una parte que está oculta en la encía y mandíbula (raíz). La parte externa de la corona está cubierta con el “esmalte”, el cual está principalmente hecho de un tipo de hidroxiapatita similar a la encontrada en los huesos. Bajo el esmalte, está presente una capa más suave “dentina”, aún similar al hueso. La dentina rodea una cavidad llena con “pulpa”, la cual contiene vasos

sanguíneos y nervios que entran al diente a través del canal de raíz. El “cemento” (de un material similar al hueso) cubre la raíz (Figura 2).

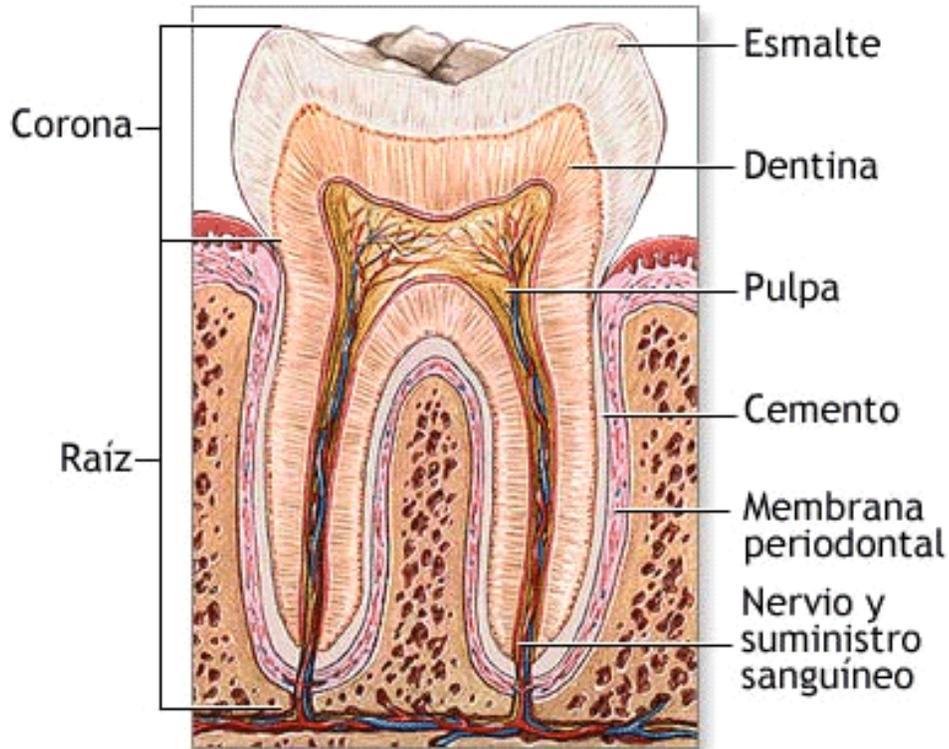


Figura 2. Estructura de los dientes [20].

#### 1.1.05. Biocerámicos

Una clase muy importante de biomateriales usada para reparaciones óseas y dentales son los materiales cerámicos. Cerámicos, vidrios y vidrio-cerámicos usados para este propósito son llamados biocerámicos. Los cerámicos han sido ampliamente usados en odontología, como por ejemplo, oro o porcelana han sido usados para sustituir coronas y cementos vítreos han sido usados como rellenos. [21]. Los biocerámicos son usados para variadas aplicaciones dentro del cuerpo humano (Figura 3) [22].

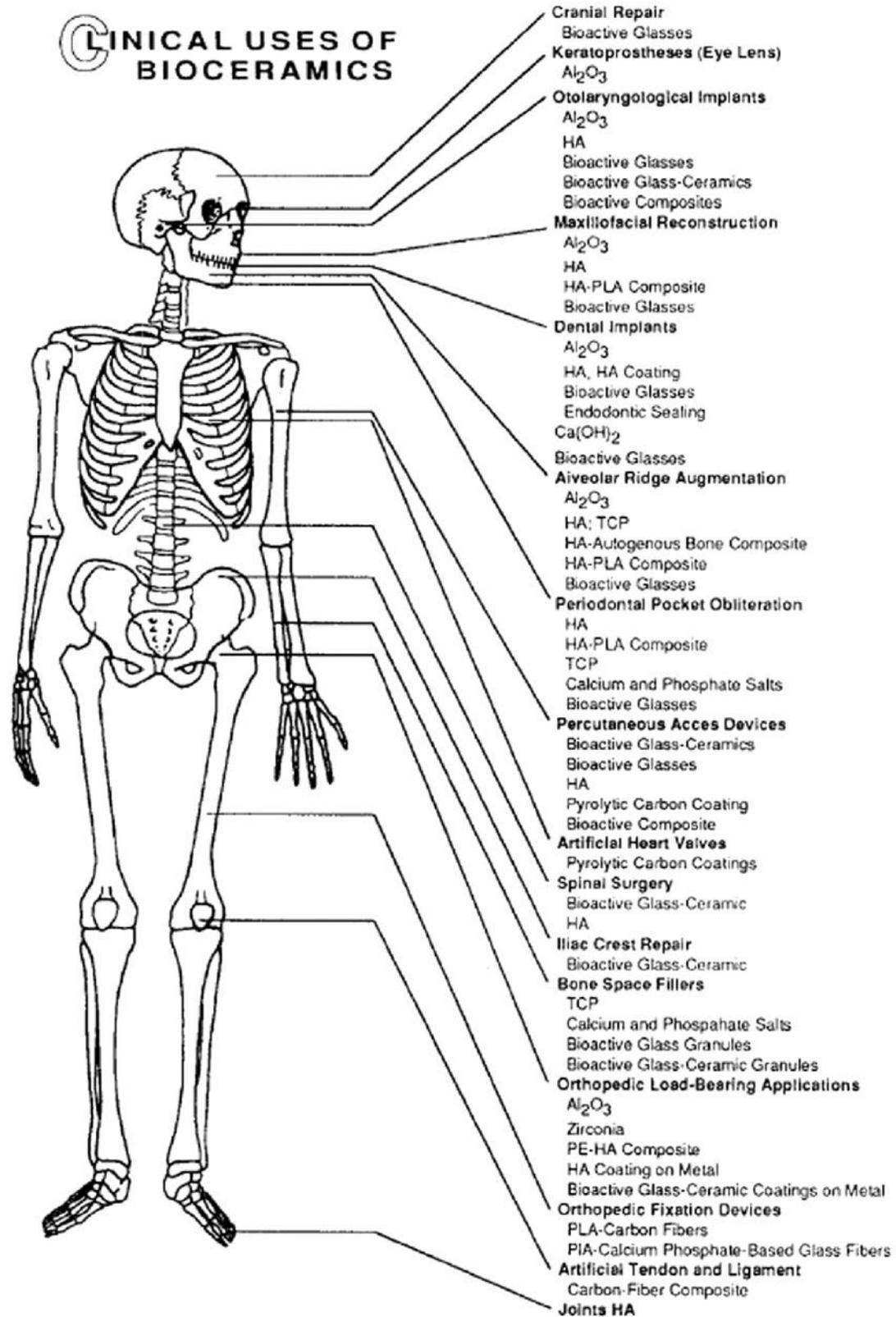


Figura 3: Usos clínicos de los biocerámicos.

En la actualidad se experimentan materiales de diferente naturaleza para utilizarlos como implantes en distintos tejidos del cuerpo, tales como metales y sus aleaciones, polímeros naturales y sintéticos, biovidrios y cerámicos, además de algunas combinaciones entre ellos denominados materiales compuestos [23].

#### **1.1.06. Vidrios bioactivos**

El primer vidrio bioactivo estudiado fue Bioglass® 45S5, introducido por Hench en 1971 [8] y que aún permanece como el más usado en aplicaciones clínicas. Bioglass® 45S5 es producido por fusión y su composición específica es de 45% SiO<sub>2</sub>, 24,5% CaO, 24,5% Na<sub>2</sub>O, 6% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (porcentajes en peso).

Al principio de los 90, Li y sus colegas sintetizaron algunos vidrios bioactivos por la técnica sol-gel [26, 27]. Esta nueva clase de vidrios bioactivos mostraron un rango composicional más alto de bioactividad, con un elevado contenido de silicio, ya que vidrios en el sistema SiO<sub>2</sub> – CaO – P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, luego de ser sumergidos en un fluido corporal simulado, pudieron formar una capa de hidroxiapatita (HA), con un contenido de silicio mayor al 90%. Gran aumento, considerando que los vidrios bioactivos tradicionales tiene como máximo un 60% de silicio.

Una de las principales diferencias entre los vidrios sintetizados por sol-gel y por fusión yace en el área superficial. Para los vidrios creados por sol-gel el área superficial puede llegar a 650 m<sup>2</sup>/g, mientras que los vidrios creados por fusión presentan un área superficial menor a 1 m<sup>2</sup>/g para partículas sin tratar y alrededor de 2 m<sup>2</sup>/g para partículas micrométricas.

Con el método sol-gel propiedades estructurales y superficiales, como área superficial y porosidad, pueden ser finamente reguladas dependiendo de la composición y las condiciones de síntesis, pudiéndose obtener materiales nano-estructurados controlados.

Por otro lado, para producir vidrios bioactivos por fusión, los precursores son fundidos a temperaturas mayores a 1000 °C, con un procedimiento similar al usado para fundir vidrios comunes de ventanas. El material resultante no tiene ninguna porosidad y su área superficial depende únicamente del tamaño de partícula obtenido.

HA se deposita mucho más rápido en los vidrios bioactivos sintetizados por sol-gel que en los vidrios bioactivos tradicionales, sintetizados por fusión y en algunos casos los materiales pueden ser reabsorbidos. De hecho, la estructura porosa de los vidrios bioactivos sol-gel permite la formación de una capa hidratada dentro del material, donde trazas biológicas pueden entrar, manteniendo su configuración estructural y actividad biológica. De esta manera, los vidrios sol-gel pueden convertirse en una parte indistinguible del tejido huésped [4].

Muchos materiales diferentes, sintetizados por la técnica sol-gel, con su composición basada en CaO-SiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>-CaO- P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ó SiO<sub>2</sub>-CaO- P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-MgO, han mostrado bioactividad cuando son sumergidos en SBF (*Simulated Body Fluid*). Por otro lado, una mayor cantidad de SiO<sub>2</sub> en la composición del vidrio, induce un área superficial mayor, pero un menor grado de porosidad, mientras que más altas temperaturas usadas en el proceso de síntesis disminuyen el área superficial del vidrio.

#### **1.1.07. Modificadores**

La introducción de la técnica de síntesis sol-gel abrió la investigación de nuevos tipos de biomateriales. Muchos posibles modificadores pueden ser introducidos en un material sintetizado por esta vía. Ciertas composiciones de vidrios bioactivos tienen elementos adicionales incorporados en la red de silicatos, como fluorina, magnesio, estroncio, fierro, boro, potasio o zinc [28-35].

Es bien conocida la capacidad antimicrobial de la plata, es por esto que algunos investigadores han agregado Ag<sup>+</sup> a la composición de vidrio bioactivo por sol-gel, con el objetivo de añadir propiedades antibacteriales al material. Por otro lado, la incidencia de infecciones centradas en biomateriales, que a menudo desencadena en una cirugía de revisión, lo que remarca la necesidad de mejorar las propiedades de los biomateriales existentes [36].

Se ha reportado que nanopartículas de plata y de cobre poseen una gran acción antimicrobiana contra *E. coli*, *B. subtilis* y *S. aureus* [37] y estudios recientes muestran que vidrios bioactivos con incorporación de cobre derivados de sol-gel, presentan propiedades antiinflamatorias [38] y compósitos de polímeros con nanopartículas de cobre tienen un alto potencial bactericida [39]. Sin embargo, considerando que el cobre es aproximadamente diez

veces más barato que la plata, no existen muchos estudios de su incorporación en vidrios bioactivos.

### **1.1.08. Técnicas de síntesis de biovidrios**

En general, los biovidrios pueden ser sintetizados por varios métodos, entre los cuales cabe mencionar:

#### Microemulsión

La microemulsión ha sido una técnica conocida como ajustable, capaz de obtener partículas inorgánicas con un tamaño de partícula en el rango de nanómetros con mínima aglomeración. Una microemulsión es una dispersión isotrópica de dos líquidos inmiscibles, termodinámicamente estable y transparente, como agua y aceite estabilizados por moléculas surfactantes en la interfaz agua/aceite. En microemulsiones agua-en-aceite, gotas de agua nanométricas son dispersadas en la fase continua de hidrocarburos y rodeadas por la monocapa de moléculas surfactantes. El tamaño de las gotas acuosas está usualmente en el rango de 5 a 20 [nm] de diámetro. Esas gotas acuosas actúan como un microreactor o nanoreactor en las cuales las reacciones pueden llevarse a cabo cuando éstas, conteniendo los reactantes adecuados, colisionan unas con otras. Partículas precursoras de hidróxido o oxalato son primeramente formadas en un sistema de microemulsión. Luego del secado y calcinación del polvo precursor a una temperatura apropiada, se obtiene el sistema de óxido deseado. La principal desventaja de la técnica de microemulsión son los bajos rendimientos de producción y la utilización de una gran cantidad de aceite y fases surfactantes [40].

