



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS Y COMUNITARIAS**

Síntesis de materiales bactericidas basados en nanopartículas metálicas y biopolímeros para terapia periodontal odontológica.

Juan Pablo González Rojas

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA**

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Cristian Covarrubias Gallardo.

TUTORES ASOCIADOS

Dr. Mauricio Bittner O.

**Santiago - Chile
2013**

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mis padres, hermana y abuelos, por su incondicional apoyo y cariño, por darme alegrías, valores, fuerza y ayudarme a mejorar en todos los aspectos de mi vida, son el pilar fundamental en mí.

A mis amigos por su apoyo, consejos, compañía y preocupación.

A mi tutor Dr. Cristian Covarrubias por su gran apoyo, preocupación y motivación en el desarrollo de esta tesis

Al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad Andrés Bello, al Dr. Bittner e Ignacio por toda la ayuda y disposición en el avance y desarrollo de esta tesis.

ÍNDICE

Resumen	1
Introducción	3
Marco teórico	9
1. Enfermedades Periodontales	9
2. <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> .	11
3. Formas de terapia periodontal	13
4. Sistemas de liberación controlada	18
5. Biopolímeros (Alginato Quitosano)	19
6. Agentes antimicrobianos inorgánicos (AgNPs y CuNPs)	21
Hipótesis y objetivos	26
Materiales y Métodos	27
1. Síntesis de nanopartículas de plata y cobre	27
2. Preparación de geles, esponjas y esferas a base de NPs/Biopolímero	28
3. Caracterización de las nanopartículas	33
4. Evaluación de las propiedades Bactericidas de los diferentes sistemas NPs/biopolímeros	35
5. Estudio preliminar de liberación controlada de Ag o Cu	35
6. Evaluación de propiedades bactericidas de los recubrimientos	34
Resultados	37
1. Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata y cobre	37
2. Preparación de geles, esponjas y esferas a base de NPs/Biopolímero	40
3. Caracterización de nanocompuestos	43
4. Evaluación de las propiedades bactericidas de los diferentes sistemas NPs/biopolímeros	45
5. Estudio preliminar de liberación controlada de Ag o Cu	49
Discusión	50
Conclusión	56
Bibliografía	58
Anexos	62

RESUMEN

Las propiedades antimicrobiales de nanopartículas metálicas tales como plata y cobre, están siendo exploradas en diferentes aplicaciones (ej. “Nanosilvers”). En este contexto existen potenciales usos odontológicos para estas propiedades (ej. “Control de Biofilm, enfermedad periodontal, periimplantitis, etc.). La enfermedad periodontal es una de las patologías infecciosas más prevalentes en la población. Las complicaciones causadas por la terapia antibiótica y el limitado control de los actuales sistemas antimicrobiales usados en la enfermedad periodontal, conlleva a la búsqueda de nuevas formas de tratamiento. Dentro de este escenario, la terapia localizada usando un sistema de nanopartículas metálicas con propiedades de liberación controlada, podría constituir una nueva alternativa para el manejo de la enfermedad periodontal.

El objetivo de este trabajo fue preparar materiales nanocompositos a base de biopolímeros dopados con nanopartículas de plata (AgNP) y cobre (CuNP), y evaluar sus propiedades de inhibición de crecimiento bacteriano frente a un patógeno representativo de la enfermedad periodontal.

Se sintetizaron nanopartículas (NPs) de plata (AgNPs) y cobre (CuNPs) puras (Ag^0 y Cu^0) utilizando reactivos biocompatibles como agentes reductores. Estas partículas se utilizaron para preparar materiales nanocompositos antibacterianos en la forma de geles, esponjas y esferas usando los biopolímeros alginato y quitosano como matrices biodegradables. Las NPs se caracterizaron mediante espectrometría de absorción molecular (UV-Vis), microscopía electrónica de transmisión (TEM) y difracción de rayos-X (DRX). La presencia de NPs en los biopolímeros se caracterizó mediante microscopía SEM acoplado a Energía Dispersiva de rayos-X (EDX) en modo de retrodispersión de electrones (back-scattering, BS). La actividad antimicrobiana de los materiales se evaluó frente a la bacteria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.a*)

Las AgNPs y CuNPs sintetizadas presentaron un tamaño de partícula en el rango 15-25 nm. Su naturaleza nanométrica fue confirmada mediante la presencia del plasmón de resonancia superficial a 432 nm y 593 nm, respectivamente. La incorporación de las nanopartículas (NPs) en las

correspondientes matrices se logró en los geles, esponjas y esferas. En todos estos nanocompositos (biopolímeros con NPs) las AgNPs fueron estables en el tiempo, mientras que las CuNP presentaron variada estabilidad dependiendo del tipo de matriz.

Los resultados de los ensayos de actividad antimicrobiana mostraron que todos los nanocompositos presentaron inhibición de crecimiento bacteriano frente a la bacteria *A.a.* Se encontró también, que la matriz controla la liberación de las NPs, regulando su acción y actividad. Entre las formas de matrices estudiadas, las esferas de biopolímero fueron las que, a diferencia de las esponjas y geles, permitieron un mayor control de la liberación de NPs y de la actividad antimicrobiana. Por otro lado, y en general, los nanocompositos cargados con CuNPs, presentaron mayor actividad que los cargados con AgNPs. Entre todos los sistemas estudiados los nanocompositos a base de quitosano presentaron mejor actividad, demostrando un efecto de potenciación entre las propiedades bactericidas intrínsecas del biopolímero y las presentadas por las nanopartículas metálicas.

Se puede concluir que los sistemas de AgNPs y/o CuNPs/biopolímero presentan propiedades de inhibición bacteriana frente a la bacteria *A.a.* Por otra parte, la matriz del biopolímero regula la liberación y consecuentemente la actividad antimicrobiana en el tiempo. Estos resultados preliminares indican que estos sistemas podrían presentar potencial para aplicaciones en terapia periodontal localizada.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad periodontal es una de las enfermedades crónicas más prevalentes en el mundo [43]. El término enfermedad periodontal describe un grupo de infecciones localizadas que afectan los tejidos que soportan y rodean los dientes. Los dos tipos más comunes de enfermedad periodontal son la gingivitis y la periodontitis. La gingivitis es una condición previa y reversible, es una inflamación de los tejidos que rodean los dientes. La periodontitis en cambio, es una condición inflamatoria progresiva que destruye las fibras de los ligamentos periodontales y hueso alveolar y puede, eventualmente, ocasionar la pérdida de los dientes [9]. Algunas bacterias se han establecido como agentes etiológicos [1, 7] [41], pero solo unas cuantas se han asociado con la disolución de tejido conectivo, migración apical del epitelio de unión y pérdida de hueso alveolar que caracterizan el proceso de la enfermedad [31, 43].

La respuesta inflamatoria del huésped que resulta de esta infección bacteriana puede conducir a una destrucción progresiva de las estructuras de soporte periodontal, por lo tanto, uno de los elementos fundamentales en la terapia periodontal es lograr una reducción significativa o incluso erradicación de los patógenos periodontales involucrados. Una adecuada higiene oral en combinación con desbridamiento no quirúrgico tal como destartraje y pulido radicular. En algunas instancias, la terapia quirúrgica adicional con el uso de colgajos de acceso ha demostrado tener éxito. [7]

Los alcances tradicionales de la terapia periodontal, sean quirúrgicos o no quirúrgicos han mostrado una reducción significativa de la población bacteriana en los sitios tratados sin el uso complementario de agentes antimicrobianos o antibióticos. En un intento por aumentar los efectos de la terapia mecánica, antibióticos tales como penicilina, miembros de la familia de las tetraciclinas y el metronidazol, entre otros, se han administrado sistémicamente. [43].

La decisión de usar antibióticos sistémicos también tiene un número de factores que pueden afectar adversamente el curso del tratamiento periodontal [33]. Una seria desventaja de la **Terapia sistémica** es lo complejo que resulta alcanzar niveles terapéuticos del agente antimicrobiano en el sitio de interés ya que el agente se distribuye y se diluye a través de todo el organismo, siendo

complejo producir concentraciones en el fluido gingival crevicular (FGC) más altas que la concentración inhibitoria mínima (MIC). Adicionalmente, el alto recambio del FGC, ejerce un efecto de dilución del antibiótico administrado. El FGC es un transudado del suero encontrado en el surco gingival. Además se debe considerar que la terapia con antibióticos puede desarrollar resistencias en los microorganismos del saco periodontal, interaccionar con otros medicamentos que el paciente puede estar tomando, generar efectos secundarios tales como problemas estomacales, náuseas, etc. [41]. Todas estas desventajas tienen el potencial para afectar el desarrollo terapéutico y se deberían considerar antes de emplear antibióticos sistémicos [31]. Dentro de este escenario, es importante explorar nuevas alternativas de terapia para casos donde se necesitan el uso de agentes antimicrobianos como complemento.

En un intento de disminuir las potenciales respuestas adversas de la administración sistémica estos antibióticos se han aplicado a los sacos periodontales de manera local a través de la administración tópica e irrigación. Cuando los agentes se aplican localmente se busca que lleguen al sitio de actividad en suficiente concentración para tener un efecto en los microorganismos patogénicos presentes y particularmente mantener esta concentración por un período de tiempo suficiente que permita al agente tener un efecto óptimo. Sin embargo, muy pocos agentes pueden permanecer dentro del saco periodontal por más de unos minutos, debido a que, como antes fue explicado, el FGC presenta una alta tasa de recambio [43]

La **terapia local** antibiótica involucra el directo posicionamiento del agente antimicrobiano a los sitios subgingivales, minimizando el impacto del agente en los sitios no orales. La administración localizada o sitio específico de agentes quimioterapéuticos puede ofrecer ventajas de tratamiento de sitios enfermos específicos, posible uso de menores niveles de dosis totales, evitación potencial de complicaciones sistémicas asociadas con altos niveles de dosis y la posibilidad de controlar la liberación y concentración de agentes terapéuticos si un **vehículo de liberación controlada** es empleado. La relativa baja accesibilidad de los sacos periodontales ha resultado en el desarrollo de varios métodos de administración de los agentes terapéuticos, tales como la irrigación dentro del saco periodontal y disposición de mecanismos de liberación controlada. Los

sistemas de irrigación subgingival son de fácil uso y pueden entregar altas concentraciones del agente antimicrobiano a un sitio. Varios agentes se han probado como irrigantes, entre ellos agentes antimicrobianos orgánicos no antibióticos como clorhexidina, sanguinaria, aceites esenciales y varios antibióticos, etc [43]. Aunque los irrigantes pueden entregar concentraciones a la base del saco, el nivel del agente declina exponencial y rápidamente, por lo tanto, limita la eficacia de la aplicación local de los agentes antimicrobianos en el tratamiento periodontal [41]. Además, varios agentes antimicrobianos orgánicos no antibióticos pueden ser extremadamente irritantes y tóxicos [38], algunos de ellos como la clorhexidina, presentan efectos secundarios tales como pigmentación dentaria, alteración del gusto e irritación y descamación de la mucosa oral [29].