#### Método de síntesis en fase gaseosa

La síntesis en fase gaseosa utiliza compuestos precursores metal-orgánicos para producir nanopartículas a temperaturas sobre 1000°C. El principio básico de todos los métodos de síntesis en fase gaseosa es la formación de un núcleo molecular el cual luego es seguido por condensación y fusión, induciendo el subsecuente crecimiento de nanopartículas en regiones de alta temperatura durante el proceso. El factor más decisivo para el tamaño de partícula final es el tiempo medio de residencias de las partículas en las regiones de altas temperaturas. A diferencia de los procesos en fase húmeda, la síntesis en fase gaseosa permite generalmente altas tasas de producción. Uno de los más exitosos métodos de síntesis en fase gaseosa es la

síntesis “*flame spray*”. En este proceso, el precursor líquido es dispersado por oxígeno sobre un inyector, de manera que forma un spray el cual es encendido. Mientras el *spray* se quema, los constituyentes orgánicos del precursor líquido combustión completamente principalmente a agua y dióxido de carbono y los constituyentes metálicos se oxidan para formar nanopartículas [40]. Una desventaja de esta técnica, es que no es posible conseguir partículas de alta área superficial.

### Técnica de hilado láser

La técnica de hilado láser esencialmente involucra el rápido calentamiento y fusión de un pequeño volumen del material precursor a altas temperaturas usando un láser de alto poder. Al mismo tiempo, un chorro de gas supersónico es inyectado en el volumen fundido para soplar el material fundido. Seguido a esto, el material fundido es rápidamente estirado y enfriado por el chorro de gas supersónico. Sólo recientemente, en 2009, Quintero et al. [41] desarrollaron el primer vidrio bioactivo por esta técnica. Ellos produjeron nanofibras de vidrio bioactivo de composiciones 45S5 biovidrio® y 52S4.6 e investigaron la posibilidad de usar esas nanofibras como soportes o como refuerzos en compósitos de matriz polimérica.

### Sol-gel

La técnica sol-gel es una aproximación alternativa para fabricar biovidrios que ha sido ampliamente estudiada en los años recientes y las ventajas de éste son bien conocidas, que el proceso ocurre a bajas temperaturas y proporciona mezclas homogéneas en la composición final del vidrio.

El proceso sol-gel involucra la evolución de redes inorgánicas a través de la formación de una suspensión coloidal (sol) y gelación del sol para formar una red en una fase líquida continua (gel). Los precursores para sintetizar esos coloides consisten de un elemento metálico o metaloide rodeado de varios ligandos reactivos. Los alcóxidos metálicos son los más populares, debido a que ellos reaccionan fácilmente con agua. Entre éstos, los más ampliamente utilizados son los alcoxisilanos, como tetrametilortosilano (TMOS) o tetraetilortosilicato (TEOS).

A nivel de grupos funcionales, generalmente se utilizan tres reacciones para describir el proceso sol-gel: hidrólisis, condensación de alcohol y condensación de agua. Sin embargo, las

características y propiedades de una red inorgánica de sol-gel particular están relacionadas a una variedad de factores que afectan la tasa de reacciones de hidrólisis y condensación, tales como, pH, temperatura y tiempo de reacción, concentraciones de reactantes, naturaleza y concentración del catalizador, tasa molar de H<sub>2</sub>O/Si (R), tiempo y temperatura de añejado y secado. De estos factores el pH, la naturaleza y concentración del catalizador, la tasa molar de H<sub>2</sub>O/Si (R) y la temperatura se han identificado como los más importantes. Así, controlando estos factores es posible variar la estructura y propiedades de la red inorgánica obtenida por sol-gel sobre amplios rangos [42].

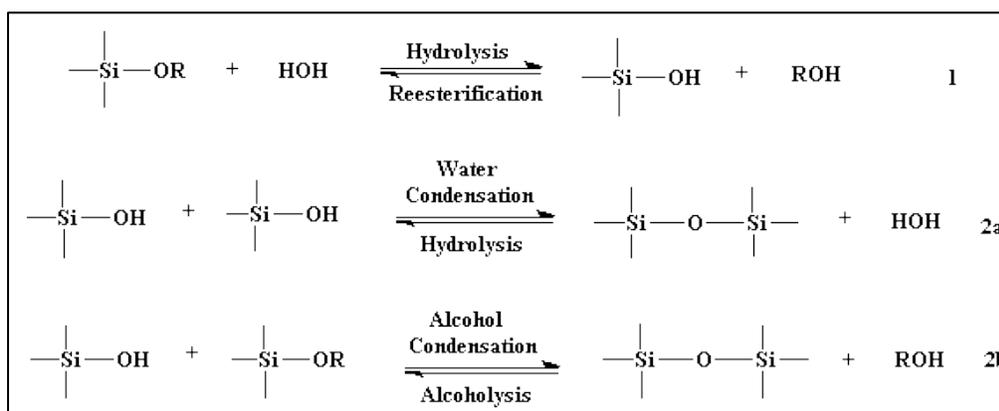


Figura 4: Principales reacciones de la técnica Sol-Gel

Para la síntesis de vidrios bioactivos, los precursores típicos utilizados son tetraetilortosilicato (TEOS), nitrato de calcio y trietilfosfato (TEP). Un gel se forma luego de reacciones de hidrólisis y condensación, el cual luego es calcinado a temperaturas entre 600 y 700 °C para estabilizar el vidrio. Dependiendo del método de preparación, los productos derivados de sol-gel, como por ejemplo films o partículas, son altamente porosos, exhibiendo una alta área superficial específica [26].

La morfología y tamaño de nanopartículas de vidrios bioactivos pueden ser manipuladas variando las condiciones de producción y la tasa de alimentación de los reactantes [43].

### 1.1.09. Bioactividad In-vitro

La importancia de analizar bioactividad un-vitro antes de un análisis in-vivo está clara. Los estudios in-vivo requieren de sacrificios animales, son más costosos y más difíciles de

reproducir. Es por esto que antes de probar la bioactividad de los materiales in-vivo, es necesario realizar ensayos in-vitro. Se pueden utilizar soluciones simples que imiten sólo la composición inorgánica de los fluidos corporales o unas más complejas que contengan además trazas biológicas, como proteínas.

En 1990, Kokubo et al. introdujeron el uso de un fluido corporal simulado (SBF) para analizar la bioactividad de diferentes materiales [24]. El SBF es una solución que no contiene proteínas ni células y que está compuesta por diferentes sales que simulan la concentración y pH del plasma humano (Tabla 1).

Tabla 1: Concentración (mM) y pH de SBF y plasma humano.

<b>Ion</b>	<b>SBF (concentración mM)</b>	<b>Plasma (concentración mM)</b>
<b>Na<sup>+</sup></b>	142	142
<b>K<sup>+</sup></b>	5,0	5,0
<b>Mg<sup>++</sup></b>	1,5	1,5
<b>Ca<sup>++</sup></b>	2,5	2,5
<b>Cl<sup>-</sup></b>	147,8	103,0
<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	4,2	4,2
<b>HPO<sub>4</sub><sup>-</sup></b>	1,0	1,0
<b>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>	0,5	0,5
<b>pH</b>	7,25	7,20 - 7,40

Tanto el plasma como el SBF están saturados con respecto a hidroxiapatita. Por esta razón, sólo unos pocos sitios de nucleación son suficientes para observar la nucleación de hidroxiapatita en la superficie de algún material. Esto permitió el análisis de la bioactividad en algunos materiales muy simples que no contienen calcio ni fósforo en sus composiciones.

Debido a que la validez de este método no había sido sistemáticamente ensayada, en 2006, Kokubo y Takadama realizaron un estudio para validar el método, concluyendo que un material capaz de formar apatita en su superficie en SBF es capaz de formar apatita en su superficie en un cuerpo viviente, y unirse a hueso viviente a través de esta capa de apatita. Esta relación se mantiene mientras que el material no contenga un componente que induzca reacciones tóxicas o de anticuerpos. Hay unos pocos materiales que se unen directamente a hueso viviente sin la formación detectable de apatita en sus superficies. A pesar de esta limitación, la examinación de la formación de apatita en la superficie de un material en SBF es

útil para predecir la bioactividad en hueso *in vivo* del material, no sólo cualitativamente sino también cuantitativamente. Este método puede ayudar en el desarrollo eficiente de nuevos tipos de materiales bioactivos [25].

#### **1.1.10. Plata**

Las propiedades antimicrobiales del ión de plata,  $\text{Ag}^+$ , han sido explotadas desde tiempos antiguos por las culturas asiática y mediterránea, hojas de platas eran utilizadas en tratamiento quirúrgico de heridas y huesos rotos. [44]

El mecanismo de la acción antimicrobial de los iones de plata está cercanamente relacionado con su interacción con los grupos tiol. Los aminoácidos, como la cisteína, y otros compuestos que contienen grupos tiol, como el tioglicolato de sodio, neutralizan la actividad antibacterial de la plata. Mientras que otros aminoácidos, como cistationina, ácido cisteico, L-metionina, taurina, bisulfato de sodio y tiosulfato de sodio, son incapaces de neutralizar la actividad de los iones de plata. Éste y otros descubrimientos implican que la interacción de los iones de plata con los grupos tiol en enzimas y proteínas juega un rol esencial en su acción antimicrobial, aunque otros componentes celulares, como los puentes de hidrógeno, pueden también estar involucrados [45].

También se propone que la plata actúa mediante una unión a los grupos funcionales claves de las enzimas. Los iones de plata causan la liberación de los iones de potasio de las bacterias, por lo que el plasma bacterial o la membrana citoplasmática, que está asociada con muchas enzimas importantes, son un objetivo importante de los iones de plata [45].

Además de sus efectos en las enzimas bacteriales, los iones de plata causan una marcada inhibición del crecimiento bacterial. Éstos inhiben la división celular y dañan tanto la envoltura celular como el interior de la bacteria. Los iones de plata interactúan con los ácidos nucleicos, preferentemente con las bases nitrogenadas en el ADN, en vez que con los grupos fosfatos, aunque el significado de esto en términos de su acción letal no está todavía claro [45].

La principal característica del ión de plata es su propiedad antibacterial de amplio espectro, la cual es particularmente significativa para la colonización polimicrobial asociada con infecciones relacionadas con biomateriales. Por otro lado, las bacterias muestran una baja

tendencia a desarrollar resistencia a productos basados en plata, y por lo tanto, plata metálica o iones han sido incorporados en variados biomateriales, tales como poliuretano, hidroxiapatita y vidrios bioactivos. Los materiales que contienen plata son también interesantes para aplicaciones en reparación de heridas [44].

La plata reacciona con la humedad en la superficie de la piel o con los fluidos de una herida, liberando iones de plata, los cuales a su vez, dañan el DNA y RNA bacterial, y además inhiben la replicación. Es por esto que productos con una liberación sostenida de plata tienen una acción bactericida, manejando el exudado y el olor de la herida. Por otro lado, el tratamiento con plata parece reducir las fases de la curación inflamatoria y de granulación de tejidos e inducen una reparación epidérmica [44].

### **1.1.11. Cobre**

El cobre es uno de los elementos metálicos esenciales para la salud humana. Un cuerpo adulto contiene alrededor de 1,4 y 2,1 mg de cobre por Kg de peso. Se estima que un humano ingiere alrededor de 1 mg de cobre al día. Después de satisfacer los requerimientos nutricionales, el excedente de cobre se libera en la bilis y es excretado en las heces [46].

Los griegos, en el tiempo de Hipócrates (400 a.c.), fueron los primeros en descubrir el poder sanitizante del cobre, prescribiéndolo para enfermedades pulmonares y para purificar el agua. En el siglo 18, el cobre se volvió de amplio uso clínico en el mundo occidental, en el tratamiento de desordenes mentales y aflicciones a los pulmones. Los primeros colonos norteamericanos, mientras cruzaban el continente hacia el oeste, ponían monedas de cobre y plata en grandes barricas de agua, para proveerse de agua potable segura para su largo viaje. En la segunda guerra mundial, los soldados japoneses ponían piezas de cobre en sus botellas de agua, para evitar la disentería. Para el vuelo de los Apolo, la NASA diseñó un sistema de esterilización de agua basado en la ionización de cobre-plata [46].

El cobre está considerado seguro para los seres humanos, demostrado en el amplio y prolongado uso en dispositivos intrauterinos. A diferencia de la baja sensibilidad del tejido humano al cobre, los microorganismos son extremadamente sensibles a éste. Varios mecanismos se han sugerido para explicar la toxicidad del cobre en microorganismos (Figura 5) [46].

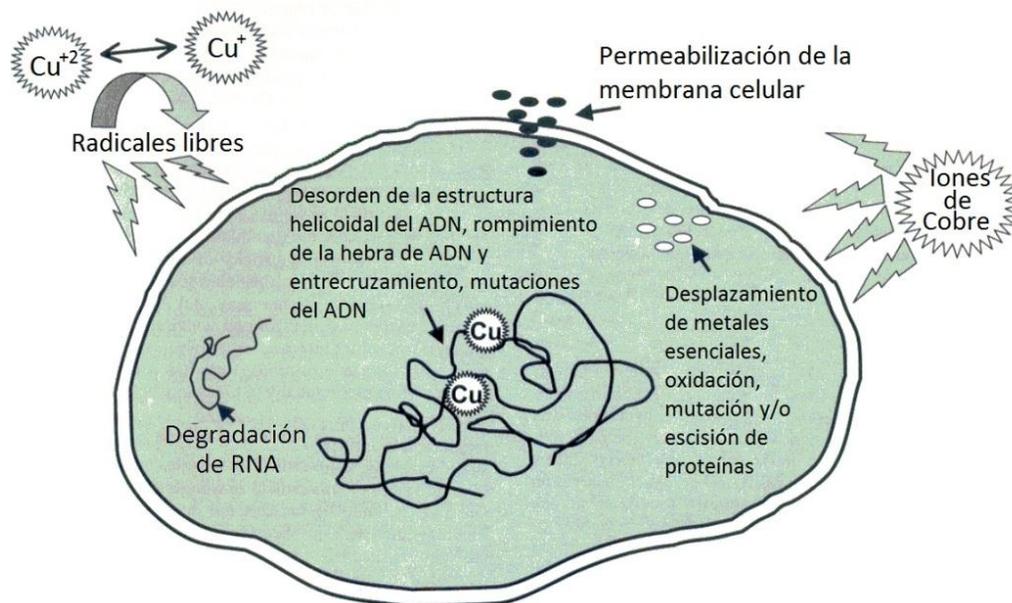


Figura 5: Mecanismos de toxicidad del cobre en microorganismos

En general los metales en altas concentraciones son tóxicos para los microorganismos. Esto ocurre por diversos mecanismos [46]:

- Desplazamiento de metales esenciales de sus sitios de unión nativos a través de interacciones de ligando. En general, los metales no esenciales se unen con una mayor afinidad a los grupos que contienen tiol y a los sitios de oxígeno, que los metales esenciales.
- Cambio en la estructura conformacional de ácidos nucleicos y proteínas.
- Interferencia con la fosforilación oxidativa y el balance osmótico.
- Las propiedades redox de algunos metales, pueden contribuir a su inherente toxicidad. Por ejemplo, el ciclo redox entre  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Cu}^+$  puede catalizar la producción de radicales hidroxilos (Figura 5), altamente reactivos, los cuales pueden dañar lípidos, proteínas, DNA y otras biomoléculas.
- Daño en la membrana celular. Altas concentraciones de cobre, pueden llevar a un rápido deterioro en la integridad de la membrana. Esto generalmente se traduce en una fuga de solutos celulares, como iones de potasio, y en la muerte celular.

### 1.1.12. Infecciones en biomateriales

Una infección es la causa más común de falla de un biomaterial implantado en la medicina moderna. La adhesión y el posterior crecimiento superficial de bacterias en implantes biomédicos y dispositivos, causan la formación de un biofilm, en el cual el llamado “glicocalix” (material polimérico extracelular producido por algunas bacterias) incrusta a la bacteria infecciosa, y le ofrece protección contra el sistema inmune del huésped y tratamiento antibiótico [47].

Los biofilms constituyen un modo protegido de crecimiento, que permite la supervivencia en un medioambiente hostil. La estructura que se forma en un biofilm contiene canales en los cuales pueden circular nutrientes y las células en diferentes regiones de un biofilm, muestran diferentes patrones de expresión de genes. La complejidad de la estructura y metabolismo de un biofilm, tiene similitud con tejidos de organismos superiores [48].

En los años pasados, medidas preventivas para evitar infecciones post-operatorias han probablemente contribuido a limitar las infecciones en implantes ortopédicos (IIO) en cirugía ortopédica. Sin embargo, un número creciente de artroplastia en la población anciana y reconstrucciones técnicamente más complejas podrían incrementar el riesgo de infecciones.

Los *Staphylococcus* son los principales microorganismos implicados en IIO y la medicina preventiva está generalmente enfocada contra esos patógenos. Sin embargo, las infecciones de bacilos Gram-negativos, que corresponden a alrededor del 15% de las IIO, son también altamente relevantes en términos de severidad y riesgo de falla de tratamiento. Después de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* es la segunda causa más común de las IIO provocadas por Gram-negativos (20 - 30%). Esta especie forma parte de la flora intestinal aeróbica humana, pero también está involucrada en varias enfermedades extra intestinales, incluyendo infecciones del tracto urinario y bacteremia, presencia de bacterias en la sangre, que puede terminar alimentando de bacterias a un implante ortopédico [49].

Con respecto a la cavidad bucal, *Mutans streptococci* son microorganismos relacionado con el desarrollo de caries y *Streptococcus mutans* es el miembro de este grupo más frecuentemente aislado en humanos. Debido a su colonización heterogénea de la cavidad oral, puede ser detectado en algunos dientes y superficies, pero no en otros, en la misma boca. Además, puede ser difícil de obtener muestras de placa de superficies propensas a caries,

como las superficies oclusales. Estos potenciales inconvenientes han llevado a los investigadores a utilizar muestras de saliva para el estudio de esta bacteria, ya que se conoce una fuerte asociación entre niveles salivares de *S. mutans* y su colonización de superficies dentales, con un número mayor de superficies colonizadas cuando se tienen mayores niveles salivares [50].

## 1.2. Descripción del proyecto y motivación

En el proyecto se evaluará la acción antimicrobial *in vitro* de los biovidrios derivados de sol gel con incorporación de plata,  $\text{SiO}_2 - \text{CaO} - \text{P}_2\text{O}_5 - \text{Ag}_2\text{O}$  (AgBG) y con incorporación de cobre,  $\text{SiO}_2 - \text{CaO} - \text{P}_2\text{O}_5 - \text{CuO}$  (CuBG). Las propiedades de los biovidrios sintetizados serán comparadas entre sí y con el biovidrio de tres componentes  $\text{SiO}_2 - \text{CaO} - \text{P}_2\text{O}_5$  (BG), libre de metales.

Los metales a incorporar, cobre y plata, fueron escogidos debido a su amplio conocimiento y utilización como agentes bactericidas. La idea de este trabajo es comparar su actividad bactericida dentro de vidrios bioactivos, ya que biovidrios con incorporación de plata han sido reportados en la literatura, mientras que biovidrios con incorporación de cobre no. Además hay que considerar el hecho que el cobre presenta una menor toxicidad y menor precio.

Las cepas bacterianas escogidas para los ensayos microbiológicos son *E. coli* DH5 $\alpha$  y *S. mutans*, una cepa clínica. *E. coli* se escogió debido a su incidencia reportada en biomateriales, mientras que *S. mutans* es la principal bacteria relacionada con las caries y por tanto un potencial agente microbiano en biomateriales que se apliquen en la cavidad bucal. Además, siendo *E. coli* Gram-negativo y *S. mutans* Gram-positivo, se abarca una cepa de cada clasificación.

La síntesis de los biomateriales se realizó mediante el método sol gel por varios motivos: sol-gel es una técnica versátil, que permite una regulación sencilla de las proporciones de cada componente. Opera a bajas temperaturas en la mayor parte de la síntesis y no requiere elementos o equipos complejos para llevarse a cabo. Existen publicaciones de vidrios bioactivos de cuatro componentes desarrollados por esta técnica, entre los cuales destacan aquellos que incorporan metales dentro de su síntesis, específicamente, aquellos que incorporan plata. La única publicación encontrada de un biovidrio con incorporación de cobre es realizada con éste método. Y por otro lado, es una técnica conocida dentro del grupo de investigación de polímeros y por lo tanto se contaba con la experiencia, los equipos y reactivos necesarios para llevarla a cabo.

## 1.3. Objetivos

### 1.3.1. Objetivo general

- Sintetizar biovidrios que incorporen metales mediante la técnica sol-gel y analizar sus propiedades antibacteriales.

### 1.3.2. Objetivos específicos

- Sintetizar biovidrios mediante el método Sol-gel.
- Incorporar cobre y plata en la síntesis de biovidrios mediante el método Sol-gel.
- Controlar la incorporación de cobre y plata dentro de los biovidrios sintetizados.
- Caracterizar los materiales sintetizados mediante: difracción de rayos x, ICP (inductively coupled plasma), granulometría láser, análisis de área superficial (BET) y liberación de iones en solución.
- Estudiar la biocompatibilidad in-vitro de los materiales sintetizados, a través de SBF.
- Estudiar las propiedades antibacteriales de los materiales sintetizados, mediante la concentración mínima bactericida correspondiente a cada biomaterial para la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  y una cepa clínica de *S. mutans*.
- Comparar los resultados obtenidos para los materiales sintetizados con cobre y plata.

## 1.4. Alcances

En general, el alcance de este proyecto es brindar una primera mirada a la incorporación de cobre en vidrios bioactivos con miras a aplicaciones dentales, realizando sólo estudios de factibilidad de la incorporación de los metales y estudios biológicos *in-vitro*, sin pretensiones de desarrollar un material directamente aplicable en aplicaciones biomédicas.

El análisis antibacterial de los materiales sintetizados se realizará mediante el uso de micropolvos de los mismos sin considerar otras morfologías como films o alguna sinterización del material. Es por esto que estos resultados no serán directamente aplicables a un caso real de utilización en un paciente.

La biocompatibilidad *in-vitro* de los materiales sintetizados se demostrará mediante un ensayo en SBF, estudiando la formación de hidroxiapatita en la superficie del material.

Las condiciones de síntesis de los materiales se variarán con respecto a lo reportado en la literatura, para determinar el grado de control en la incorporación de plata y cobre en el biomaterial y a su vez, correlacionar la cantidad incorporada con la capacidad antibacterial de los mismos.

## 2. Metodología

### 2.1. Síntesis de biovidrios

#### Materiales:

- Tetraetilortosilicato (TEOS) 98%, Merck.
- Ácido nítrico 0,1 M.
- Trietilfosfato (TEP) 99,8%, Aldrich.
- Nitrato de calcio tetrahidratado 99%, Aldrich.
- Nitrato de plata, Merck
- Acetato de cobre 98,5%, Aldrich.

#### Métodos:

Los materiales a sintetizar se preparan según las siguientes proporciones molares:

Tabla 2: Composición molar de los materiales a sintetizar

Nombre	Composición	SiO <sub>2</sub>	CaO	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Ag <sub>2</sub> O	CuO
<b>BG</b>	SiO <sub>2</sub> - P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> - CaO	64%	26%	10%	-	-
<b>AgBG(1)</b>	SiO <sub>2</sub> - P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> - CaO - Ag <sub>2</sub> O	64%	26%	5%	5%	-
<b>AgBG(2)</b>	SiO <sub>2</sub> - P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> - CaO - Ag <sub>2</sub> O	59%	26%	5%	10%	-
<b>CuBG(1)</b>	SiO <sub>2</sub> - P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> - CaO - CuO	64%	26%	5%	-	5%
<b>CuBG(2)</b>	SiO <sub>2</sub> - P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> - CaO - CuO	59%	26%	5%	-	10%

Para ello se seguirá el procedimiento de síntesis obtenido de la publicación “An in vitro biological and anti-bacterial study on a sol–gel derived silver-incorporated bioglass system” [44], detallado a continuación, en el cual se utiliza como base 13,33 [g] de TEOS.

Se agregan 13,33 [g] de tetraetilortosilicato (TEOS) en 30[mL] de una solución 0,1 M de ácido nítrico y se deja reaccionar bajo agitación durante 60 [min] en un frasco de vidrio con tapa a temperatura ambiente, teniendo en cuenta que la agitación sea lo suficientemente fuerte como para que no se formen dos fases. Luego, para la síntesis de BG, se agregan los

siguientes compuestos en secuencia, con un intervalo de 45 [min] entre un reactante y otro: 0,91 [g] de trietilfosfato (TEP) y 6,14 [g] de nitrato de calcio tetrahidratado. Después de agregar el último reactivo se continúa agitando por 1 hora.

Para el caso de los AgBG, el recipiente de vidrio se cubre con papel aluminio, dado que la plata es fotosensible, se esperan 45 min luego de agregar nitrato de calcio y se agregan 0,84 [g] de nitrato de plata y se continúa agitando por 1 hora.

En cuanto a CuBG, análogamente a AgBG, se esperan 45 min luego de agregar nitrato de calcio y se agrega 1 [g] de acetato de cobre y se continúa agitando por 1 hora. En este caso, luego de adicionar acetato de cobre, se regula el pH con ácido nítrico 0,1M, de manera que su valor permanezca alrededor de 1,4.

Las soluciones resultantes se mantienen en el mismo recipiente, sellado por 10 días a temperatura ambiente. Una vez transcurridos los 10 días, estas soluciones se ponen, aún selladas, a 70°C por 3 días. Luego de esto, se ponen a secar con orificios en la tapa o con la tapa ligeramente abierta a 120°C por 2 días más, con el objetivo de remover toda el agua. Finalmente, luego de esta etapa de secado, los geles secos se colocan en crisoles y se calcinan por 24 horas a 700°C, utilizando una rampla de temperatura de 5°C por minuto. El material resultante se muele con un molino, para obtener partículas del rango de 80 a 200 [µm].

## 2.2. Concentración mínima bactericida

### 2.2.1. Escherichia coli

#### *Materiales:*

- Medio Luria Broth® (LB).
- Bacto Agar®.
- NaCl
- Ampicilina.
- Agua destilada.
- Tapones de algodón.
- Tubos de vidrio de 10 [mL].
- Matraces Erlenmeyer de 100 [mL]
- Agitador con regulación de temperatura a 37°C.
- Autoclave.

#### *Método:*

Se realiza un cultivo líquido de *E. coli* DH5 $\alpha$  resistente a ampicilina en medio LB con 100[ $\mu$ g/mL] de ampicilina. Para esto, se toma un cultivo sólido preexistente y mediante un asa se extrae suavemente parte de las colonias que están en la superficie, luego éstas se depositan en medio líquido LB (15,5 [g/L] de LB y 9,0 [g/L] de NaCl), manteniendo siempre las precauciones pertinentes para mantener la esterilidad. Este se mantiene con agitación por 24 horas a 37°C. Luego de las 24 horas, a partir de este cultivo se realizan una serie de cultivos líquidos, tomando una alícuota de 2 [mL] por cada 50 [mL] de medio de cultivo. Los recipientes, ya sean tubos de ensayo o matraces Erlenmeyer, son previamente esterilizados con distintas concentraciones de biomaterial en su interior (BG, AgBG, AgBG(1), CuBG(1) y CuBG(2)). Estos cultivos se mantienen con agitación por 24 horas a 37°C.