Los **sistemas de liberación controlada** son medios diseñados para liberar el agente antimicrobiano lentamente y prolongar su disponibilidad y acción sostenida. Estas formas dosificadas son conocidas comúnmente como sistemas de liberación continua, liberación sostenida, liberación prolongada, liberación lenta, acción prolongada o acción extensa [41, 42]. El objetivo principal de la liberación controlada se basa en conseguir la cantidad apropiada del agente activo, en el momento adecuado y en el lugar preciso. Este método de liberación se usa habitualmente para prolongar el tiempo que la dosis terapéutica está presente de forma efectiva utilizando una única dosis, para eliminar o minimizar las concentraciones que exceden los requerimientos terapéuticos.

Los **sistemas de liberación controlada** deben ser capaces de permitir la administración del agente activo de una forma gradual y continua durante períodos prolongados de tiempo [37]. En el caso de sistemas para la terapia periodontal localizada, existen algunos productos comerciales basados en tetraciclinas / fibras etilen-vinil-acetato (no reabsorbible, Actisite®), doxicilina/ gel PLA (reabsorbible, Atridox®), minociclina/ microesferas ácido poli-DL-láctico-co-glicólico (reabsorbible, Arestin®) metronidazol/glyceril mono oleato y aceite de sésamo, clorhexidina/ membranas de gelatina (reabsorbible, Periochip®), entre otros [41]. Sin embargo, la mayoría de estos productos usan como agente activo antibióticos y como vehículo, polímeros sintéticos. Gran parte de los patógenos periodontales poseen diferentes perfiles de susceptibilidad los cuales pueden cambiar después de la terapia antibiótica o adquirir una susceptibilidad alterada por mutación

bacteriana [33]. Debido al aumento de resistencia microbiana, se han estudiado extensamente nuevos agentes antimicrobianos inorgánicos como alternativa viable de tratamiento. [19, 20, 34]

Los agentes antimicrobianos inorgánicos puede ser una alternativa muy atractiva desde el punto de vista del dopaje de biomateriales debido a que poseen muchas ventajas como una buena capacidad antibacteriana y no generan los efectos indeseables conocidos para los antibióticos. El dopaje de un material se define como el proceso intencional de agregar una sustancia diferente a este con el fin de cambiar sus propiedades [24]. Recientes revisiones bibliográficas presentan a las **nanopartículas de plata (AgNP)** y **cobre (CuNP)** como una nueva generación de antimicrobianos para aplicaciones biomédicas [11, 12, 1,16, 19, 20, 23]. Más recientemente y junto al desarrollo de la **nanotecnología**, la síntesis de AgNPs [24] y su incorporación en materiales e insumos odontológicos como agente bactericida podría ofrecer posibilidades para el desarrollo de nuevos sistemas de liberación controlada. La nanotecnología se ha definido como: “la creación de materiales, sistemas y dispositivos funcionales a través del control de la materia en la escala nanométrica (1-100nm) y la explotación de nuevos fenómenos y propiedades (físicas, químicas y biológicas) a esa escala. [8]

La plata ha sido empleada desde tiempos inmemoriales en diversas presentaciones para el tratamiento de heridas e infecciones bacterianas severas [16]. La plata nanométrica y en general los nanomateriales, presentan propiedades físicas, químicas y biológicas superiores a la de su contraparte micrométrica. Este efecto es consecuencia de la mayor área superficial que presenta un material con dimensiones nanométricas, lo cual permite una mayor bioactividad al interactuar con mayor cantidad de células, bacterias ó macromoléculas biológicas [20]. El cobre, particularmente las CuNPs, han sido menos estudiadas que las AgNPs y sus mecanismos son menos claros dado que las CuNPs son menos estables por su fuerte tendencia a oxidarse, sin embargo, estudios han demostrado que también poseen favorables propiedades bactericidas [1, 19, 27].

Es conocido que las nanopartículas metálicas presentan destacadas propiedades antibacterianas con un amplio espectro a bacterias Gram positivo y Gram negativo a muy bajas concentraciones [21, 27]. Existen antecedentes que

las bacterias son mucho menos propensas de presentar resistencia a las nanopartículas metálicas en comparación a otros agentes antibióticos o antimicrobianos de estrecho alcance. Esto se piensa que es consecuencia del amplio alcance de objetivos bacterianos (varios mecanismos de acción) que presentan, por lo que tendrían que ocurrir muchas mutaciones simultáneas en el microorganismo para resistir a la actividad antimicrobiana de las nanopartículas [23, 27].

Las nanopartículas metálicas (AgNPs, CuNPs) se sintetizan en general de manera química por medio de una reacción de reducción a partir del ion precursor (Ag^+ , Cu^{2+}). Las AgNPs que se están utilizando actualmente en diferentes productos comerciales (Ej. “nanosilvers”) son sintetizadas con boro hidruro de sodio, N-dimetilformamida, hidracina, los cuales podrían ser potencialmente tóxicos para aplicaciones biomédicas. Nuevos métodos de síntesis basados en el concepto de “química verde”, es decir, métodos que permiten preparar agentes biocompatibles han hecho posible más recientemente la posibilidad de sintetizar AgNPs y CuNPs más benignas, las cuales resultan más apropiadas para sistemas biológicos [20, 1, 24, 31]. Una de las estrategias consiste en el uso de biopolímeros o carbohidratos tales como almidón, glucosa [32] y quitosano (biopolímeros naturales) como reductores y estabilizadores. Las AgNPs y CuNPs preparadas mediante estas sustancias resultarían ser más compatibles con aplicaciones biomédicas [19, 20, 24]. Los biopolímeros además de servir como agentes reductores para la síntesis de AgNP, podrían ser usados como vehículos para el desarrollo de sistemas de liberación controlada [5,36]. Los biopolímeros como alginato y quitosano son materiales naturales biodegradables que presentan la propiedad de formar hidrogeles, formar estructuras sólidas porosas (esponjas) ó esferas individuales gelificadas. Cualquiera de estas formas proveería de una matriz para contener el agente antimicrobiano, y permitir su liberación gradual y sostenida en zonas de interés periodontal. En el caso de diseñar un sistema de terapia localizada basado en NPs metálicas y biopolímeros, se debe estudiar el método más apropiado para incorporar las NPs en la matriz del polímero, y que permita obtener un sistema estable para la aplicación.

En este trabajo se sintetizarán AgNPs y CuNPs usando el concepto de química verde [20]. Estas partículas serán posteriormente incorporadas en

biopolímeros naturales para obtener un sistema antibacteriano orientado a la terapia periodontal localizada. Como vehículo para las NPs se utilizarán los biopolímeros alginato y quitosano, en la forma de geles, esponjas y esferas. Las propiedades bactericidas de estos sistemas serán posteriormente evaluadas *in vitro* frente a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, un patógeno representativo de la periodontitis [31] con fuerte asociación, en especial a la forma agresiva de la enfermedad. Este microorganismo es parte de la microbiota de la cavidad oral en individuos sanos. Participa en diversas patologías, siendo el patógeno de mayor relevancia en la periodontitis agresiva localizada. [34]

MARCO TEÓRICO

1. Enfermedades Periodontales

Las enfermedades periodontales se definen clásicamente como enfermedades inflamatorias crónicas, inducidas por placa (bacterias) que pueden destruir el tejido conectivo y hueso que soporta al diente [42]. Estas enfermedades se han dividido tradicionalmente en 2 categorías basadas en la pérdida del nivel de inserción (tejido conectivo), periodontitis y gingivitis respectivamente. La gingivitis es la presencia de inflamación sin pérdida de inserción de fibras periodontales de colágeno ni pérdida de hueso alveolar. La periodontitis puede ser definida como la presencia de inflamación gingival en sitios donde ha habido y/o hay desinserción patológica de fibras de colágeno del cemento y donde la unión epitelial ha migrado apicalmente. Además, eventos inflamatorios asociados con la pérdida de inserción del tejido conectivo llevan a la reabsorción coronal del hueso alveolar que soporta al diente. [30]

La prevalencia de gingivitis en Chile, en niños y adolescentes, alcanza el 32.6% a los 2 años y el 66.9% a los 12 años [44]. En cuanto a la prevalencia de periodontitis el indicador más aceptado para medir enfermedad periodontal es la pérdida de inserción clínica. En el rango etario de 35-44 años el 93.5% tiene una pérdida de inserción mayor a 3 mm. Esto aumenta a 97.6% entre los 65-74 años. Las pérdidas de inserción mayores a 6 mm, en al menos uno de los dientes examinados, son del 39% y 69% para los grupos de 35-44 años y 65-74 años respectivamente. [45]

Actualmente existen varias formas de manifestación de las enfermedades periodontales inducidas por placa las cuales se han clasificado e incluyen: gingivitis, periodontitis crónica, periodontitis agresiva, periodontitis como manifestación de una enfermedad sistémica, enfermedades periodontales agudas con posibles manifestaciones sistémicas (abscesos periodontales y gingivales, gingivitis ulceronecrotizante aguda, periodontitis ulceronecrotizante aguda, gingivoestomatitis herpética y lesiones endoperiodontales) y periodontitis refractaria [30, 26].

La periodontitis es una enfermedad multifactorial con un mecanismo de patogénesis complejo e interconectado donde la relación entre las bacterias dentro del surco y saco periodontal y la respuesta que generan en los mecanismos de defensa del hospedero, produce un gran número de permutaciones de cómo la enfermedad se puede presentar clínicamente y de cómo puede progresar [12].

La periodontitis empieza con una infección de ciertas especies bacterianas, seguida por una destrucción de tejido blando mediada por el hospedero, causada por leucocitos hiperactivados y la generación de citoquinas, eicosanoides y una matriz de metaloproteinasas que causan una destrucción clínica significativa de tejido conectivo y óseo [42]. Las acumulaciones bacterianas en el diente son esenciales para la iniciación y progresión de la periodontitis. Las células que median inmunidad, como los neutrofilos, juegan un rol mayor en las respuestas del hospedero contra los microorganismos periodontopatógenos. Cuando el biofilm bacteriano en el diente no se disgrega regularmente, cambios ecológicos llevan a la aparición de un pequeño conjunto de especies bacterianas anaeróbicas Gram negativo que incluyen *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* (anteriormente *T. forsythensis*) y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* entre otras, que consistentemente se han asociado a periodontitis. Estas bacterias activan muchos procesos inmunoinflamatorios del hospedero e interrumpen los mecanismos de eliminación bacteriana y se les considera patógenos en la periodontitis [42, 43].