La concentración inicial de los biomateriales es de 1, 3 y 5[mg/mL] y dependiendo de los resultados observados se varía ésta. Para la preparación de las concentraciones, las cantidades adecuadas para 5 o 25[mL] son pesadas directamente en tubos de vidrio de 10[mL] o matraces Erlenmeyer de 100[mL], según corresponda, considerando la cantidad de material necesaria. Luego éstos son autoclavados, para asegurar su esterilidad y al momento del inóculo se añade la cantidad adecuada de medio de cultivo, previamente esterilizado.

La efectividad bactericida de los biomateriales en los distintos cultivos se estudia en medio sólido LB (15,5 [g/L] de LB, 9,0 [g/L] de NaCl y 20 [g/L] de Bacto Agar) con 100[µg/mL] de ampicilina en placas de Petri, tomando una alícuota de 20[µL] de cada cultivo y añadiéndolo a cada placa en duplicado. Estos cultivos se mantienen a 37°C, sin agitación, por 24 horas. Luego de este tiempo se determina visualmente las placas que presentan crecimiento bacterial, determinando el rango de la concentración mínima inhibitoria para cada biomaterial.

### **2.2.2. Streptococcus mutans**

#### ***Materiales:***

- Medio T.Y.C. (*Tryptone Yeast Cystine*).
- Medio Todd Hewitt (TH)
- Agua destilada.
- Tapones de algodón.
- Tubos de vidrio de 10 [mL].
- Matraces Erlenmeyer de 100 [mL].
- Recipiente de vidrio sellado.
- Agitador con regulación de temperatura a 37°C.
- Autoclave.

### ***Método:***

Se realiza un cultivo líquido de *S. mutans* en medio T.Y.C. (30 [g/L] de T.Y.C. en agua destilada). Para esto, se toma un cultivo sólido preexistente y mediante un asa se extrae suavemente parte de las colonias que están en la superficie, luego éstas se depositan en medio líquido T.Y.C., manteniendo siempre las precauciones pertinentes para mantener la esterilidad. Este se mantiene con agitación por 48 horas a 37°C. Luego de las 48 horas, a partir de este cultivo se realizan una serie de cultivos líquidos, tomando una alícuota de 2 [mL] por cada 50 [mL] de medio de cultivo. Los recipientes, ya sean tubos de ensayo o matraces Erlenmeyer, son previamente esterilizados con distintas concentraciones de biomaterial en su interior (BG, AgBG, AgBG(1), CuBG(1) y CuBG(2)). Estos cultivos se mantienen con agitación por 48 horas a 37°C.

La concentración inicial de los biomateriales es de 5, 10 y 20[mg/mL]. Para la preparación de las concentraciones, las cantidades adecuadas para 5[mL] son pesadas directamente en tubos de vidrio de 10[mL], luego éstos son autoclavados, para asegurar su esterilidad y al momento del inóculo se añade la cantidad adecuada de medio de cultivo, previamente esterilizado.

La efectividad bactericida de los biomateriales en los distintos cultivos se estudia en medio sólido TH en placas de Petri, tomando una alícuota de 20[μL] de cada cultivo y añadiéndolo a cada placa en duplicado. Las placas son cultivadas en condiciones de microaerofilia, esto es, ubicándolas en un recipiente de vidrio herméticamente sellado con una vela encendida en su interior, la cual consume el oxígeno hasta apagarse, creando el ambiente adecuado. El recipiente es mantenido a 37°C, sin agitación, por 48 horas. Luego de este tiempo se determina visualmente las placas que presentan crecimiento bacterial, determinando el rango de la concentración mínima inhibitoria para cada biomaterial.

### 2.3. Preparación de SBF y ensayo de biocompatibilidad

#### Materiales:

- Agua Ultrapura, Milli Q, Millipore o desionizada.
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>)
- Cloruro de potasio (KCl)
- Fosfato dipotásico trihidratado (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 3H<sub>2</sub>O)
- Cloruro de magnesio hexahidratado (MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O)
- Cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>)
- Sulfato de sodio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
- Tris(hidroximetil)aminometano (Tris)
- Ácido clorhídrico (HCl) 1M
- Biomaterial: BG, AgBG(1), AgBG(2), CuBG(1), CuBG(2).

Nota: Los reactivos deben ser previamente secados dadas las propiedades higroscópicas de algunos de ellos.

#### Método:

##### Preparación de SBF:

Tabla 3: Reactivos para la preparación de SBF.

Orden	Reactivo	Cantidad	Pureza (%)	Peso Molecular
1	NaCl	8,035 g	99,5	58,4430
2	NaHCO <sub>3</sub>	0,355 g	99,5	84,0068
3	KCl	0,225 g	99,5	74,5515
4	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 3H <sub>2</sub> O	0,231 g	99,0	228,2220
5	MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,311 g	98,0	203,3034
6	HCl 1M	39 ml	-	-
7	CaCl <sub>2</sub>	0,292 g	95,0	110,9848
8	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,072 g	99,0	142,0428
9	Tris	6,118 g	99,0	121,1356
10	HCl 1M	0 – 5 ml	-	-

Debido a que el SBF está sobresaturado con respecto a apatita, un método de preparación inapropiado puede producir una precipitación de apatita en la solución. En todo momento se debe asegurar que la solución se mantenga incolora, transparente y que no presente ningún depósito en la superficie del recipiente. Si ocurre alguna precipitación, detener la preparación de SBF, descartar la solución y comenzar desde el lavado del equipo y preparar SBF nuevamente.

Para preparar 1000[ml] de SBF, primero, poner 700[ml] de agua desionizada con una barra de agitación magnética en un recipiente plástico de 1000[ml]. Ubicar el recipiente en un baño de agua termoregulado sobre el agitador magnético y cubrirlo con un vidrio reloj. Regular la temperatura del agua en el recipiente a  $36,5 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$  bajo agitación.

Disolver los reactivos uno por uno, desde el primero al octavo, en el orden que aparece en la Tabla 3, teniendo en cuenta las siguientes indicaciones:

- a) En la preparación de SBF, los contenedores de vidrio deben ser evitados y se recomienda utilizar contenedores de plástico con superficies lisas sin rayas, debido a que la nucleación de la apatita puede ser inducida en la superficie de un contenedor de vidrio o en los bordes de los rayas. Si el contenedor tiene rayas, reemplácelo por uno nuevo.
- b) Nunca disolver varios reactivos simultáneamente. Disolver un reactivo sólo después que el anterior esté completamente disuelto.
- c) Debido a que el reactivo  $\text{CaCl}_2$  tiene un gran efecto en la precipitación de apatita, usualmente tiene forma granular y toma mucho tiempo disolver un granulo a la vez, disolver completamente cada gránulo antes de agregar el siguiente.
- d) Ambientar la probeta con HCl 1M antes de medir el volumen correspondiente de HCl 1M.
- e) Medir los reactivos higroscópicos como KCl,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  en el período más corto posible.

Ajustar la temperatura de la solución a  $36,5 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$ . Si la cantidad de solución es menor a 900[ml], añadir agua ultrapura hasta los 900[ml]. Insertar el electrodo de pH en la solución. Justo antes de disolver el Tris, el pH de la solución debería ser de  $2,0 \pm 1,0$ .

Con la temperatura de la solución entre 35 y 38°C, preferentemente entre 36 y 37°C, disolver el Tris en la solución poco a poco, teniendo cuidado de notar el cambio de pH. Luego de añadir una pequeña cantidad de Tris, detenerse y esperar hasta que el reactivo añadido esté completamente disuelto y el pH se haya vuelto estable. Entonces añadir más Tris aumentando el pH gradualmente. Cuando el pH esté en el rango 7,25-7,35, asegurarse que la temperatura de la solución se mantiene en el rango deseado, de lo contrario ajustar y añadir más Tris hasta un pH menor a 7,45.

- Nota 1: no agregar una gran cantidad de Tris en la solución al mismo tiempo, debido a que un aumento radical en el pH local de la solución puede provocar la precipitación de fosfato de calcio.
- Nota 2: el pH no debe aumentar por sobre 7,45 a  $36,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , teniendo en cuenta que el pH disminuye al aumentar la temperatura de la solución (el pH disminuye alrededor de  $0,05/^\circ\text{C}$  a  $36,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ).

Cuando el pH aumenta hasta  $7,45 \pm 0,01$ , detener la disolución de Tris y añadir HCl 1M gota a gota para bajar el pH a  $7,42 \pm 0,01$ , teniendo cuidado que el pH no baje de 7,4. Luego que el pH baje a  $7,42 \pm 0,01$ , disolver el Tris restante poco a poco hasta que el pH aumente hasta 7,45. Si aún queda Tris, repetir el procedimiento con HCl 1M hasta disolver toda la cantidad de Tris, manteniendo el pH en el rango 7,42 – 7,45. Después de disolver todo el Tris, ajustar la temperatura de la solución a  $36,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$  y ajustar el pH de la solución con HCl 1M gota a gota a  $7,42 \pm 0,01$ . Finalmente ajustar el pH a 7,40 a  $36,5^\circ\text{C}$ . Remover el electrodo de pH de la solución y lavarlo con agua ultrapura sobre la solución.

Poner la solución en un matraz de 1000[ml]. Lavar la superficie del recipiente con agua ultrapura y añadir los lavados en el matraz varias veces, sujetando la barra de agitación magnética para prevenir que caiga en el matraz.

Añadir agua ultrapura hasta la línea marcada (no es necesario ajustar exactamente, debido a que el volumen disminuye luego de enfriarse), tapar el matraz y sellarlo con film plástico (parafilm®). Agitar la solución y mantenerla en agua para enfriarla a  $20^\circ\text{C}$ . Luego que la solución se haya enfriado, añadir ajustar el volumen con agua ultrapura hasta la línea marcada.

El SBF Preparado debe ser guardado en una botella plástica tapada firmemente y mantenida a 5-10°C en un refrigerador. El SBF puede ser usado dentro de 30 días desde su preparación.

#### Ensayo de biocompatibilidad

Se sumergen 0,1[g] del biomaterial a ensayar (BG, AgBG(1), AgBG(2), CuBG(1), CuBG(2)) en 40[ml] de SBF en un tubo plástico, se tapa fuertemente y se sella con film plástico. El tubo se mantiene en agitación por 5 días a 37°C.

Luego del período en agitación, la muestra se filtra mediante una bomba de vacío y filtros de 0,1[ $\mu\text{m}$ ], los cuales se dejan secando por 24 horas a 30°C. El polvo recolectado de los filtros es llevado a DRX para su caracterización, donde la aparición de un pico de apatita representa la formación de ésta en torno al material y por tanto su biocompatibilidad.

## 2.4. Ensayo de lixiviación

### Materiales:

- Agua Ultrapura, Milli Q o Millipore.
- Biomaterial: BG, AgBG(1), AgBG(2), CuBG(1), CuBG(2).
- Ácido nítrico 65% ( $\text{HNO}_3$ ).

### Métodos:

Se sumergen 0,5[g] del biomaterial a ensayar (BG, AgBG(1), AgBG(2), CuBG(1), CuBG(2)) en 40[ml] de agua ultrapura en un tubo plástico, se tapa y agita fuertemente. Al cabo de 1, 2, 4, 6, 8, 25, 72, 120 y 144 horas se extrae una alícuota de 3[ml] que se almacenan en tubos eppendorf de 1,5[ml] para su posterior medición y luego se rellena el volumen extraído con agua ultrapura.

Para el caso del ensayo en SBF, el procedimiento es análogo, con la salvedad que en vez de utilizar agua ultrapura, se utiliza SBF. Los tiempos de extracción en este caso variaron a 1, 3, 7, 24, 48, 72, 120, 168 y 240 horas.

La medición de la cantidad de cobre y plata liberada por el biomaterial se realiza mediante espectroscopía de absorción atómica. Para esto, se añade de 125[ $\mu\text{l}$ ] de  $\text{HNO}_3$  65% por cada 1,5[ml] de muestra a analizar, debido a que los estándares para absorción atómica (AA) son preparados con ácido nítrico 5% y a que éste evita la precipitación de los iones de la solución.

La medición de la cantidad de fósforo se realiza mediante un protocolo de medición de fosfatos que utiliza una serie de reactivos que colorean la solución, la cual se cuantifica mediante espectroscopía UV/visible (Ver anexo 1).

## **2.5. Mediciones externas**

### **Plasma acoplado inductivamente (Inductively Coupled Plasma - ICP):**

Ensayo destructivo. Se entregó alrededor de 0,5[g] de muestra por cada muestra a analizar al Departamento de Geología de la Universidad de Chile, que realizó las pruebas.

### **Difracción de rayos X (DRX):**

Ensayo no destructivo. Se entregó alrededor de 0,2[g] de muestra por cada muestra a analizar al Laboratorio de Difracción del Departamento de Física de la Universidad de Chile, que realizó las pruebas.

### **Análisis de área superficial Brunauer-Emmett-Teller (BET):**

Ensayo no destructivo. Se entregó alrededor de 1[g] de muestra por cada muestra a analizar al Laboratorio de Catálisis, perteneciente al Departamento de Ciencia de los Materiales de la Universidad de Chile, que realizó las pruebas.

### **Granulometría Láser:**

Ensayo destructivo. Se utilizó alrededor de 0,2[g] de muestra por cada muestra a analizar en un granulómetro láser perteneciente al laboratorio de sedimentología del Departamento de Geología de la Universidad de Chile.

### 3. Resultados y discusión

#### 3.1. Caracterización de los materiales sintetizados

##### 3.1.1. ICP

Tabla 4: Porcentajes en peso de Si, Ca, P, Cu y Ag medidos por ICP, de los biomateriales sintetizados.