Las lesiones periodontales usualmente albergan un gran número de patógenos putativos. La mayoría de los patógenos putativos son cepas anaeróbicas Gram negativo. Al menos 500 tipos de bacterias se han identificado en el saco periodontal, sin embargo, pocas especies se han asociado claramente a la periodontitis [31]. Entre ellas:

1. **Con muy fuerte asociación:** *Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*); *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. a.*), *Tannerella forsythia*.
2. **Con fuerte asociación:** *Prevotella intermedia*, *Dialister pneumosintes/invisus*; *Eubacterium Nodatum*; *Treponema Denticola*
3. **Con moderada asociación:** *Campylobacter rectus*; *Peptoestreptococcus micros*; *Fusobacterium nucleatum*; *Eikenella corrodens*; *Streptococco beta-hemolítico* [31]

2. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans, previamente denominado *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, es un cocobacilo gram negativo de la familia *Pasteurellaceae*. Es inmóvil, no esporulado y capsulado. Presenta fimbrias y se puede presentar en forma aislada, en pares o en pequeños racimos. Es un microorganismo anaerobio facultativo pero se desarrolla mejor en condiciones de anaerobiosis [6]. Su pared celular presenta endotoxinas (LPS). Produce varias enzimas y toxinas, que le confieren grandes propiedades virulentas. [34]

Cuadros de enfermedad periodontal con la presencia de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* a menudo requiere de una terapia antibiótica además del desbridamiento mecánico debido a la habilidad de la bacteria para formar biofilms en el saco periodontal y en todas las membranas mucosas de la cavidad oral. [19]. Además se ha descrito que este patógeno es capaz de invadir células epiteliales y colonizar el tejido conjuntivo subyacente. [9]

Este patógeno presenta diversos factores de virulencia, entre las que se encuentran fimbrias, vesículas, así como la producción de un material amorfo extracelular proteico, que le permite adherirse a las células hospederas [47], siendo esta adherencia, el primer paso de todo proceso infeccioso. Dentro de sus factores de virulencia se encuentran:

Leucotoxina: Con actividad citoletal en polimorfonucleares, leucocitos, macrófagos, penetrando y formando poros transmembranosos que producen pérdida de potasio intracelular, con un resultado fatal para la célula. Es así también un participante de la reabsorción ósea. [34]

Toxina de distensión citoletal (CDT): Inhibe la progresión del ciclo celular en G2, llevándola a una apoptosis celular. Así también puede inhibir la proliferación de linfocitos CD4, impidiendo una respuesta adecuada del sistema inmune. [1]

Endotoxina (LPS): Es una toxina sumamente activa, constituida por lípidos y polisacáridos. Causan reabsorción ósea e inflamación, estimulando en macrófagos la producción de IL1-B y factor de necrosis tumoral alfa, mediadores de la

inflamación y reabsorción ósea. [25]

Proteínas unidas a los receptores Fc: La región Fc de la inmunoglobulina se une a proteínas de superficie de la bacteria, haciendo que el complemento no cumpla su función citoletal, ni se realice una adecuada opsonización para la fagocitosis. [22]

Proteína similar a GROE1: Es una proteína con acción osteolítica identificada en la mayoría de pacientes con periodontitis agresiva localizada. [34]

Colagenasas: Enzima capaz de deteriorar el tejido conectivo del periodonto. [25]

Citotoxinas: Inhiben la proliferación de fibroblastos y la capacidad del hospedero de sintetizar colágeno para la recuperación de los tejidos. [37]

Epiteliotoxinas: Destruye hemidesmosomas de la unión intercelular, siendo un mecanismo de invasión y profundización de la infección. [25]

En el biofilm oral se han encontrado más de 700 tipos bacterianos [33], siendo uno de ellos el *A.a*, bacteria residente en el surco gingival. No todas las *A.a* son tan dañinas, sino las que presentan ciertas características, como una mayor activación de su leucotoxina, la cual tiene 2 funciones bien marcadas: daño en las células de defensa y reabsorción ósea. El daño producido por esta bacteria es rápido, más aún si se acompaña de un abundante biofilm alrededor del diente, llegando a deteriorar el periodonto con formación de bolsas periodontales, pérdida de inserción, amplia movilidad del diente y con el tiempo pérdida de este [34].

Dada la fuerte asociación de este patógeno con la enfermedad periodontal, se convierte en un candidato adecuado para los ensayos microbiológicos de la presente investigación.

3. Formas de terapia periodontal

La inflamación del periodonto puede resultar de muchas causas (ejemplos: bacterias, trauma). Sin embargo, la mayor cantidad de formas de gingivitis y periodontitis resultan de la acumulación de microorganismos adherentes a superficies dentales. En el caso de la gingivitis, y a grandes rasgos, el objetivo terapéutico es dirigido a la reducción de bacterias asociadas a depósitos calcificados y/o no calcificados a umbrales donde no sean capaces de iniciar la inflamación clínica, así como también reducir la cantidad de factores locales contribuyentes [29]

La terapia apropiada para la periodontitis varía entre cada paciente debido a un gran número de variables (forma y extensión de pérdida de inserción, variaciones locales anatómicas, tipo de enfermedad periodontal, objetivos terapéuticos, etc.) El objetivo primario de la terapia en pacientes con periodontitis consiste en detener la progresión de la enfermedad y tratar los sitios enfermos (sacos periodontales) reduciendo los factores etiológicos (bacterias) que propician la enfermedad a umbrales que no puedan causar inflamación ni destrucción periodontal. La terapia clásica de la periodontitis crónica (la forma más común) consiste en el pulido y alisado radicular combinada con el control de placa personal lo cual trae muchos beneficios e incluyen reducción de la inflamación clínica, cambios microbiológicos de la flora subgingival a una flora menos patógena, disminución de la profundidad al sondaje, ganancia de nivel de inserción clínica y una menor progresión de la enfermedad. Los estudios demuestran que después de esta terapia las condiciones clínicas mejoran. Sin embargo, no todos los sitios responden a este tratamiento. Existen factores que limitan el éxito de esta terapia como el tipo de enfermedad periodontal, la anatomía del diente, presencia de furcas, profundidades al sondaje mayores a 5 mm, etc. En sitios que no responden efectivamente a esta forma de tratamiento se pueden emplear terapias adjuntas como:

Terapia Quirúrgica: Un alcance quirúrgico a la terapia periodontal se utiliza en un intento de proveer mejor acceso a los sitios enfermos y remover factores etiológicos, reducir las profundidades al sondaje y regenerar o reconstruir tejidos periodontales perdidos. Se ha demostrado que tantos los alcances quirúrgicos

como no quirúrgicos pueden resultar efectivos en la estabilización de los niveles de inserción clínica. El uso de colgajos de acceso es capaz de aumentar la eficacia del desbridamiento de las raíces sin embargo, no siempre se puede lograr la total eliminación de depósitos duros [29].

Terapia farmacológica: Esta forma de terapia se clasifica según su ruta de administración a los sitios enfermos en [2, 29]:

a) Administración sistémica: Los primeros candidatos para la terapia sistémica antibiótica son los pacientes que exhiben pérdida continua de inserción periodontal a pesar de una diligente terapia periodontal mecánica (periodontitis refractaria), pacientes con formas de periodontitis agresiva, con condiciones médicas que predispongan a la periodontitis. Pacientes con infecciones periodontales agudas o severas (abscesos periodontales, gingivitis ulceronecrotizante y periodontitis ulceronecrotizante) también se pueden beneficiar de la terapia con antibióticos [31, 1, 43].

De acuerdo a sus propias características, cada antibiótico tiene diferentes frecuencias y formas de administración así como niveles de absorción, vida media y concentraciones alcanzadas en el FGC. En la **Tabla 1** se resumen los antibióticos más usados:

Tabla 1. Antibióticos de uso común en el tratamiento de la enfermedad periodontal. [31]

Antibiótico	Absorción después de administración oral (%)	Peak de nivel en el FGC (µg/ml)	Vida media en el suero (horas)
Metrodinazol	90	20-25	6-14
Clindamicina	90	5	2.4
Penicilinas (Amoxicilina)	75	5-8	1.2
Tetraciclinas (doxiciclinas)	93	2-4	18
Azitromicina	37	0.4	12
Claritromicina	50	2-3	5-7
Fluoroquinolonas (ciprofloxacino)	70	1.5	4

Ventajas de la entrega sistémica: Administración simple y fácil a múltiples sitios con enfermedad periodontal, reducción de patógenos colonizantes en la mucosa oral o en sitios como lengua y áreas tonsilares, menor posibilidad de translocación de patógenos gracias a la posibilidad de eliminar gran cantidad de patógenos del ecosistema bucal. Tratamiento de los pacientes que no responden a la terapia convencional o tratamiento de pacientes con múltiples sitios y periodontitis recurrente. [43, 40, 27]

Desventajas de la entrega sistémica: **Inhabilidad de las drogas sistémicas de alcanzar grandes concentraciones en el FGC**, desarrollo de resistencia bacteriana, emergencia de infecciones oportunistas, posible desarrollo de alergias, pérdida de la microbiota normal. Las drogas sistémicas deben darse en altas dosis para mantener concentraciones efectivas lo cual puede resultar en varios efectos secundarios como náusea, vómitos y disturbios gastrointestinales [41, 27]

El flujo de FGC es continuo cuando el tejido es mecánicamente irritado o se encuentra inflamado. Se ha estimado que en un saco periodontal de 5 mm los contenidos de ese saco se reemplazan 40 veces en una hora (clearance), es decir el FGC se recambia completamente luego de ~1.3 min. [28]. Esto se traduce en que cualquier agente antimicrobiano ya sea administrado sistémica o tópicamente disminuye su concentración rápidamente en el saco por efecto del recambio del FGC, por lo que el agente debe administrarse en dosis más altas para mantener una concentración efectiva del agente en este fluido. Esto es un obstáculo para cualquier agente, en especial sistémico, ya que como se puede ver en la tabla anterior, para poder mantener sus concentraciones efectivas, los agentes sistémicos comúnmente usados deben darse en dosis más altas para mantener sus concentraciones terapéuticas en el FGC. [43] Acción que tampoco tiene muchos efectos. [43, 27]

b) Entrega local: La entrega local de agentes quimioterapéuticos dentro del saco periodontal puede alterar la microbiota patogénica y mejorar los signos clínicos de la periodontitis. Se ha demostrado que este tipo de entrega muestra beneficios clínicos en cuanto a disminución de la profundidad al sondaje y aumento del nivel de inserción clínica [43].

Ventajas de la entrega local: Pequeñas cantidades relativas del agente pueden producir altas concentraciones en el saco periodontal, efectos secundarios mínimos, menor potencial de inducción de resistencia bacteriana en otras zonas, posibilidad de mantener altas concentraciones del agente por un período de tiempo prolongado (vehículos de liberación controlada), empleo de agentes antimicrobianos no aptos para administración sistémica tales como soluciones antisépticas de amplio espectro. El agente quimioterapéutico se puede entregar al sitio enfermo a una concentración bactericida y con una aplicación selectiva de sitios que no responden a la terapia periodontal convencional [43, 27].

Desventajas de la entrega local: Dificultad en el posicionamiento de los agentes antimicrobianos en las partes más profundas de los sacos periodontales y lesiones

de furca, demanda tiempo si muchos sitios necesitan tratamiento, no afecta patógenos periodontales residentes en tejidos gingivales contiguos u otras superficies orales, solo son útiles si son administrados en vehículos de liberación controlada. [28, 42, 40]

Este tipo de entrega debe cumplir 3 criterios para ser efectiva:

- I) El medicamento debe llegar al sitio de acción
- II) Debe mantenerse a una adecuada concentración en el sitio de acción.
- III) Debe mantenerse por un tiempo adecuado para mantener su efecto.

La vida media esperada de un agente farmacológico en el surco gingival es de aproximadamente 1 min. [28] Esta alta tasa de recambio o clearance representa el mayor obstáculo en la mantención de concentraciones efectivas de un agente antimicrobiano dentro del saco periodontal. Duraciones terapéuticas mayores requieren el uso de un reservorio subgingival del agente terapéutico que pueda ir liberándolo paulatinamente y así contrarrestar la pérdida continua producida por el clearance del FGC [43, 27] En otras palabras, necesitan sustentividad.

Sustantividad se refiere a la propiedad de una sustancia de unirse a la paredes de tejido duro y/o blando dentro del saco periodontal (en este caso) y de liberarse de manera gradual manteniendo niveles terapéuticos. Así, se establece un equilibrio entre la droga libre en el saco y la que está unida a estas paredes de manera que cuando el clearance del FGC disminuya los niveles del agente, su forma unida a la paredes libere la forma activa y aumente la vida media de este, manteniendo su concentración efectiva en el tiempo. En odontología esta propiedad se ha descrito ampliamente para la clorhexidina en relación al clearance salival. En el ambiente sub-gingival las tetraciclinas y la clindamicina han demostrado tener una adecuada sustentividad pero se necesitan concentraciones muy grandes de ellas para mantener una actividad antibacteriana. La sustentividad se convierte en el reservorio subgingival de los agentes en estos casos pero el tamaño de este reservorio sigue siendo una limitación [28].

4. Sistemas de liberación controlada

Un sistema de liberación local consiste en un reservorio del agente o medicamento y un elemento limitante que **controla** la tasa de liberación de este último. Los sistemas de liberación locales (sistema de liberación controlada) se dividen en sistemas de liberación sostenida (proveen de reservorio del medicamento por menos de 24 hrs.) y **sistemas de liberación controlada** (proveen de reservorio del medicamento por mínimo 24 hrs.) Los dispositivos intracreviculares deben tener un reservorio del medicamento adecuado para satisfacer las concentraciones necesarias por un tiempo considerable. Para que estos sistemas de reservorio con el medicamento quepan en el espacio físico de los sacos periodontales estos deben expandir el volumen del saco y luego permanecer dimensionalmente estables para impedir una prematura expulsión. [28]. En un sistema de liberación controlada, el agente bioactivo es incorporado a un vehículo o soporte que generalmente es un material polimérico o una combinación de varios. Estos polímeros pueden ser: [37]

-**Naturales:** Quitosano, alginato, colágeno, almidón, entre otros.

-**Sintéticos biodegradables:** Ácido poliláctico y poliglicólico, entre otros.

-**Sintéticos no biodegradables:** Ácidos poliacrílicos.

Tanto los materiales empleados como matrices para sistemas de liberación así como sus productos de degradación deben ser biodegradables, biocompatibles e insolubles. [37, 42]

La liberación puede ocurrir por difusión, disolución, presión osmótica, fuerza mecánica, hinchamiento, erosión o activación [37]. El éxito de cualquier sistema de liberación controlada dependerá de su habilidad para conseguir concentraciones bacteriostáticas o bactericidas del agente en la base del saco periodontal, facilitando la retención del medicamento suficiente tiempo para asegurar resultados positivos [41]. La velocidad de liberación de la sustancia activa desde dicho sistema al medio que la rodea, viene determinada por las propiedades del propio polímero, tales como su velocidad de degradación en el medio fisiológico, y en menor medida de variables como el pH, la temperatura y

los fluidos del organismo. [37, 40]. Biopolímeros como Alginato y Quitosano pueden ser excelentes alternativas como vehículos de liberación controlada.

5. Biopolímeros (Alginato y Quitosano)

Alginato: Los alginatos son biopolímeros naturales extraídos de algas marinas café y están estructuralmente compuestos por el ácido 1-4 b-D-Manurónico (M) y el ácido a-L-Gulurónico (G), los cuales constituyen sus unidades monoméricas. En la cadena polimérica, los monómeros se distribuyen alternadamente en bloques GG y MM combinados con MG. La composición química y secuencia de los bloques depende de la fuente biológica, crecimiento del alga y condiciones de temporada. La propiedad más útil y única de los alginatos es su habilidad para reaccionar con cationes metálicos polivalentes, específicamente el calcio, para producir hidrogeles fuertes o polímeros de baja solubilidad. Los iones establecen la asociación cooperativa entre los bloques M y G resultando en una red tridimensional dada la naturaleza cooperativa del entrecruzamiento de las unidades G y la flexibilidad que proveen los bloques M y M/G. El entrecruzamiento con cationes polivalentes puede mejorar características como resistencia al agua, resistencia mecánica, propiedades de barrera, cohesividad y rigidez. [5]

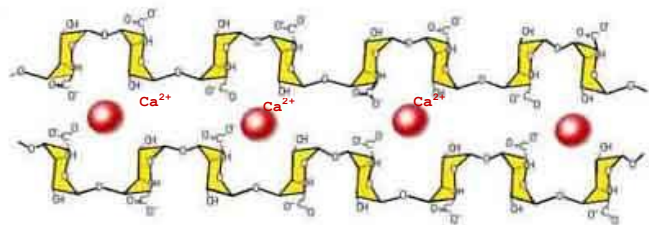


Figura 1. Conformación del alginato tipo “caja de huevos”, lograda por la asociación con iones Ca^{+2} .

Debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad, condiciones de gelación y baja inmunogenicidad y toxicidad el alginato se ha usado ampliamente en la industria farmacéutica en muchas aplicaciones terapéuticas [46].

Quitosano: El quitosano es un amino polisacárido lineal compuesto de cadenas que presentan uniones de grupos D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina de manera aleatoria (**Fig.2**). Se obtiene de la desacetilación de la quitina, el cual es un polisacárido natural encontrado en el exoesqueleto de crustáceos como el cangrejo y el camarón. [10, 3] El porcentaje de grupos amino que quedan libres en la molécula de quitosano es lo que se denomina grado de desacetilación y está estrechamente vinculado con su solubilidad y propiedades físico-químicas. Algunas de las propiedades funcionales del quitosano son: biodegradabilidad, biocompatibilidad, mucoadhesión, capacidad filmogénica, hemostático, promotor de absorción, actividad antimicrobiana, anticolesterolémica y antioxidante [37]. Ha sido altamente utilizado en el campo de la biomedicina debido a su actividad inmunoestimuladora, propiedades anticoagulantes, acción antibacteriana y antifúngica y por su acción como promotor de la cicatrización de heridas. Debido a su carácter catiónico y a sus propiedades gelificantes y filmogénicas, el quitosano ha sido estudiado en la industria farmacéutica por su potencial en el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos [37]. Constituye un vehículo para la encapsulación de fármacos, protegiéndolos y liberándolos de forma controlada [37]. Así mismo, el quitosano presenta propiedades necesarias para su uso como son su biodegradabilidad, biocompatibilidad y no toxicidad.

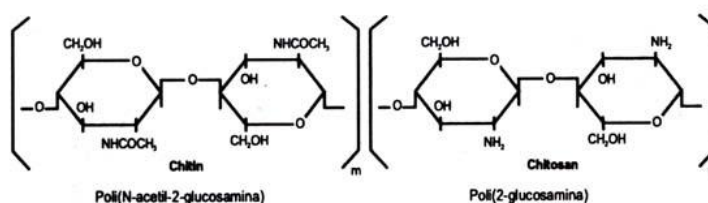


Figura 2. Estructura química del quitosano

El alginato y quitosano, por las propiedades ya descritas, son grandes candidatos para ser usados como vehículos de liberación controlada de antimicrobianos de carácter inorgánico.

6. Agentes antimicrobianos inorgánicos (AgNPs y CuNPs)

Las nanopartículas de plata y cobre son una aglomeración nanométrica (clusters) de unos pocos átomos de plata o cobre en estado de oxidación cero (Ag^0 y Cu^0) [1, 16], y se caracterizan por absorber una longitud de onda específica, propiedad óptica conocida como *plasmón de resonancia superficial* [39]. Estas nanopartículas CuNPs y AgNPs, poseen un tamaño que varía entre 1-100 nm. La plata utilizada tradicionalmente como antiséptico corresponde a iones de plata (Ag^+) o el mismo metal con dimensiones micrométricas (Ej. un trozo de metal de plata) [13].

Los métodos para la síntesis y estabilización de nanopartículas son de tipo físico y químico. Estudios han demostrado que el tamaño, la morfología, estabilidad y propiedades de los elementos sintetizados son fuertemente influenciados por el método de síntesis. Existe un grupo de técnicas denominadas “de afuera hacia dentro” (top-down), en la cual se emplea plata metálica a granel y se reduce su tamaño hasta la escala nanométrica mediante métodos físicos. Un segundo grupo de técnicas, denominadas “de adentro hacia afuera” (bottom-up) implica la disolución de un reactivo de plata o cobre en un solvente y la subsiguiente adición de un agente reductor, con el uso suplementario de agentes estabilizantes, como el almidón, para prevenir la aglomeración de las nanopartículas, permitiendo que las partículas que se forman queden en suspensión (método químico). Este método utiliza reactivos que son biocompatibles así como todos los productos implicados en el proceso de formación [39].

Los nanomateriales a menudo ofrecen cualidades físicas, químicas y biológicas únicas y disimiles considerablemente en relación a sus homólogos a macro escala [39]. Se ha demostrado una relación inversa entre el tamaño de las nanopartículas y su actividad antimicrobiana, donde las nanopartículas en el rango de tamaño de 1-10 nm han mostrado tener la mayor actividad antibacteriana [35].

La transición de micropartículas a nanopartículas involucra un incremento en la relación área de contacto/volumen (razón de aspecto), en donde el área de contacto aumenta dramáticamente. La actividad antibacteriana de los metales depende de su superficie de contacto; una mayor área de las nanopartículas permite una ampliación de la gama de interacciones con moléculas orgánicas, inorgánicas y bacterias. [12]. A modo de ejemplificar este efecto, en la **Figura 3** se esquematiza de manera simple como aumenta el área superficial de contacto, de un cubo de 2 cm de lado y área total de contacto 24 cm², al disminuir su tamaño. Al generar divisiones en los 3 sentidos del espacio se forman 8 cubos de 1 cm de lado. Cada área total de contacto de estos pequeños cubos sería de 6 cm² y el área total que aportan todos los cubos sería de 48 cm². En la **tabla 2** se muestra el efecto que tendría una reducción de la tamaño de un cubo hasta una escala nanométrica, y como las nanopartículas (1 nm) presentan un área y una energía superficial considerablemente superior a su contraparte milimétrica.

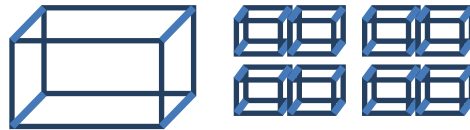


Figura 3. Ejemplo del aumento del área total de contacto al disminuir las dimensiones de un cubo

Tabla 2. Aumento del área y energía superficial a medida que se reducen las dimensiones

L (cm)	Área Superficial (cm ²)	Energía Superficial (J/g)
0.77	3.6	7.2×10^{-5}
0.1	28	5.6×10^{-4}
0.01	280	5.6×10^{-3}
0.001	2.8×10^3	5.6×10^{-2}
10^{-4} (1 μm)	2.8×10^4	0.56
10^{-7} (1 nm)	2.8×10^7	560

Aunque las AgNPs y CuNPs han demostrado tener considerable acción antibacteriana las primeras han sido más documentadas que las segundas:

AgNPs: El mecanismo exacto de las nanopartículas de plata en los microbios todavía no ha sido completamente entendido. El posible mecanismo de acción de la plata metálica, iones plata y nanopartículas de plata se ha sugerido de acuerdo a los cambios estructurales y morfológicos encontrados en las células bacterianas [35, 13]. El mecanismo de acción de la plata se ha asociado a su interacción con proteínas que poseen el grupo tiol (-SH), como las encontradas en la membrana respiratoria de enzimas bacterianas. La plata por lo tanto inhibiría el proceso respiratorio bacteriano. Se sugiere que cuando las moléculas de ADN están en un estado “relajado” la replicación del ADN puede ser efectiva, pero cuando el ADN está en forma condensada pierde su habilidad de replicación por lo tanto, cuando los iones de plata penetran en las bacterias, el DNA se condensa y pierde su habilidad de replicación resultando en la muerte bacteriana. Las AgNP muestran propiedades antimicrobianas eficientes gracias a su gran área superficial, la cual provee de un mejor contacto con los microorganismos. Las AgNP se unen a la membrana celular y también al igual que los iones liberados, penetran en la bacteria. La membrana bacteriana contiene proteínas con grupos -SH los cuales interactúan con las AgNP al igual que con los grupos fosfatos del ADN [13, 34]. Las bacterias se pueden ver afectadas por:

- a) Captación de iones de plata libres por parte de la bacteria e interrupción de producción de ATP y replicación de DNA [13]
- b) Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Los ROS generados pueden afectar al DNA, la membrana bacteriana y las proteínas de membrana. [13]
- c) Daño directo de las nanopartículas a las membranas celulares. Atacando específicamente a los aminoácidos metionina y cisteína de las proteínas bacterianas, los cuales presentan grupos tiol en su estructura (R-SH). [13]

En la **Figura 4** se esquematizan estas interacciones así como la acción tanto de nanopartículas como de iones plata.