Material	Si %	Ca %	P %	Cu %	Ag %
<b>BG</b>	29,5	17,4	3,6	-	-
<b>AgBG(1)</b>	(29,1)	17,8	n/d	-	11,6
<b>AgBG(2)</b>	-	17,7	n/d	-	24,4
<b>CuBG(1)</b>	(29,0)	18,6	2,3	5,1	-
<b>CuBG(2)</b>	-	17,5	4,8	10,7	-

Los valores entre paréntesis ( ) provienen de un análisis previo a muestras similares y no corresponden necesariamente a las muestras utilizadas.

Considerando las composiciones propuestas y los porcentajes molares utilizados en el cálculo de la síntesis de los compuestos, los porcentajes en peso esperados corresponden a los presentados en la Tabla 5.

Tabla 5: Porcentajes en peso de Si, Ca, P, Cu y Ag calculados para los biomateriales sintetizados.

Nombre	Composición	Si %	Ca %	P %	Cu %	Ag %
<b>BG</b>	SiO <sub>2</sub> - P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> - CaO	27	15	9	-	-
<b>AgBG(1)</b>	SiO <sub>2</sub> - P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> - CaO - Ag <sub>2</sub> O	25	15	4	-	15
<b>AgBG(2)</b>	SiO <sub>2</sub> - P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> - CaO - Ag <sub>2</sub> O	21	13	4	-	27
<b>CuBG(1)</b>	SiO <sub>2</sub> - P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> - CaO - CuO	28	16	5	5	-
<b>CuBG(2)</b>	SiO <sub>2</sub> - P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> - CaO - CuO	25	16	5	10	-

Se puede apreciar en la tabla 4 los resultados del análisis de composición por ICP, en ella los valores obtenidos están dentro de los rangos esperados, según lo presentado en la Tabla 5, la cual corresponde a los valores teóricos según las concentraciones usadas en la síntesis. Las diferencias entre los valores esperados y los obtenidos pueden deberse a que los elementos no son añadidos a la red polimérica en el estado de oxidación mencionado en la síntesis y con lo cual fue calculada la Tabla 5, lo que variaría, por ejemplo, la

proporción de oxígeno en el material y por tanto los resultados esperados no serían completamente representativos.

Los porcentajes de fósforo son los que más difieren de lo esperado, debido a que la medición de éste es afectada por una interferencia producto de los iones metálicos, principalmente para el caso de la plata, donde no se puede determinar si quiera un valor referencial.

Por otro lado, en la Tabla 4, se aprecia que los porcentajes de cobre y plata obtenidos son muy similares a los esperados y que el material AgBG(2) tiene aproximadamente el doble de plata que AgBG(1), así como también el material CuBG(2) tiene aproximadamente el doble de cobre que CuBG(1), según lo proyectado en la síntesis. Esto demuestra la versatilidad de la técnica y en particular, su capacidad de controlar la incorporación de los metales cobre y plata en un sistema de cuatro componentes.

También cabe mencionar que el porcentaje másico de plata es el doble del de cobre entre los materiales AgBG(1) y CuBG(1), así como entre AgBG(2) y CuBG(2). Esto es debido a que los porcentajes fueron ideados en base a moles y el peso atómico de la plata es del doble que el del cobre, lo que valida la síntesis, ya que significa que no sólo se es capaz de controlar la proporción de un determinado metal dentro del vidrio, si no que también la proporción entre los distintos metales adicionados a distintos materiales, lo que implica que la incorporación efectiva responde a la calculada.

### **3.1.2. Difracción de rayos x (DRX)**

A los materiales sintetizados (AgBG(1), AgBG(2), CuBG(1), CuBG(2) y BG), se les realizó un ensayo de difracción de rayos X, mostrado en el Gráfico 1. Éste muestra una estructura completamente amorfa para BG, correspondiente a lo esperado, con una leve tendencia a desarrollar un peak de  $\text{Ca}_2(\text{SiO}_4)$ . En cuanto a AgBG(1) y AgBG(2), es posible apreciar una serie de “peaks” bien definidos, que corresponden principalmente a formas cristalinas de Ag. Si bien no se esperaba que la plata se uniera de esta manera a la red de sílica, esto no quiere decir que no esté presente en su estado oxidado dentro de la red amorfa. Por otro lado para los compuestos con cobre CuBG(1) y CuBG(2), no es

posible apreciar ningún peak definido, siendo principalmente amorfo. Sin embargo, existen unas tendencias en  $2\theta \approx 35$  y  $2\theta \approx 39$ , que podrían corresponder a CuO, según lo esperado.

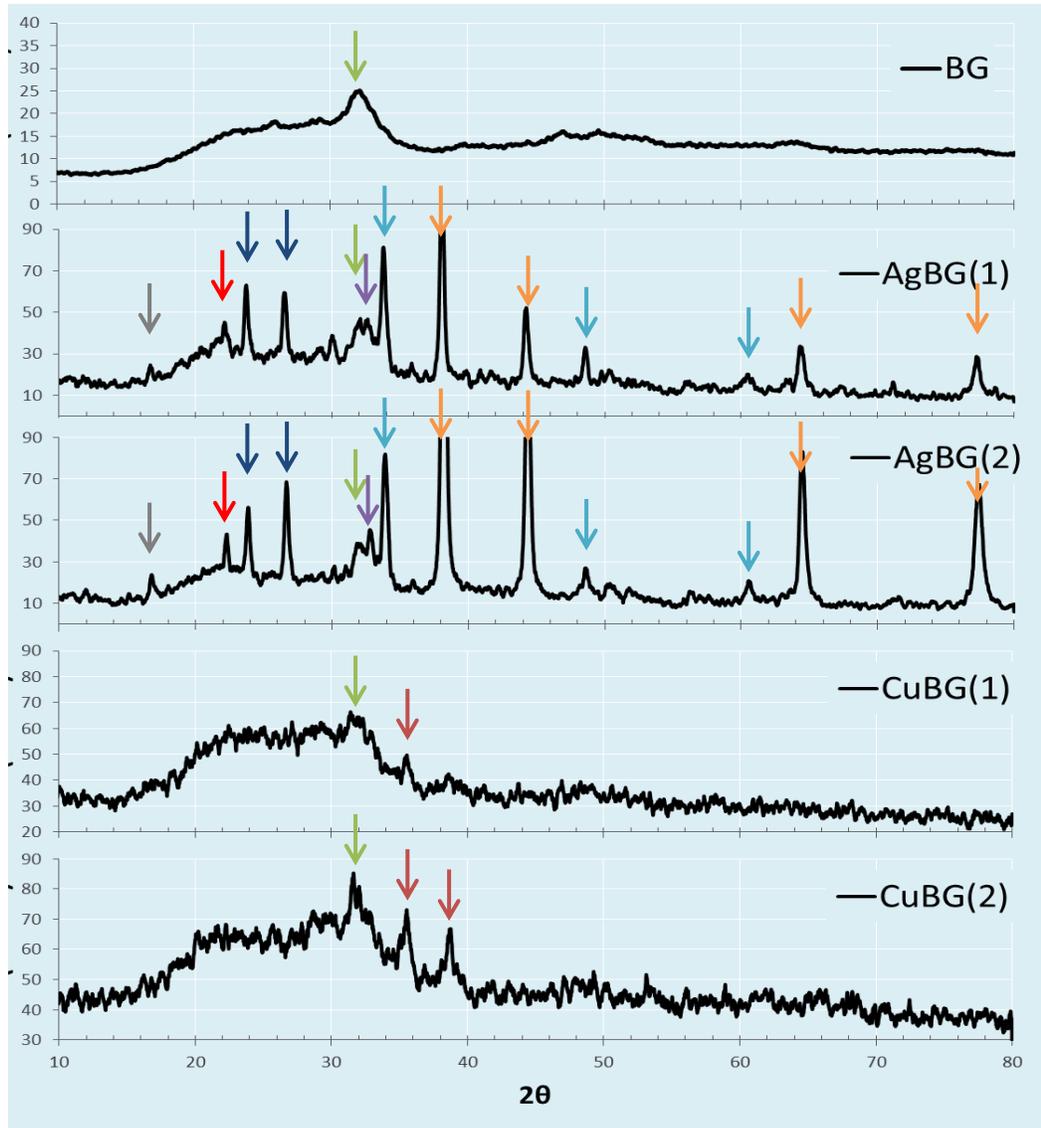


Gráfico 1: Difracción de rayos x de los biomateriales.

Simbología:

	Ag		CuO		Ag <sub>2</sub> O		SiO <sub>2</sub>
	Ag <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>		SiP <sub>2</sub> O <sub>7</sub> /SiO <sub>2</sub> •P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>		Ca <sub>2</sub> (SiO <sub>4</sub> )		

### 3.1.3. Granulometría

Dado que la etapa final del protocolo de síntesis corresponde a la de molienda, se controla el tamaño de partícula de los distintos materiales. En el Gráfico 2, es posible apreciar la distribución de tamaño de partícula para cada uno de los biomateriales sintetizados.

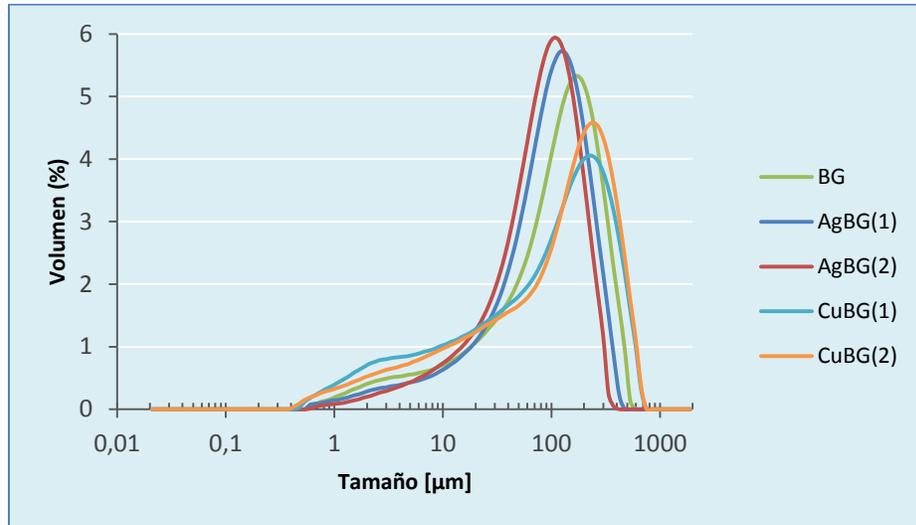


Gráfico 2: Distribución de tamaño de partícula de los biomateriales molidos: AgBG(1), AgBG(2), CuBG(1), CuBG(2) y BG.

Las distribuciones obtenidas muestran una molienda que tiende a la homogeneidad, dado que el peak de distribución de tamaño de cada muestra tiende a ser angosto y alto. No se aprecia gran diferencias entre muestras de la misma especie, es decir, entre AgBG(1) y AgBG(2) o entre CuBG(1) y CuBG(2), y la diferencia obtenida entre las muestras de distintas especies no es considerable, teniendo un d50 promedio para todas las especies de 104,31 [µm] (Tabla 6) con una desviación estándar de 16,4 [µm]. Estos valores permiten considerar que en los ensayos posteriores que se hagan, en especial en los biológicos, las diferencias no se deben al tamaño de partícula, si no que a la naturaleza química de cada material.

Tabla 6: Máximos diámetros de partículas para el 10, 50 y 90% de volumen acumulado de los biomateriales molidos.

Material	d10% [ $\mu\text{m}$ ]	d50% [ $\mu\text{m}$ ]	d90% [ $\mu\text{m}$ ]
<b>BG</b>	10,01	114,59	294,20
<b>AgBG(1)</b>	14,40	95,19	231,60
<b>AgBG(2)</b>	14,99	82,90	194,84
<b>CuBG(1)</b>	4,23	103,90	366,47
<b>CuBG(2)</b>	5,70	124,95	381,39

### 3.1.4. Área específica (BET)

#### Reporte de área superficial BET:

- *BET Surface Area:*  $264.4 \pm 0.8708$  [ $\text{m}^2/\text{g}$ ]
- *Slope:*  $0.016228 \pm 0.000054$
- *Y-Intercept:*  $0.000240 \pm 0.000007$
- *C:* 68.655712
- *VM:* 60.725788 [ $\text{cm}^2/\text{g STP}$ ]
- *Correlation Coefficient:* 9.999835e-01
- *Molecular Cross-section:* 0.1620 [ $\text{nm}^2$ ]

Una de las ventajas de la síntesis de biomateriales por el método sol-gel con respecto a los otros, es la alta área superficial que se puede lograr, que varía entre 70 y 600 [ $\text{m}^2/\text{g}$ ]. Siendo la del material BG de 264,4 [ $\text{m}^2/\text{g}$ ], más de tres veces superior a la presentada en la literatura con un protocolo similar de síntesis. Una mayor área superficial implica una mayor superficie para el intercambio de iones con el medio ambiente, así como una gran porosidad, que facilita la osteogénesis y osteoconducción, esto es, la biocompatibilidad. Por otro lado, amplios poros permiten que factores biológicos, como enzimas y proteínas, actúen dentro del material, favoreciendo aún más la biocompatibilidad.

### 3.2. Ensayo de lixiviación

#### 3.2.1. Lixiviación en agua desionizada

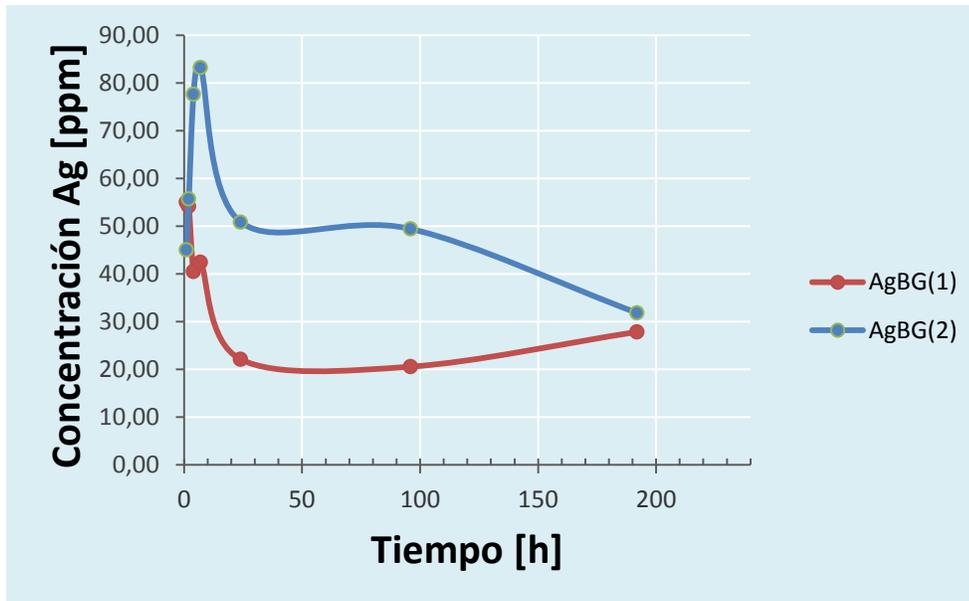


Gráfico 3: Lixiviación de Ag en agua desionizada, para AgBG(1) y AgBG(2).

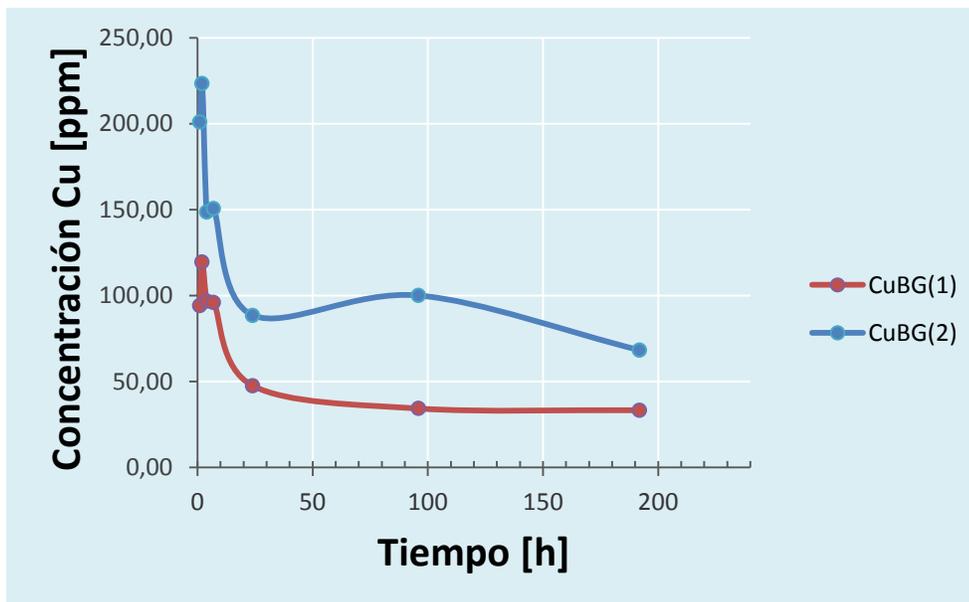


Gráfico 4: Lixiviación de Cu en agua desionizada, para CuBG(1) y CuBG(2).

### 3.2.2. Lixiviación en SBF

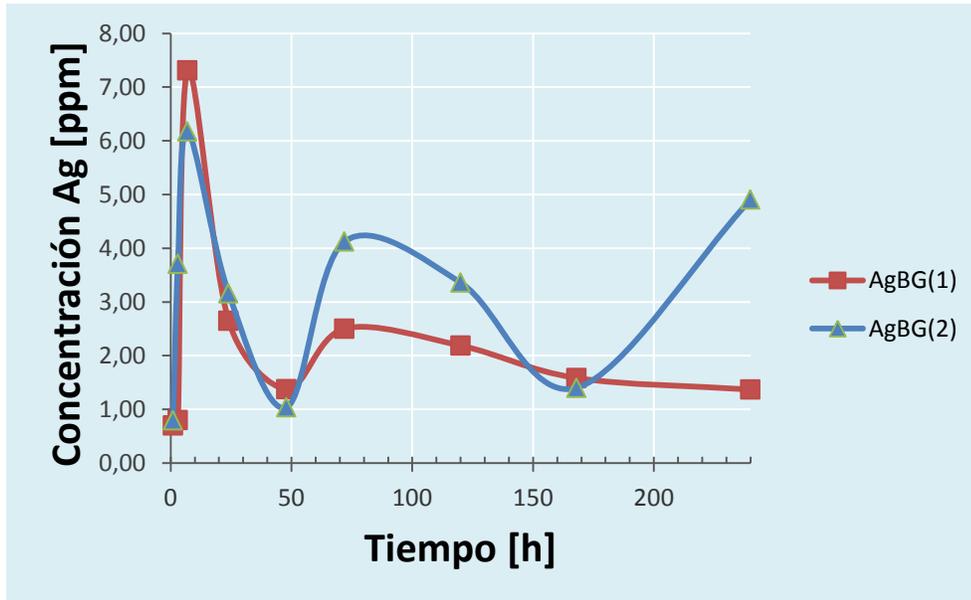


Gráfico 5: Lixiviación de Ag en SBF, para AgBG(1) y AgBG(2).

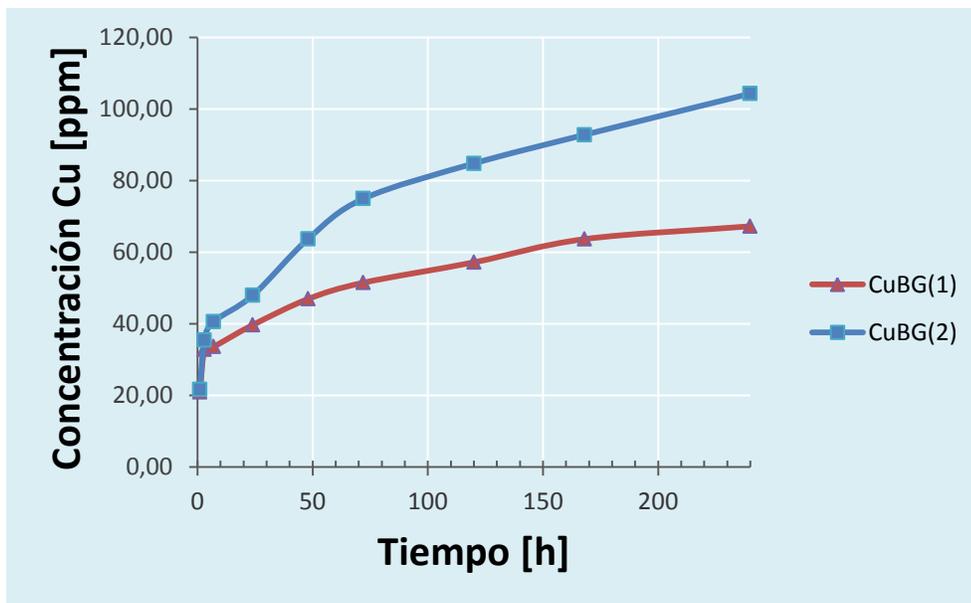


Gráfico 6: Lixiviación de Cu en SBF, para CuBG(1) y CuBG(2).

Los ensayos de lixiviación, presentados en los gráficos 3, 4, 5 y 6 muestran una diferencia en la liberación de cobre o plata entre CuBG(1) y CuBG(2) y entre AgBG(1) y

AgBG(2), según lo esperado, donde los materiales con mayor incorporación de metales, tienen una liberación mayor. Además se puede ver una tendencia a estabilizarse las concentraciones de los iones en solución para el caso de la liberación en agua desionizada (Gráficos 3 y 4), llegando AgBG(1,2) a alrededor de 30 [ppm] y CuBG(1,2) a alrededor de 50 [ppm]. Esta tendencia puede deberse a una saturación de los iones en solución y a una precipitación del exceso, así como también debido a la acción de algún contaminante presente, como la presencia de cloruros en la lixiviación de plata, lo cuales reaccionan con los iones de plata precipitando rápidamente.

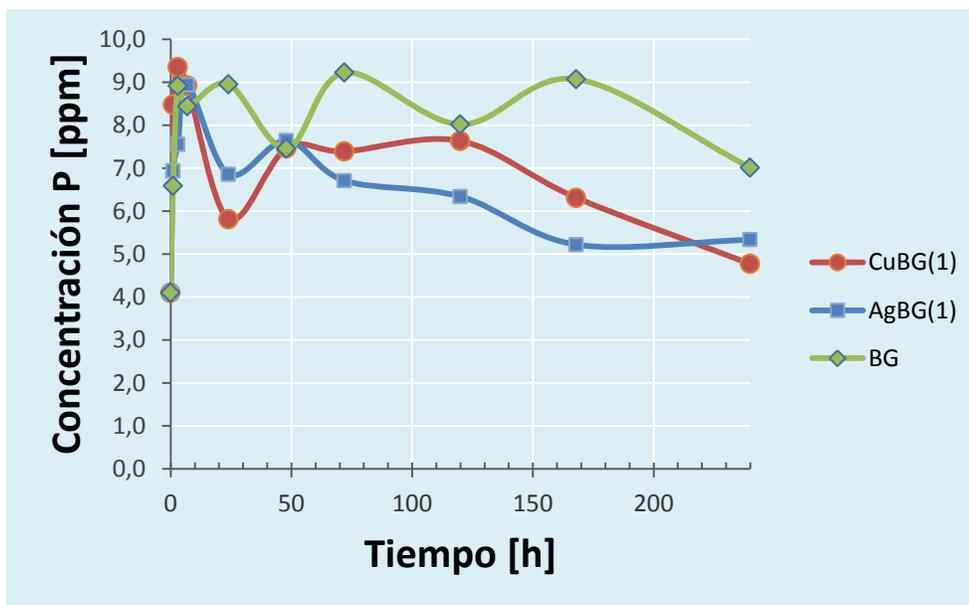


Gráfico 7: Lixiviación de P en SBF, para BG, AgBG(1) y CuBG(1).

Además para el caso de liberación de fosfatos, presentado en el Gráfico 7, tampoco se aprecia una diferencia considerable entre AgBG(1), CuBG(1) y BG, de lo que se deduce que la incorporación de metales no afecta significativamente la liberación de iones y por tanto no debiera influir en biocompatibilidad de los materiales, al menos en las proporciones estudiadas.

Cabe mencionar el hecho que, salvo en la liberación de cobre, las tendencias de liberación son cíclicas, reflejando ciclos de adsorción y desorción mientras el material se va lixiviando. En cuanto a la aparente contradicción de las tendencias presentadas en la

liberación de cobre en los Gráficos 4 y 6, ésta puede explicarse principalmente a errores metodológicos en el proceso de toma de muestras, dado que el cobre pudo haber precipitado en el caso de la lixiviación en agua desionizada y no se tomó la precaución de aplicar ultrasonido antes de cada muestreo, consideración que sí se tuvo en el caso de la lixiviación en SBF, es por esto que se repetirá el análisis. Sin embargo, al cabo de 1 hora, en ambos medios se presenta una liberación similar, en torno a los 18 [ppm].

Adicionalmente se estudió a posibilidad que los biomateriales sintetizados absorbieran los iones presentes en la solución. Para esto se realizó un ensayo homólogo al de lixiviación cambiando el material a lixiviar por BG y la solución lixivante por un estándar de Plata de 50 [ppm] en un caso y por un estándar de cobre de 50 [ppm] en otro (Gráfico 8).

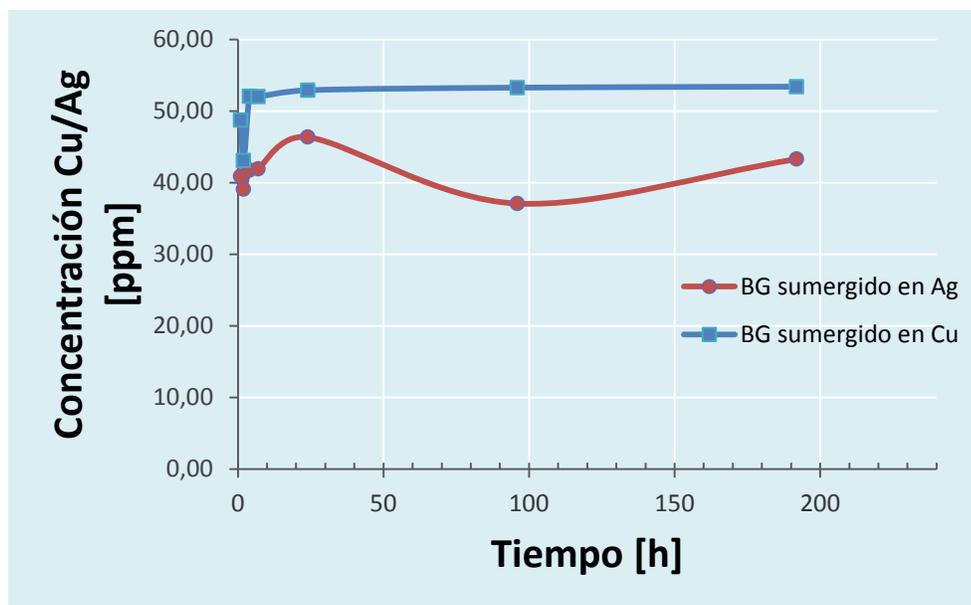


Gráfico 8: Concentración de Ag y Cu en contacto con BG en el tiempo.