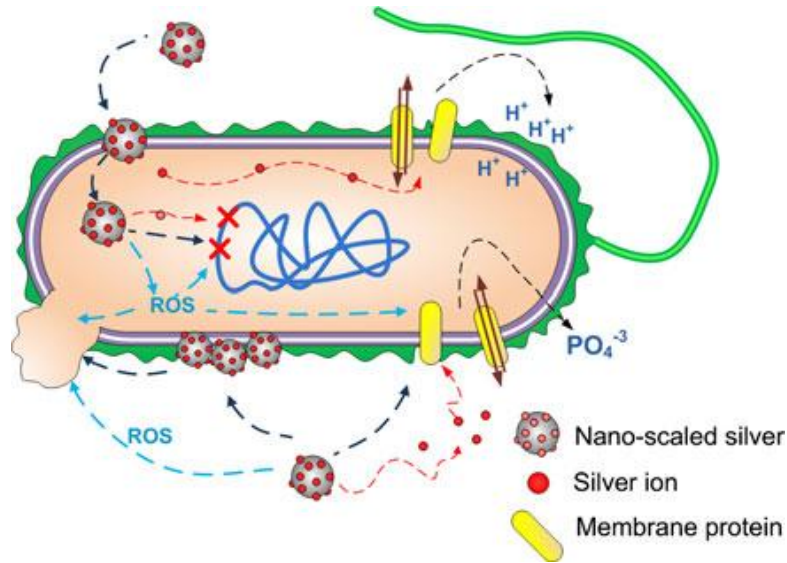


Figura 4. Esquema de la interacción entre AgNP y células bacterianas. Las AgNP pueden (1) liberar iones de plata y generar ROS; (2) interactuar con proteínas de membrana; afectando su permeabilidad; y (3) entrar en la célula, donde puede generar ROS, liberar iones de plata y afectar el DNA [17]).

CuNPs: Aunque menos documentadas, sus propiedades bactericidas son promisorias [11]. Se han encontrado interacciones de las superficies de las CuNPs con las membranas bacterianas, donde estas últimas se rompen permitiendo la lisis celular [41]. Esta actividad se ha hecho patente para bacterias Gram (-) y Gram (+). Mientras que las AgNPs se han reportado puras (sin capas de óxido) las CuNP han presentado capas de óxido en su superficie, lo cual, podría aumentar aún más las interacciones con bacterias [11].

Resumiendo, estudios previos han reportado el empleo de vehículos de liberación controlada para terapia periodontal localizada con el uso de antibióticos y biopolímeros sintéticos [41]. Se ha reportado también, el uso de antimicrobianos orgánicos no antibióticos (clorhexidina) y algunos biopolímeros naturales como quitosano, el cual, ha tenido múltiples estudios que avalan su capacidad como sistema de liberación controlada, y de presentar propiedades antimicrobianas [37]. No se han encontrado antecedentes del uso de nanopartículas metálicas contenidas en biopolímeros que permitan su uso como sistemas de liberación controlada para terapia periodontal.

La posibilidad de agregar NPs de plata o cobre con propiedades antibacterianas a vehículos de liberación controlada como biopolímeros (alginato, quitosano) puede ser una estrategia y alternativa viable para un producir un biomaterial híbrido (metal+polímero) orientado a la terapia periodontal localizada. El uso de biopolímeros naturales y nanopartículas metálicas sintetizadas con el concepto de química verde ofrecería nuevas posibilidades de tratamiento, lo cual se vería potenciado por el uso de sistemas biocompatibles, biodegradables y que reduzcan la posibilidad de resistencia bacteriana.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Biomateriales compuestos a base de nanopartículas metálicas (AgNP ó CuNP) y polímeros naturales presentan propiedades bactericidas frente a un patógeno representativo de la periodontitis (*A. actinomycetemcomitans*).

OBJETIVO GENERAL

Preparar materiales nanocompositos a base de biopolímeros dopados con nanopartículas de plata (AgNP) y cobre (CuNP), y evaluar sus propiedades bactericidas frente a un patógeno periodontal. (*A. Actinomycetemcomitans*).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Sintetizar y caracterizar nanopartículas de plata y cobre utilizando reactivos biocompatibles.
2. Preparar y caracterizar biomateriales compuestos a base de nanopartículas metálicas y polímeros naturales en forma de esfera, gel y esponja.
3. Evaluar las propiedades bactericidas de los diferentes sistemas contra el patógeno periodontal *A. actinomycetemcomitans*.
4. Estudiar la cinética de liberación controlada de las nanopartículas desde las matrices de biopolímeros en sus diferentes formas.

Materiales y Métodos

1.-Síntesis de nanopartículas de plata y cobre

Se sintetizaron nanopartículas de plata y cobre bajo el concepto de “química verde”, mediante los procedimientos que a continuación se describen:

I) AgNP:

Las AgNP se sintetizaron basándose inicialmente en el método reportado por Vigneshwaran y cols. [24]

Se preparó una solución acuosa de nitrato de plata (AgNO_3) de concentración 0.1 M y separadamente dos soluciones de 100 ml de almidón al 1% en agua destilada (a 70°C). Una alícuota de solución de AgNO_3 de 0.55 ml se agregó sobre una de las soluciones de almidón y 0.11 ml sobre la otra. Posteriormente las mezclas se llevaron a reacción en un sistema termo-regulado a 120°C por un periodo de 55 minutos y en condiciones estáticas. Una vez completado el tiempo de reacción las suspensiones obtenidas se enfriaron y conservaron a temperatura ambiente. De esta manera se obtuvieron dos suspensiones de AgNP de aproximadamente 400 ppm y 100 ppm respectivamente

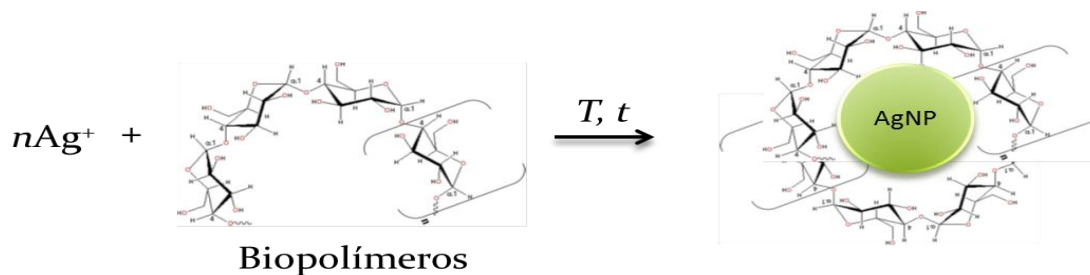


Figura 5: Esquema de la síntesis de AgNP protegida con almidón

T: Temperatura; t: Tiempo; n: Cantidad de veces de Ag^+ .

II) CuNP:

Las CuNP se sintetizaron de manera simultánea con la formación de los geles, para encontrar mayor estabilidad de estos con las nanopartículas de cobre. Se sintetizó, de forma apartada a la formación de geles, una suspensión de 100 ml

de CuNPs 400 ppm específicamente para la formación de esferas. Esta suspensión se formó mezclando 96.84 ml de ácido ascórbico 10%, 0,242 g de almidón (estabilizante de las partículas) y 3,14 ml de una solución de acetato de cobre 0,2 M. Luego se calentó la mezcla en el microondas por 1 minuto en dos series de 30 segundos y se obtuvo la suspensión de CuNPs

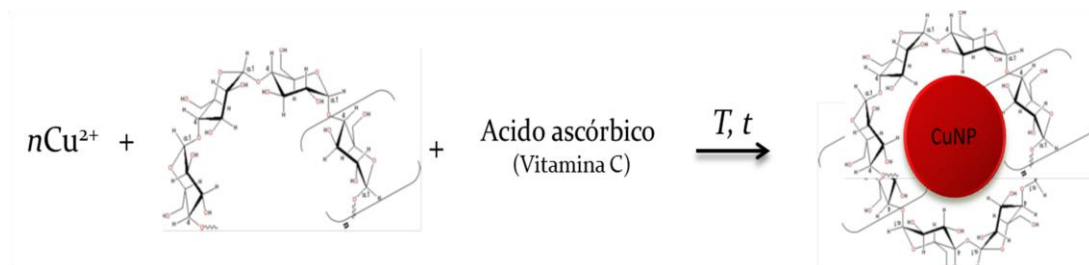


Figura 6: Esquema de la síntesis de CuNPs.

T: Temperatura; t: Tiempo; n: Cantidad de veces de Cu^{2+} .

2.-Preparación de geles, esponjas y esferas a base de NPs/biopolímeros

2. 1. Geles

2. 1. a. Gel AgNP.

Se prepararon geles de Alginato y Quitosano con AgNP.

Alginato: Se disolvieron 1,2 g de Alginato en 41,5 ml de agua destilada formando el gel base, este procedimiento se repitió para obtener 2 geles bases (para cada concentración). Uno de los geles resultantes se mezcló con 25 ml de suspensión de AgNP 400 ppm (para formar el gel de 100 ppm) y el otro con 25 ml de suspensión de AgNP 100 ppm (para formar el gel de 20 ppm). Este procedimiento se realizó a una temperatura entre los 50-55 °C. Una vez obtenidas las soluciones anteriores se procedió a mezclar los geles con 33,2 ml de una solución de gluconato de calcio al 0,6% usada como entrecruzador del polímero, con lo cual se obtuvo la viscosidad adecuada. Se obtuvieron dos geles de Alginato al 2% de 100ml con concentraciones de AgNP de 100 ppm y 20 ppm, respectivamente

Quitosano: Para formar los geles base se disolvieron 1.2 gramos de

Quitosano en 40,95 ml de agua destilada y 0,55 ml de ácido láctico. El resto del proceso es igual al usado en el caso del alginato a excepción del entrecruzador que se reemplazó por polimetafosfato de sodio al 0.3%. Se obtuvieron dos geles de Quitosano al 2%, con concentraciones de AgNP de 100 ppm y 20 ppm, respectivamente.

2. 1. b. Gel CuNP

Se prepararon geles de Alginato y Quitosano con CuNP.