En este gráfico se puede apreciar que las concentraciones de los respectivos iones se mantienen relativamente constante en el tiempo y por lo tanto se desprecia la capacidad de los biomateriales para absorber éstos iones en solución. Se asume que las diferencias con respecto al valor nominal de 50 [ppm] es debido a una mala elaboración de los estándares iniciales.

### 3.3. Ensayo de biocompatibilidad

La biocompatibilidad fue estudiada analizando el crecimiento de una capa de hidroxiapatita (HA) en la superficie del biomaterial, luego de ser sumergido 10 días en SBF. Esta capa se pretendió medir utilizando difracción de rayos X, sobre el material filtrado al cabo de los 10 días.

En el Gráfico 9 se muestra que AgBG(1,2) mantienen sus *peaks* principales de Ag, pero desaparecen otros en la región  $2\theta = 20 - 35$  y aparecen una serie de otros nuevos. Este cambio en las señales en el difractograma se puede deber a una combinación de factores, por una parte la disolución del material y por otra el crecimiento de una capa de HA amorfa o de otros minerales, en la superficie del material.

Las nuevas señales que aparecen en la DRX de AgBG(1,2) corresponden a HA, AgCl y CaCO<sub>3</sub>. En particular, el *peak* correspondiente a un cloruro de plata (AgCl), puede ser producto de que una vez liberada la plata al sistema, ésta reacciona inmediatamente con los cloruros presentes en el SBF y es capaz de adsorberse nuevamente en la superficie. En cuanto a las señales que desaparecen, éstas corresponden a difosfato de silicio y a las formas oxidadas de la plata Ag<sub>2</sub>O y Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, debido a la disolución del material, caso que no se presenta para Ag.

Por otro lado BG, CuBG(1) y CuBG(2) mantienen su carácter de amorfo, con una tendencia a desarrollar *peaks* correspondientes a HA. Cabe mencionar que los *peaks* correspondientes a HA son muy similares a los de Ca<sub>2</sub>(SiO<sub>4</sub>), produciendo una posibilidad de error en la identificación de los *peaks*.

Existe una clara tendencia a formar HA y por lo tanto el material cumpliría las condiciones reportadas en la literatura, especialmente por Kokubo et al. para ser biocompatible.

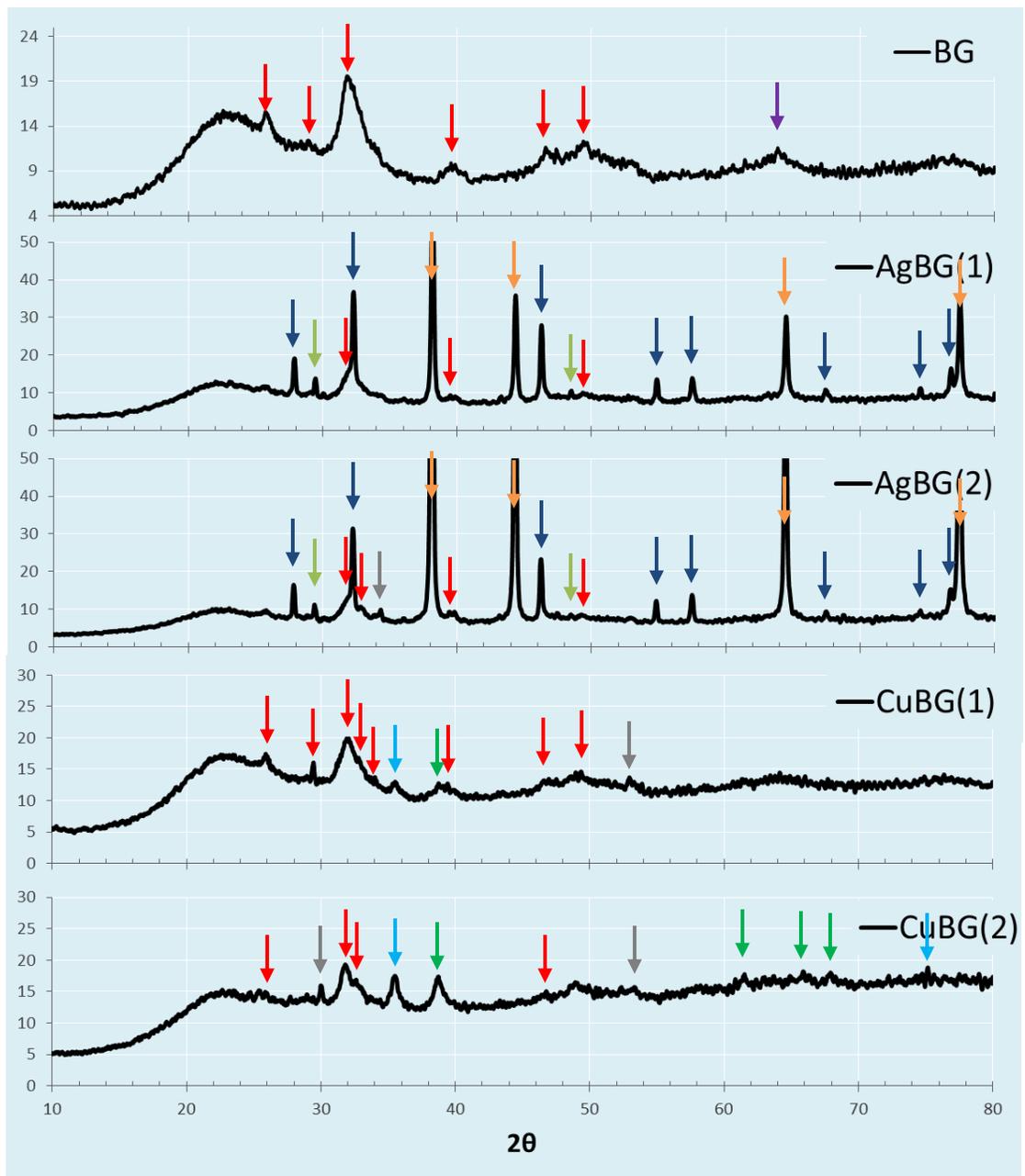


Gráfico 9: Difracción de rayos x de los biomateriales sumergidos en SBF.

Simbología:

<span style="color: red;">■</span>	Hidroxiapatita - $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	<span style="color: purple;">■</span>	$\text{SiO}_2$	<span style="color: darkblue;">■</span>	AgCl	<span style="color: orange;">■</span>	Ag
<span style="color: green;">■</span>	$\text{CaCO}_3$	<span style="color: grey;">■</span>	Indeterminado	<span style="color: lightblue;">■</span>	$\text{Cu}_4\text{O}_3$	<span style="color: green;">■</span>	CuO

### 3.4. Concentración mínima bactericida (CMB)

Luego de analizar varias concentraciones para los distintos biomateriales se obtuvieron los siguientes rangos de valores de concentración mínima bactericida.

#### 3.4.1. Escherichia coli

Tabla 7: Concentración mínima bactericida para *E. coli* de los distintos materiales.

Material	CMB [mg/mL] (ensayo en 24 h)	CMB [mg/mL] (ensayo en 48 h)
<b>BG</b>	> 300	No ensayado
<b>AgBG(1)</b>	1 – 5	0,3 – 0,5
<b>AgBG(2)</b>	1 – 5	0,3 – 0,5
<b>CuBG(1)</b>	100 – 150	5 – 10
<b>CuBG(2)</b>	100 – 150	5 – 10

#### 3.4.2. Streptococcus mutans

Tabla 8: Concentración mínima bactericida para *S. mutans* de los distintos materiales.

Material	CMB [mg/mL] (ensayo en 48 h)
<b>BG</b>	No ensayado
<b>AgBG(1)</b>	0,5 – 2
<b>AgBG(2)</b>	0,5 – 2
<b>CuBG(1)</b>	5 – 10
<b>CuBG(2)</b>	5 – 10

Nota: Los ensayos para cada material fueron hechos en duplicado, obteniéndose lo mismo en ambos casos, validando los resultados.

El estudio de la capacidad antibacterial de los materiales sintetizados se realizó en las cepas de *E. coli* LH5a resistente a ampicilina, bacteria Gram-negativo no patógena y en una cepa clínica de *S. mutans*, Gram-positivo, mediante el ensayo de la concentración mínima bactericida, que corresponde a la concentración mínima del biomaterial capaz de matar a cada una de estas cepas bacterianas.

En primera instancia se evaluó la capacidad bactericida de los biovidrios sintetizados luego de un ciclo de 24 horas de exposición al medio de cultivo con bacterias *E. coli*,

dado que el período de crecimiento de la cepa es de 24 horas. Aquí se reveló que tanto los materiales con incorporación de plata AgBG(1,2) como los con incorporación de cobre CuBG(1,2) adquirieron propiedades antibacteriales, mientras que BG, que no tiene incorporación de metales, no presentó propiedades antibacteriales en el rango estudiado. En este estudio de 24 horas, AgBG(1,2) mostró tener una capacidad antimicrobial muy superior a la de CuBG(1,2), aproximadamente 50 veces mejor, esto es, que requiere 50 veces menos material para lograr el mismo efecto sobre *E. coli*. Según lo reportado en la literatura, la plata tiene un mayor efecto antimicrobial con cepas de *E. coli*, por lo que el resultado mantiene la tendencia, sin embargo, la diferencia obtenida aquí es significativa.

Para analizar el efecto del tiempo, se realizó un ensayo en 48 horas, que corresponde al mismo procedimiento que el ensayo previo, con la salvedad que en este caso los biomateriales a analizar están 24 horas en contacto con el medio de cultivo, previo a la inoculación de bacterias y luego otras 24 horas en contacto con el medio de cultivo con las bacterias ya inoculadas, de manera que el material está en contacto con el medio 48 horas. En este caso, ambos tipos de materiales mejoraron su efecto bactericida, manteniéndose la tendencia reportada y la misma obtenida, de una mayor eficacia de los materiales con plata versus los con cobre, sin embargo, la diferencia obtenida se redujo, siendo aproximadamente 18 veces mejor AgBG(1,2) que CuBG(1,2). Esto se podría explicar por la cinética bactericida del cobre, la cual podría ser más lenta que la de la plata.

Las tendencias de liberación de cobre y plata en SBF presentadas corresponden a lo observado en los ensayos microbiológicos, ya que se muestra una tendencia a permanecer constante la liberación de plata, mientras que la tendencia del cobre es a aumentar con el tiempo, lo que explicaría el por qué, en el ensayo de CMB en *E. coli* de 48 horas, el cobre mejora mucho más que la plata. Siendo así, se presume que en un estudio de 72 horas esta diferencia bajaría aún más.

Por otro lado, considerando que la liberación en agua desionizada no presenta la misma tendencia y que una mayor liberación de iones metálicos de los materiales AgBG(2) y CuBG(2) no parece afectar la concentración mínima inhibitoria con respecto a AgBG(1) y CuBG(1), se podría suponer que el factor limitante de la actividad bactericida

no corresponde a la concentración de iones en el medio, sino a una cinética bactericida del cobre más lenta que la de la plata.

Por otro lado, en cuanto al estudio en *S. mutans*, las CMB son similares a las presentadas en *E. coli* en 48 horas y se ve una mejor acción de AgBG(1,2) con respecto a CuBG(1,2).

Actualmente la búsqueda de nuevos biomateriales está enfocada en aplicaciones clínicas y específicamente a la búsqueda de materiales biocompatibles bactericidas, con el objetivo disminuir las infecciones relacionadas a los implantes de biomateriales y eliminar las cirugías de inspección, asegurando que el implante no genere infecciones *in-situ* una vez implantado. Por lo tanto, el resultado que la eficiencia tienda a igualarse con el paso del tiempo, es decir, que la liberación de iones de cobre y plata continúe en el tiempo, es un resultado que apunta en la dirección correcta, ya que el efecto antibacterial se debería mantener y mejorar con el tiempo.

Es interesante destacar que, en ninguno de los casos estudiados la CMB mostró alguna diferencia con respecto a la cantidad de metal incorporada dentro de un mismo tipo de material. AgBG(1) tiene igual acción antibacterial que AgBG(2), así como CuBG(1) con CuBG(2), resultado que no se correlaciona con las cinéticas de liberación de iones metálicos obtenida para el rango de tiempo estudiado, donde existen claras diferencias en las liberaciones entre uno y otro material, para un mismo metal (Gráficos 3, 4, 5 y 6). Esto puede deberse a un exceso de liberación del agente bactericida en el medio, dominando la capacidad bactericida el mecanismo propio de cada metal, en vez de la concentración de éste, ya sea en el caso de un 5% como en el de un 10% molar, lo que llevaría a una posibilidad de crear nuevos materiales con una capacidad antibacterial similar y con menos gasto de metales.

## 4. Conclusiones

Es posible sintetizar biomateriales de tres y cuatro componentes mediante la técnica sol-gel, en los sistemas  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ ,  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-Ag}_2\text{O}$  y  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-CuO}$ . Además es posible controlar la incorporación de metales Ag y Cu en los sistemas cuaternarios, con el procedimiento descrito. Los materiales sintetizados presentan las proporciones elementales deseadas, son principalmente amorfos y poseen una alta área superficial.

Pese a que el procedimiento utilizado en la síntesis de los biovidrios es un proceso *batch* y demora 16 días en realizarse, mostró ser reproducible y confiable a la hora de realizar modificaciones.