Alginato: Se disolvieron 2,13 g de alginato y 1,06 gr de almidón en 72,2 ml de ac. ascórbico al 10% (solvente) obteniendo el gel base donde se formaron las CuNPs, este procedimiento se repitió para obtener dos geles base. Se agregaron alícuotas de acetato de cobre ($\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) 0,2 M de 838,4 μl para uno de los geles (para formar el gel de 100 ppm) y 168 μl (para formar el gel de 20 ppm) para el otro. Una vez que se obtuvo esta mezcla se procedió a calentar cada gel 1 minuto en dos series de 30 segundos en un microondas, para el proceso de formación de CuNPs. Luego de formadas las CuNPs en los geles, se procedió a mezclarlos con 26 ml de una solución de gluconato de calcio 0,6% (entrecruzador), con lo cual se obtuvieron dos geles de alginato 2% de 106.6 ml con concentraciones de CuNP de 100 ppm y 20 ppm.

Quitosano: Para formar los geles base se disolvieron 2,13 gr de quitosano con los mismos reactivos y cantidades usadas con el alginato. El entrecruzador se reemplazó por polimetafosfato de sodio 0,3% en NaOH 4%, obteniéndose dos geles de Quitosano 2% con concentraciones de CuNP de 100 ppm y 20 ppm.

2.2. Esponjas

Se formaron esponjas de cada gel, de cada nanopartícula y de cada concentración descrita. Se usaron placas con pocillos de 5 ml aproximadamente para depositar el mismo volumen de todos los geles obtenidos en el paso anterior (geles de alginato y quitosano con nanopartículas de plata y cobre a 100 ppm y 20 ppm). Se congelaron a -80°C por un mínimo de 24 horas para luego ser liofilizados por 2 a 3 días y obtener las correspondientes esponjas.

2.3 Esferas

Se prepararon esferas de cada gel, de cada nanopartícula y de cada concentración descrita

2.3.a: Esferas de AgNP/Alginato y AgNP/Quitosano:

Se formaron geles de 100 ml de AgNP/Alginato y AgNP/Quitosano de la misma forma descrita anteriormente y para ambas concentraciones (100 ppm y 20ppm). Estos geles no fueron entrecruzados. El volumen que ocupaba cada entrecruzador con su respectivo gel se reemplazó en ambos casos por el mismo volumen de agua destilada. Una vez formados los geles se cargaron en una jeringa de vidrio de 10 ml y se gotearon verticalmente sobre una solución de 100 ml de gluconato de calcio 0,6% para el gel de alginato y sobre 100 ml de polimetafosfato de sodio 0,3% en NaOH 4% para el gel de quitosano. Las esferas formadas se separaron de la solución a través de un tamiz.

2.3.b: Esferas de CuNP/Alginato y CuNP/Quitosano:

Para sintetizar los geles con CuNP (sin entrecruzar) necesarios para la síntesis de esferas se usó la suspensión de CuNPs 400 ppm obtenida en la síntesis de nanopartículas.

Se formaron geles de 60 ml de CuNP/Alginato y de CuNP/Quitosano para ambas concentraciones (100 y 20 ppm).

Alginato: Se mezclaron 1,2 g de alginato con 25 ml de agua destilada. Se obtuvieron 2 geles base de alginato.

Quitosano Se mezclaron 1,2 gr de quitosano con 24, 45 ml de agua destilada y 0,55 ml de ácido láctico. Se obtuvieron 2 geles base de Quitosano.

Se incorporaron, desde la suspensión de CuNP, 15 ml a uno de los geles base de alginato y quitosano (correspondiente a los geles de 100 ppm) y 3 ml para los otros geles base de ambos biopolímeros (correspondiente a los geles de

20 ppm) previo centrifugado de estos volúmenes, provenientes de la suspensión de CuNPs, por 25 minutos y reemplazo del sobrenadante por agua destilada (eliminación del ácido ascórbico como solvente). Para mantener los volúmenes constantes los 3 ml se completaron con 12 ml de agua destilada.

Una vez que se formaron los geles se agregaron 20 ml de agua destilada para obtener el volumen final de 60 ml y se procedió al goteo de ellos sobre una solución de 60 ml de gluconato de calcio al 0.6% para la formación de esferas de CuNP/Alginato y goteo sobre una solución de 60 ml de polimetafosfato de sodio 0.3% en NaOH 4% para la formación de esferas de CuNP/Quitosano para cada concentración. Las esferas producidas se separarán desde la solución a través de un tamiz

2.4 Controles

Se prepararon como controles geles, esferas y matrices porosas tanto de Alginato como de Quitosano con una concentración del 2% de biopolímeros y sin dopaje de nanopartículas reemplazando con agua destilada el volumen que antes se usaba de suspensiones.

En la **Figura 7** se muestra un resumen de los procedimientos de obtención de las matrices dopadas con NPs. En la **Tabla 3** se resumen todos los sistemas obtenidos mediante los procedimientos anteriores.

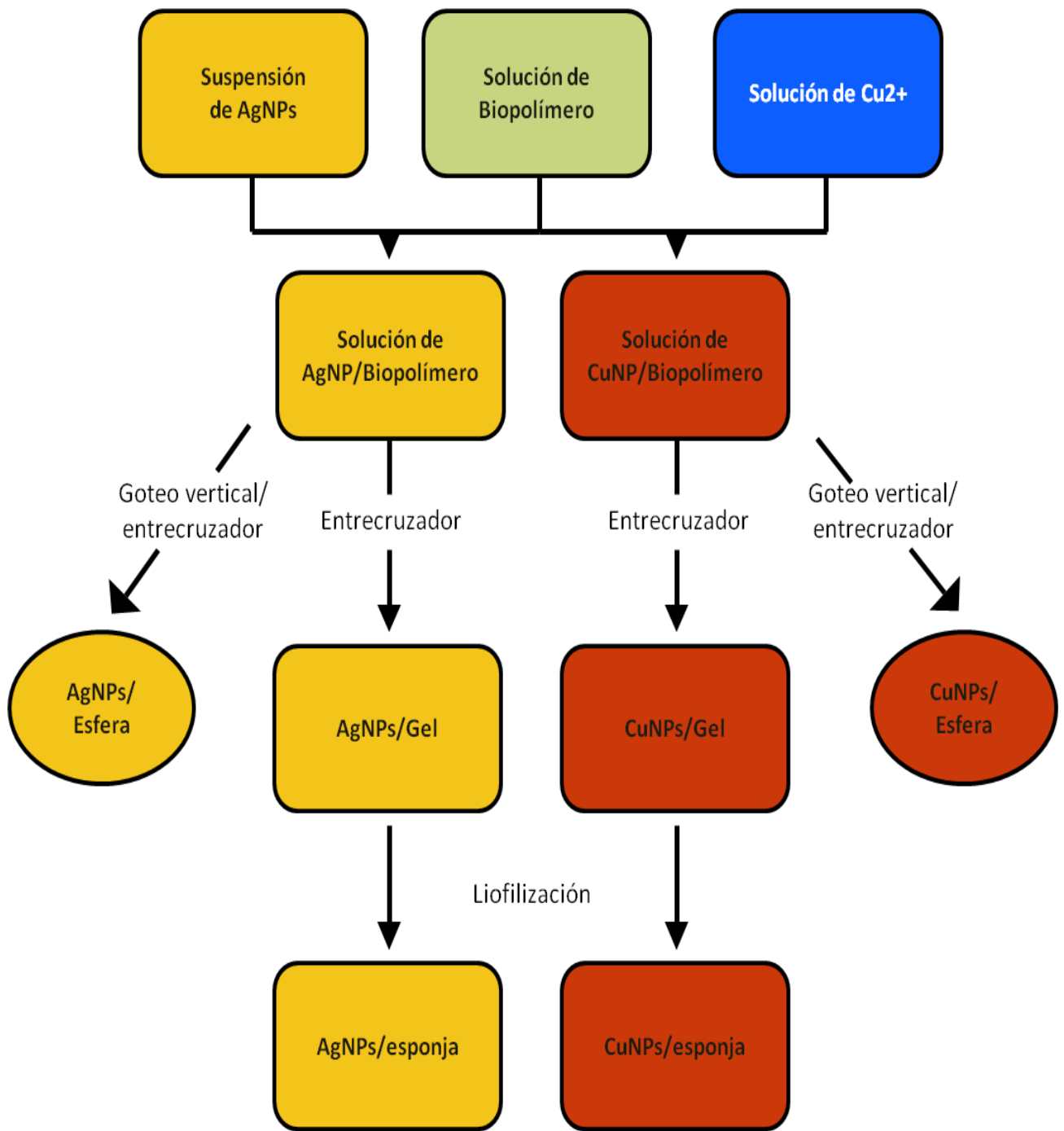


Figura 7. Esquema resumen de la síntesis de las diferentes matrices dopadas con NPs

Tabla 3.Resumen de geles, esponjas y esferas preparados en este trabajo.

Sistema	Concentración de NPs (ppm)	Matriz de biopolímero
Gel AgNP/ALG	20 y 100	Alginato
Esfera AgNP/ALG	20 y 100	Alginato
Matriz porosa AgNP/ALG	20 y 100	Alginato
Gel CuNP/ALG	20 y 100	Alginato
Esfera CuNP/ALG	20 y 100	Alginato
Matriz porosa CuNP/ALG	20 y 100	Alginato
Gel AgNP/QUI	20 y 100	Quitosano
Esfera AgNP/QUI	20 y 100	Quitosano
Matriz porosa AgNP/QUI	20 y 100	Quitosano
Gel CuNP/QUI	20 y 100	Quitosano
Esfera CuNP/QUI	20 y 100	Quitosano
Matriz porosa CuNP/QUI	20 y 100	Quitosano
Gel ALG	(Control)	Alginato
Esferas ALG	(Control)	Alginato
Matriz porosa ALG	(Control)	Alginato
Gel QUI	(Control)	Quitosano
Esferas QUI	(Control)	Quitosano
Matriz porosa QUI	(Control)	Quitosano

3.-Caracterización de las Nanopartículas

3.1 Espectroscopia (UV-Vis).

La aparición de bandas de absorción en el espectro, alrededor de ciertas longitudes de onda indica la presencia de nanopartículas metálicas en el caso de la plata y cobre [14]. Estas bandas se deben a la absorción del plasmón de resonancia superficial (una característica física de las nanopartículas). La absorción del espectro a 420 nm de longitud de onda confirmará la presencia de las AgNPs. En el caso del CuNPs la absorción del espectro a 593 nm de longitud de onda confirmará su presencia. [14]

3.2 Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM).

Mediante este análisis se determinó el tamaño y la morfología de las nanopartículas de AgNP y CuNP. Para la preparación de los especímenes se depositará una gota de la suspensión de AgNP y CuNP sobre la superficie de la grilla de cobre con un film de Formvar, para ser analizada una vez evaporado el solvente. Se utilizó un Microscopio electrónico de transmisión modelo Zeiss m-109 operado a 50 kv.

3.3 Difracción de Rayos X (DRX).

Mediante DRX se identificó la presencia de la nanopartículas metálicas dentro de la matriz de los geles de los biopolímeros. Para esto se utilizó un Difractómetro de rayos X de polvo, modelo SIEMES D 5000 con radiación CuK α .