La incorporación de cobre y plata en la síntesis, otorgó una capacidad bactericida a los biovidrios, que no se presenta en la ausencia de éstos. Ésta capacidad es mayor en el caso de AgBG con respecto a CuBG, sin embargo, en el mediano plazo ésta diferencia tiende a disminuir y posiblemente en el largo plazo tienda a volverse sin importancia.

El material demostró ser biocompatible *in-vitro*, ya que luego de ser sumergido en SBF (*Simulated Body Fluid*) presentó un desarrollo de una capa de hidroxiapatita en su superficie, lo que, según con lo reportado en la literatura, se correlaciona directamente con la biocompatibilidad.

Por todo esto y sumado al hecho que el cobre es aproximadamente diez veces más barato que la plata, se recomienda continuar con el estudio de la incorporación de cobre en biomateriales para otorgar propiedades antibacteriales.

## 5. Bibliografía

- [1] Second Consensus Conference on Definitions in Biomaterials, Chester, UK, 1992.
- [2] Marta Giulia Cerruti. Characterization of bioactive glasses. Effect of the immersion in solutions that simulates body fluids. Ph.D. Thesis. University of Turin, Department of Chemistry IFM. 2004. 228p.
- [3] Proussaefs P, Lozada J. Evaluation of two Vitallium blade-form implants retrieved after 13 to 21 years of function: A clinical report. *J. Prosthet. Dent.* 2002; 87: 412-415.
- [4] Hench LL. Biomaterials: a forecast for the future. *Biomaterials* 1998; 19: 1419-1423.
- [5] Hench LL, Ethridge, EC. *Biomaterials: An Interfacial Approach*. Academic Press, New York, 1982.
- [6] Hench LL. Bioactive ceramics: theory and clinical applications. *Bioceramics*. 1994;7; 3-14.
- [7] Hench LL. Bioceramics: From concept to clinic. *J. Am. Ceram. Soc.* 1991; 74:1487-1510.
- [8] Hulbert, SF. In: *An introduction to Bioceramics*. Hench LL, Wilson J, editors. World Scientific Publishing CO, London-Singapore, 1993, p.25-40.
- [9] Hench LL, Splinter, RJ, Allen WC, Greenlee TK. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *J. Biomed. Mater. Res. Symp.* 1971; 2 (Part I): 117–141.
- [10] Wilson J, Nolletti D. In *Handbook of Bioactive Ceramics*. Yamamuro T, Hench LL, Wilson J Editors. CRC Press, Boca Raton, FL. 1990: 283.
- [11] Hench LL. In *Bioceramics: Materials characteristics versus in-vivo behavior*. *Annals of New York Acad. Sci.* New York 1998; 523: 54.
- [12] Rho J, Kuhn-Spearing L, Zioupos P. Mechanical Properties and the Hierarchical Structure of Bone.
- [13] Spence A. *Basic Medical Anatomy*. Benjamin/Cummings 1990.
- [14] Black J. *Biological Performance of Materials: Fundamentals of Biocompatibility*. Marcel Dekker, New York, 1992.
- [15] Van Lenthe GH, Willems MMM, Verdonschot N, de Waal Malefijt MC, Huiskes R. Stemmed femoral knee prostheses. Effects of prosthetic design and fixation on bone loss. *Acta Orthop Scand* 2002; 73: 630–637.
- [16] Van Lenthe GH, Waal Malefijt MC, Huiskes R. Stress shielding after total knee replacement may cause bone resorption in the distal femur. *J Bone Joint Surg (Br)* 1997; 79: 117-22.
- [17] Ramakrishna S, Mayer J, Wintermantel E, Leong WK. Biomedical applications of polymercomposite materials: a review. *Compos. Sci. Technol.* 2001; 61: 1189-1224.
- [18] Carlisle EM. In: *Silicon Biochemistry*. Wiley, New York, 1986. p. 123-136.

- [19] Schwartz K. In: Biochemistry of silicon and related problems. Editors: G Bendz, I Lindqvist. Plenum Press. New York. 1978, pp. 207-230.
- [20] El cuerpo humano. Los dientes. Introducción a las ciencias de la salud. [artículo de internet] <http://www.juntadeandalucia.es/averroes/~29701428/salud/dientes.htm> [consulta: 30 Abril de 2012].
- [21] Preston JD. "Properties in Dental Ceramics", in Proceedings of the IV Int. Symp. on Dental Materials. Quintessa Pub. CO, Chicago, 1988.
- [22] Hench LL, Wilson J. An introduction to Bioceramics. World Scientific Publishing CO, London-Singapore, 1993, p.2.
- [23] Mejía Gómez, D. C. Injerto óseo a base de espuma de hidroxiapatita. Medellín, 2007. 126p. Trabajo de grado (Ingeniería de Diseño). Universidad EAFIT. [artículo de internet] <http://bdigital.eafit.edu.co:8080/bdng/bdigital/PROYECTO/P620.0042CDM516I/P620.0042CDM516I.xml> [consulta: 25 Noviembre de 2010].
- [24] Kokubo T, Kushitani H, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W. J. Biomed. Mater. Res. 1990; 24: 721-34.
- [25] Tadashi Kokubo, Hiroaki Takadama. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?. Biomaterials. 27. 2006. 2907-2915. ISSN 0142-9612, 10.1016/j.biomaterials.2006.01.017.
- [26] Li R. Sol-gel processing of bioactive glass powders. Ph.D. Dissertation, University of Florida, 1991.
- [27] Li R, Clark AE, Hench LL. An investigation of bioactive glass powders by sol-gel processing. J Appl Biomater 1991;2:231-9.
- [28] Boccaccini A. R., Erol M., Stark W. J., Mohn D., Hong Z., Mano J. F. Polymer/bioactive glass nanocomposites for biomedical applications: A review. Composites Science and Technology. 70. 13, ICCM-17: Composites In Biomedical Applications. 2010. 1764-1776. ISSN 0266-3538.
- [29] Sepulveda P, Jones JR, Hench LL. Characterization of melt-derived 45S5 and sol-gel-derived 58S bioactive glasses. J Biomed Mater Res 2001;58(6):734-40.
- [30] Saravanapavan P, Jones JR, Pryce RS, Hench LL. Bioactivity of gel-glass powders in the CaO-SiO<sub>2</sub> system: a comparison with ternary (CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub>) and quaternary glasses (SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Na<sub>2</sub>O). J Biomed Mater Res A 2003;66A(1):110-9.
- [31] Oki A, Parveen B, Hossain S, Adeniji S, Donahue H. Preparation and in vitro bioactivity of zinc containing sol-gel-derived bioglass materials. J Biomed Mater Res A 2004;69A(2):216-21.
- [32] Vallet-Regi M, Salinas AJ, Roman J, Gil M. Effect of magnesium content on the in vitro bioactivity of CaO-MgO-SiO<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> sol-gel glasses. J Mater Chem 1999;9(2):515-8.

- [33] Liu X, Huang W, Fu H, Yao A, Wang D, Pan H, et al. Bioactive borosilicate glass scaffolds: in vitro degradation and bioactivity behaviours. *J Mater Sci Mater Med* 2009;20:1237–43.
- [34] Lao J, Nedelec JM, Jallot E. New strontium-based bioactive glasses: physicochemical reactivity and delivering capability of biologically active dissolution products. *J Mater Chem* 2009;19:2940–9.
- [35] Varanasi VG, Saiz E, Loomer PM, Ancheta B, Uritani N, Ho SP, et al. Enhanced osteocalcin expression by osteoblast-like cells (MC3T3-E1) exposed to bioactive coating glass (SiO<sub>2</sub>–CaO–P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>–MgO–K<sub>2</sub>O–Na<sub>2</sub>O system) ions. *Acta Biomater* 2009;5:3536–47.
- [36] Balamurugan A., Balossier G., Laurent-Maquin D., Pina S., Rebelo A.H.S., Faure J., Ferreira J.M.F.. An in vitro biological and anti-bacterial study on a sol-gel derived silver-incorporated bioglass system. *Dental Materials*, 24, 10. 2008. 1343-1351, ISSN 0109-5641
- [37] Ruparelia J. P., Chatterjee A. K., Duttagupta S. P., Mukherji S.. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Acta Biomaterialia*, 4, 3. 2008. 707-716, ISSN 1742-7061.
- [38] Varmette E. A., Nowalk J. R., Flick L. M., Hall M. M.. Abrogation of the inflammatory response in LPS-stimulated RAW 264.7 murine macrophages by Zn- and Cu-doped bioactive sol-gel glasses. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 90A, 2. 317–325. 2009.
- [39] Cioffi N et al. Copper nanoparticle/polymer composites with antifungal and bacteriostatic properties. *Chem Mater* 2005;17:5255–62.
- [40] Boccaccini A. R., Erol M., Stark W. J., Mohn D., Hong Z., Mano J. F. Polymer/bioactive glass nanocomposites for biomedical applications: A review. *Composites Science and Technology*. 70, 13. ICCM-17: Composites In Biomedical Applications. 2010. 1764-1776. ISSN 0266-3538.
- [41] Quintero F, Pou J, Comesana R, Lusquinos F, Riveiro A, Mann AB, et al. Laser spinning of bioactive glass nanofibers. *Adv Funct Mater* 2009;19:1–7.
- [42] Sol-Gel Chemistry [artículo de internet] <http://www.psrc.usm.edu/mauritz/solgel.html> [consulta: 30 Noviembre de 2010].
- [43] Hong Z, Merino EG, Reis RL, Mano JF. Novel rice-shaped bioactive glass ceramic nanoparticles. *Adv Eng Mater* 2009; 11(15):B25–9.
- [44] Balamurugan A., Balossier G., Laurent-Maquin D., Pina S., Rebelo A.H.S., Faure J., Ferreira J.M.F. An in vitro biological and anti-bacterial study on a sol-gel derived silver-incorporated bioglass system, *Dental Materials*, 24, 10. 2008. 1343-1351.
- [45] Jung W.K., Koo H.C., Kim K.W., Shin S., Kim S.H., Park Y.H.. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Appl. Env. Microbiol.*, 74 (7) (2008), pp. 2171–2178.
- [46] Borkow G., Gabbay J. Copper as a biocidal tool. *Current medical chemistry*, 2005, 12, 2163 – 2175.

- [47]Gottenbos B., van der Mei H. C., Klatter F., Grijpma D. W., Feijen J., Nieuwenhuis P., Busscher H. J. Positively charged biomaterials exert antimicrobial effects on gram-negative bacilli in rats, *Biomaterials*, 24, 16. 2003. 2707-2710.
- [48]Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999;284:1318–22.
- [49]Crémet L., Corvec S., Bémer P., Bret L., Lebrun C., Lesimple B., Miegerville A. F., Reynaud A., Lepelletier D., Caroff N. Orthopaedic-implant infections by *Escherichia coli*: Molecular and phenotypic analysis of the causative strains, *Journal of Infection*, 64, 2. 2012. 169-175.
- [50]Baca P., Castillo A.M., Baca A.P., Liébana M.J., Junco P., Liébana J. Genotypes of *Streptococcus mutans* in saliva versus dental plaque, *Archives of Oral Biology*, 53, 8. 2008. 751-754.

## 6. Anexos

### 6.1. Determinación de Fosfatos

#### Principio:

El fosfato de naturaleza inorgánica presente en el material biológico, forma con el molibdato de sodio un fosfomolibdato, que por reducción, se convierte en azul de molibdeno, determinable por espectrofotometría y que es proporcional a la cantidad de fosfato inorgánico presente:

#### Materiales:

- Espectrofotómetro
- Pipetas de 1 [ml] graduadas al 0,1.
- Pipetas de 2 [ml].
- Reloj de alarma.
- Agua destilada.
- Matraces aforados de 10 [ml]

#### Reactivos:

- Reactivo 1:  
Solución Bisulfito – Borato:  $0,19 \text{ M} - 5,2 \times 10^{-2} \text{ M}$ .
- Reactivo 2:  
Solución Molibdato de Sodio – Ácido Sulfúrico:  $0,1 \text{ M} - 2,6 \text{ N}$ .
- Reactivo 3:  
Solución Reductora (Sulfato P-Metilaminofenol) – Bisulfito:  $2,9 \times 10^{-2} \text{ M} - 0,32 \text{ M}$ .
- Reactivo 4:  
Solución Sulfito – Carbonato (Desproteinizadora):  $5,5 \times 10^{-2} \text{ M} - 0,4 \text{ M}$ .
- Reactivo 5:  
Solución Patrón Fosfato:  $5 \text{ mg P}/100 \text{ ml}$  solución.

#### Curva de Calibración:

- a) Marque 5 matraces aforados de 10 [ml] según la siguiente tabla y agregue a cada uno de ellos los reactivos correspondientes y en el orden determinado.

Nº Matraz	Vol. Reactivo 5 [ml]
1	0
2	0,1
3	0,2
4	0,3
5	0,4

- b) Agregar a cada matraz:
  - 1 [ml] de Reactivo 1
  - 0,2 [ml] de Reactivo 2
  - 0,2 [ml] de Reactivo 3
- c) Tapar los matraces, mezclar bien y dejar reposar por 15 minutos a temperatura ambiente.
- d) Agregar a cada matraz:
  - 2 [ml] de reactivo 4.
- e) Mezclar bien, enrasar con agua a 10 [ml] y medir Absorbancia a 750 nm.
- f) Graficar concentración de P vs. Absorbancia y calcular la ecuación de la regresión lineal correspondiente.

**Medición de Muestras:**

- a) Tomar 1 [ml] de la muestra a medir y llevarlas a una matraz de 10 ml.
- b) Repetir todos los pasos de la curva de calibración a partir del punto b.