3.4 Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

La microestructura de las esponjas de 100 ppm de alginato y quitosano con AgNPs y CuNPs, se caracterizó mediante microscopía SEM acoplado a Energía Dispersiva de rayos-X (EDX) en modo de retrodispersión de electrones (back-scattering, BS) para distinguir el contraste de las diferentes NPs y la matriz donde son contenidas. Esto con el propósito de observar el patrón de poros de las esponjas y la disposición de las NPs en la matriz. Para esto, las muestras se metalizaron con una mezcla de oro/platino, y luego, fueron puestas en el porta muestras del microscopio SEM para su observación.

La microscopia SEM-BS permitió observar la composición inorgánica de las matrices así como el patrón de poros de las matrices. Mediante EDX se determinó la composición elemental del compuesto. Para esto se utilizó un Microscopio electrónico de barrido/microanálisis EDS (SEM-EDS) modelo Jeol5410.

4.-Evaluación de las propiedades de inhibición de crecimiento bacteriano de los diferentes sistemas NPs/biopolímeros.

El pH de los geles se ajustó a valores en el rango de 6-6.2 y el de las suspensiones a pH 7. Para la esterilización de todas las muestras se empleó luz UV durante 20 minutos.

Las propiedades bactericidas de los sistemas se evaluaron frente a una cepa clínica de *A. actinomycetemcomitans*, serotipo B, parcialmente caracterizado. Esta bacteria fue sembrada en medio sólido BHI (infusión cerebro-corazón) y luego resuspendida en 5 ml de medio líquido BHI usando como referencia de turbidez una solución Mc Farland 0,5. La bacteria resuspendida se siembra en un medio semi solido de agar agar 0.8% en un volumen de 8 ml (7 ml del medio semisólido y 1 ml de suspensión de *A. actinomycetemcomitans*). Debajo del medio semi sólido se usaron 20 ml de medio sólido BHI (Infusión cerebro-corazón) para asegurar la existencia de nutrientes y crecimiento bacteriano. La actividad bactericida de las muestras fue evaluada respecto a su halo de inhibición. Para este propósito los sistemas dopados con concentraciones de NPs de 100 ppm (geles, esponjas y esferas), sus controles respectivos (biopolímeros sin NPs) y suspensiones acuosas de nanopartículas de 100 ppm (máxima actividad esperada) se pusieron en contacto directo con el medio sólido y semisólido mediante un socavado hecho en las placas de volumen aproximado de 2,5 ml En estas cavidades se depositó un volumen de 2,5 ml de muestra (gel, matriz porosa, esfera, controles o suspensión). Luego de un período de incubación de 48 horas en condiciones anaeróbicas y temperatura 37°C, se evaluó el correspondiente halo de inhibición.

5.- Estudio preliminar de liberación controlada de Ag o Cu.

Se realizó un estudio preliminar de liberación de la nanopartícula metálica desde todos los sistemas cargados con una concentración de nanopartículas de 20 ppm. Esto con el fin de obtener una información preliminar en cuanto a tendencias de liberación de la plata y cobre.

Las cantidades de Ag y Cu liberadas desde los diferentes sistemas fueron analizadas en función del tiempo en una solución buffer tris pH 7.4. Las muestras usadas fueron los geles, esponjas y esferas de AgNP y CuNP de 20 ppm. Los ensayos se realizaron sumergiendo cada muestra (esfera, gel, esponja) en 5 ml de solución buffer tris pH 7.4. Las muestras se incubaron 1 hora a 37°C; una vez cumplido el tiempo se tomaron muestras de 1 ml del sobrenadante de los materiales sumergidos. En las muestras de 1 ml se midieron las concentraciones de Ag o Cu mediante Espectrometría con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo (**ICP-AOE**).

6.- Análisis Estadísticos

Los ensayos de liberación controlada fueron realizados 1 vez.

Los ensayos de las propiedades bactericidas se realizaron 2 veces. Por cada ensayo se usó un duplicado de cada muestra de manera que los resultados obtenidos se expresaron a través de un promedio de las muestras con la correspondiente varianza y desviación estándar asociada a cada una de estas mediciones. A los resultados obtenidos se les aplicó un análisis de desviación estándar con la función estadística Excel.

RESULTADOS

1. Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata y cobre

Utilizando el concepto de “química verde” se logró la síntesis de AgNPs empleando almidón como agente reductor biocompatible y en el caso de las CuNPs, almidón y ácido ascórbico. La formación de las AgNPs se evidenció visualmente por la aparición de un color amarillo característico y propio de las nanopartículas plata (amarillo). Por otro lado, la formación de CuNPs se evidenció de manera visual por la aparición de un color rojizo característico y propio del cobre. Las CuNPs debieron ser resuspendidas mediante agitación magnética antes de su empleo ya que a diferencia de las AgNPs decantaban, no obstante, ambas suspensiones se mostraron estables en el tiempo.

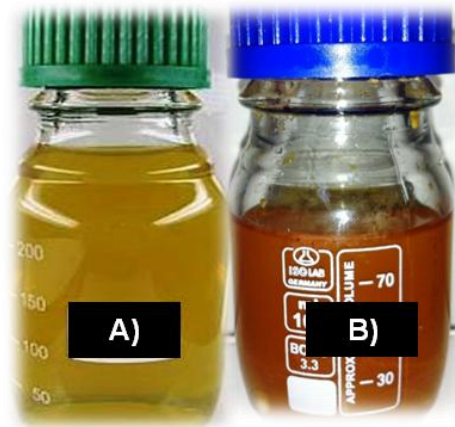


Figura 8. Imágenes de suspensiones. A) AgNPs 100 ppm, b) CuNPs 100 ppm

Se realizó la **caracterización** de las nanopartículas mediante:

1.1 Espectroscopia (UV-Vis).

Las AgNPs sintetizadas exhibieron un máximo de absorción a 432 nm correspondiente al plasmón de resonancia superficial característico de las nanopartículas de plata (**Fig. 9**). Las CuNPs sintetizadas exhibieron un máximo de absorción a 593 nm correspondiente al plasmón de resonancia superficial

característico de las nanopartículas de cobre (**Fig. 10**). Esta es una propiedad física que únicamente exhiben los materiales metálicos cuando presentan dimensiones de tamaño nanométrico. El análisis confirma la formación de ambas nanopartículas.

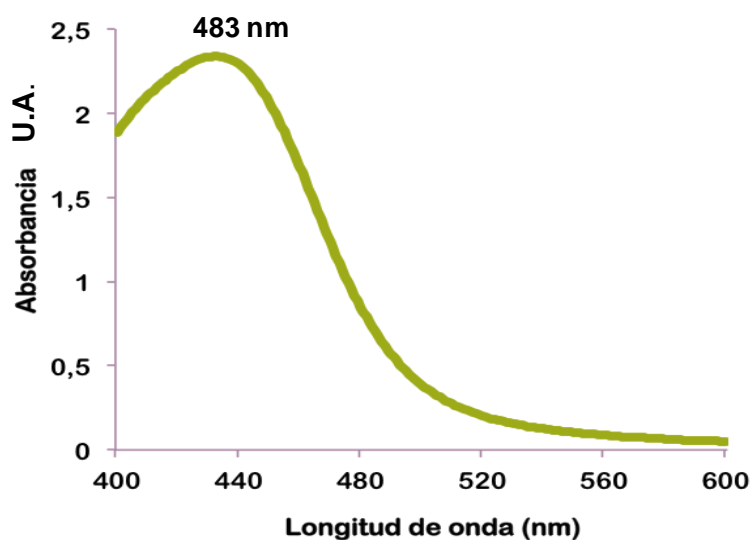


Figura 9. Espectro de absorción de suspensión de AgNP

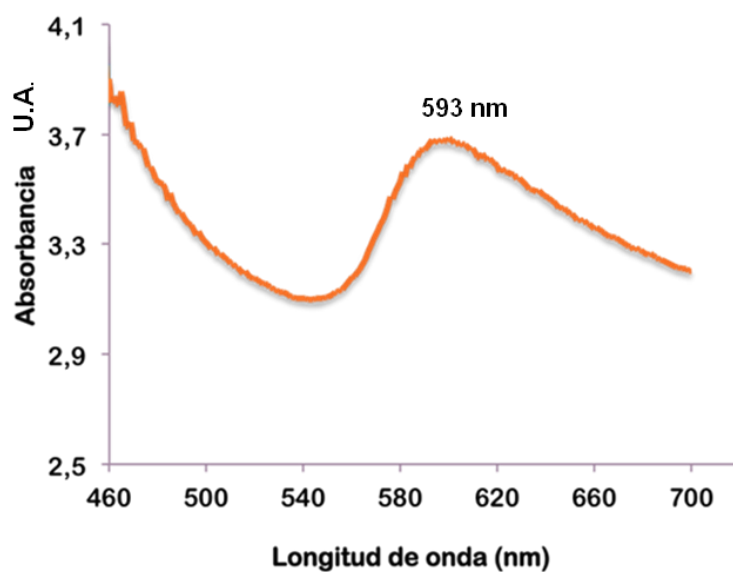


Figura 10. Espectro de absorción de suspensión de CuNP.

1.2 Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM).

Con esta técnica se pudo observar que las AgNP sintetizadas presentaron un tamaño de aproximadamente 10-25 nm, con una morfología variable, redondeada a hexagonal

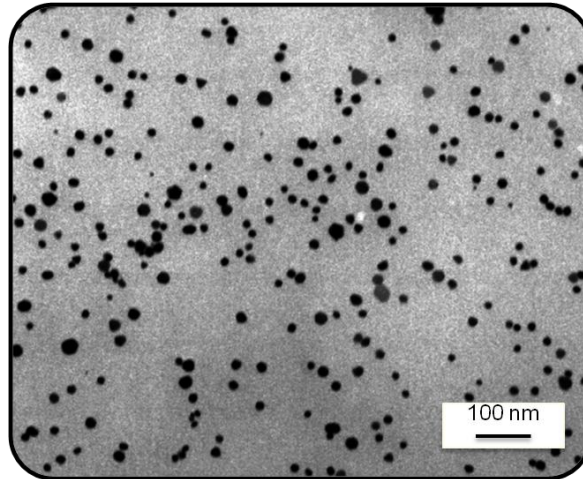


Figura 11. Imagen TEM de AgNP sintetizadas en este trabajo.

Las CuNP sintetizadas presentaron un tamaño de aproximadamente 15-30 nm, con una morfología circular menos regular.

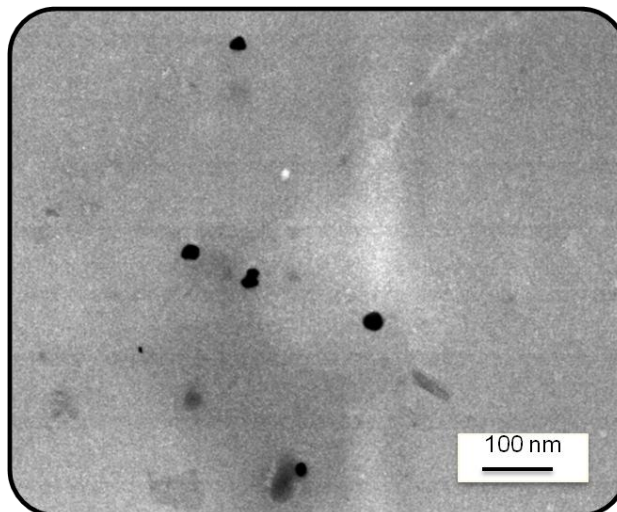


Figura 12. Imagen TEM de CuNP sintetizadas en este trabajo.

2. Preparación de geles, esponjas y esferas a base de NPs/biopolímeros

2. 1. Geles

Se lograron formar geles de alginato y quitosano con nanopartículas de plata y cobre con las concentraciones ya descritas (100 ppm y 20 ppm) (**Fig. 13,14**). Los geles resultaron, en general, homogéneos y de una consistencia adecuada una vez entrecruzados. Los geles de quitosano se presentaron un poco más viscosos que los geles de alginato. Tanto alginato como quitosano mantuvieron de forma homogénea el color representativo de cada metal (rojizo para el cobre y amarillo para la plata), el cual varió dependiendo de las concentraciones usadas, siendo más tenue en los geles de menor concentración (20 ppm).

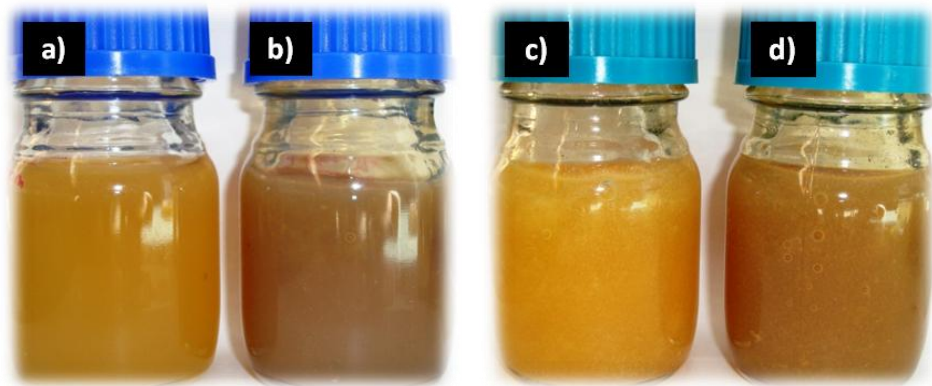


Figura 13. Geles de Alginato a) 20 ppm AgNPs b) 100 ppm AgNPs. Quitosano c) 20 ppm AgNPs y d) 100 ppm AgNPs

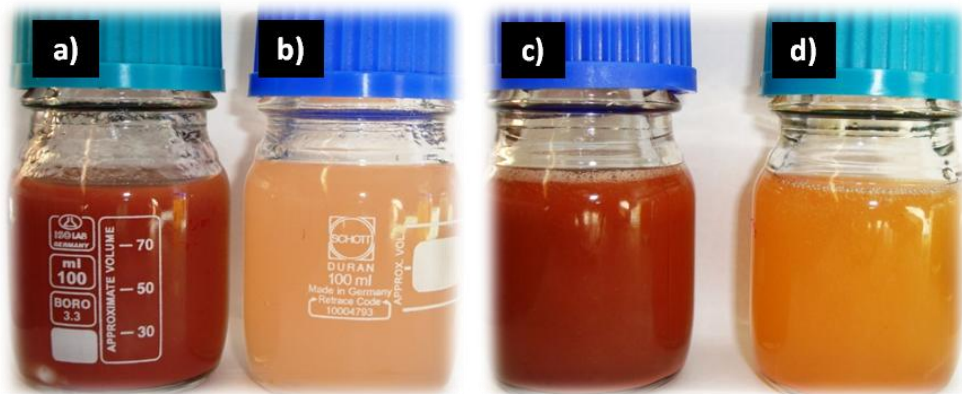


Figura 14. Geles de Alginato, a) 100 ppm CuNPs b) 20 ppm CuNPs. Quitosano c) 100 ppm CuNPs y d) 20 ppm CuNPs

2.2. Esponjas

A partir de los geles y, mediante el proceso de liofilización, se logró la formación de esponjas de Alginato y Quitosano con concentraciones de 100 y 20 ppm de AgNPs y CuNPs (**Fig. 15**). El color de las esponjas, al igual que en los geles, se mantuvo dependiendo del metal y se hizo más tenue al usar las concentraciones bajas (20 ppm). Las esponjas de quitosano fueron un poco más densas que las de alginato, sin embargo, ambas presentaron una porosidad (visual) adecuada y homogénea. Tanto las esponjas de alginato y quitosano fueron físicamente moldeables, siendo matrices que pudieron ser cortadas, aplastadas y manipuladas de manera relativamente simple. Todas las esponjas fueron estables en el tiempo.

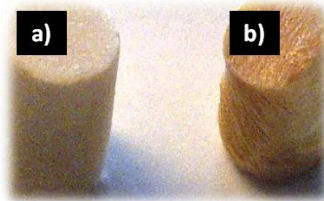


Figura 15. Matrices porosas (esponjas) de alginato 100 ppm, a) AgNP y b) CuNP

2.3 Esferas.

Se lograron formar esferas de alginato y quitosano con plata y cobre a ambas concentraciones ya conocidas (**Fig. 16, 17**). El método expuesto permitió formar esferas regulares entre sí, forma que fue dada por las gotas que se formaban en el goteo vertical de los geles al entrar en contacto con la solución entrecruzante respectiva. El color de las esferas, al igual que en los geles y esponjas, se mantuvo dependiendo del metal usado y varió haciéndose más tenue o más saturado dependiendo de la concentración. Sin embargo, el color de todas las esferas con CuNPs cambió de su color rojizo original a tonos azules después de un tiempo (**Fig. 18**). Las esferas de alginato mostraron brillo, apariencia acuosa y superficie pegajosa. La matriz presentó una relativa baja estabilidad a la manipulación, perdiendo su forma fácilmente. Las esferas de quitosano resultaron de apariencia firme, estable y superficie seca, su forma e integridad se mantuvo pese a ser sometida a diferentes cargas físicas y manipulación.

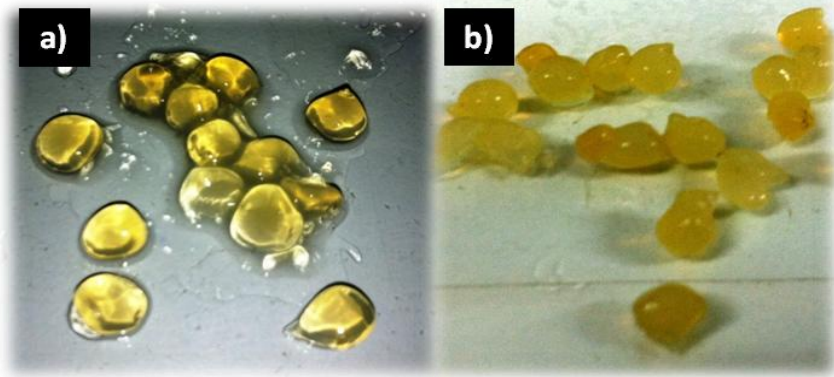


Figura 16. Esferas de AgNPs, a) Alginato 100 ppm, b) Quitosano 100 ppm.

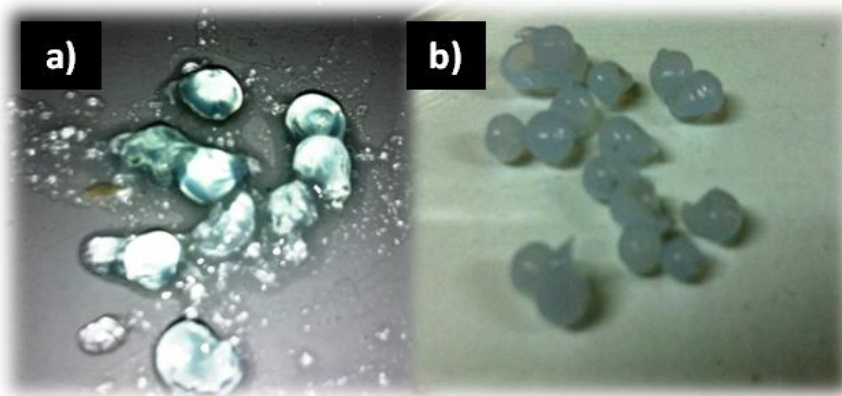


Figura 17. Esferas de CuNPs, a) Alginato 100 ppm, b) Quitosano 20 ppm.

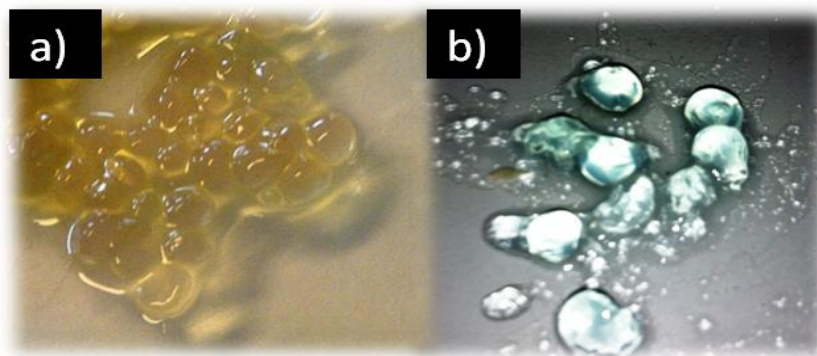


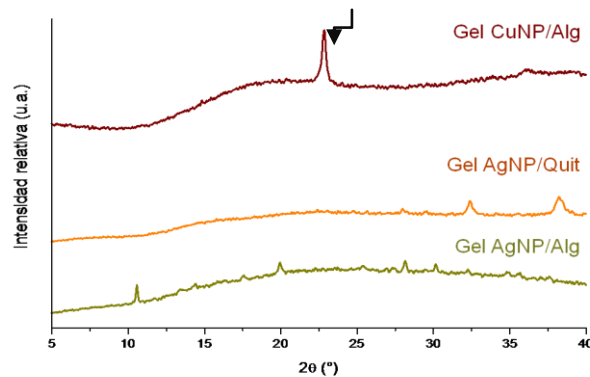
Figura 18. Esferas CuNP-Alginato, a) Esferas inmediatamente después de su formación, b) esferas en función del tiempo

3. Caracterización de nanocompuestos.

3.3 Difracción rayos-X

El análisis de difracción de rayos X de algunas muestras permitió detectar a las NPs en los geles, de los cuales, por diferentes procesos, se formaron las esponjas y esferas (**Gráfico 1**). Cada uno de los picos que se observan corresponden a señales producidas por la estructura cristalina de la partícula metálica presente en la matriz del biopolímero, confirmando la presencia de AgNPs y CuNPs en las matrices.

Gráfico 1. Análisis de DRX de algunas muestras de nanocompositos.



3.4 Microscopía SEM/EDX

Las imágenes obtenidas por SEM (**Fig. 19**) muestran que en general existe una porosidad en las matrices, la cual se puede apreciar de forma más clara en el quitosano. La imagen obtenida por SEM en contraste de fase (back-scattering) muestra que las AgNPs y CuNPs se distribuyen en forma aleatoria en las matrices (puntos brillantes de alta densidad), no existiendo un patrón definido de disposición espacial. Se puede observar que existe una aglomeración de NPs debido al tamaño de las partículas encontrado, el cual excede al de las nanopartículas en las suspensiones. Con el microanálisis de energía dispersiva de rayos-X (EDX), ensayo acoplado a SEM, se determinó la composición elemental del nanocomposito en un punto específico de la muestra (en círculo rojo). En todos estos puntos se comprobó la naturaleza de la nanopartícula incorporada en la

matriz del biopolímero (Ag ó Cu)

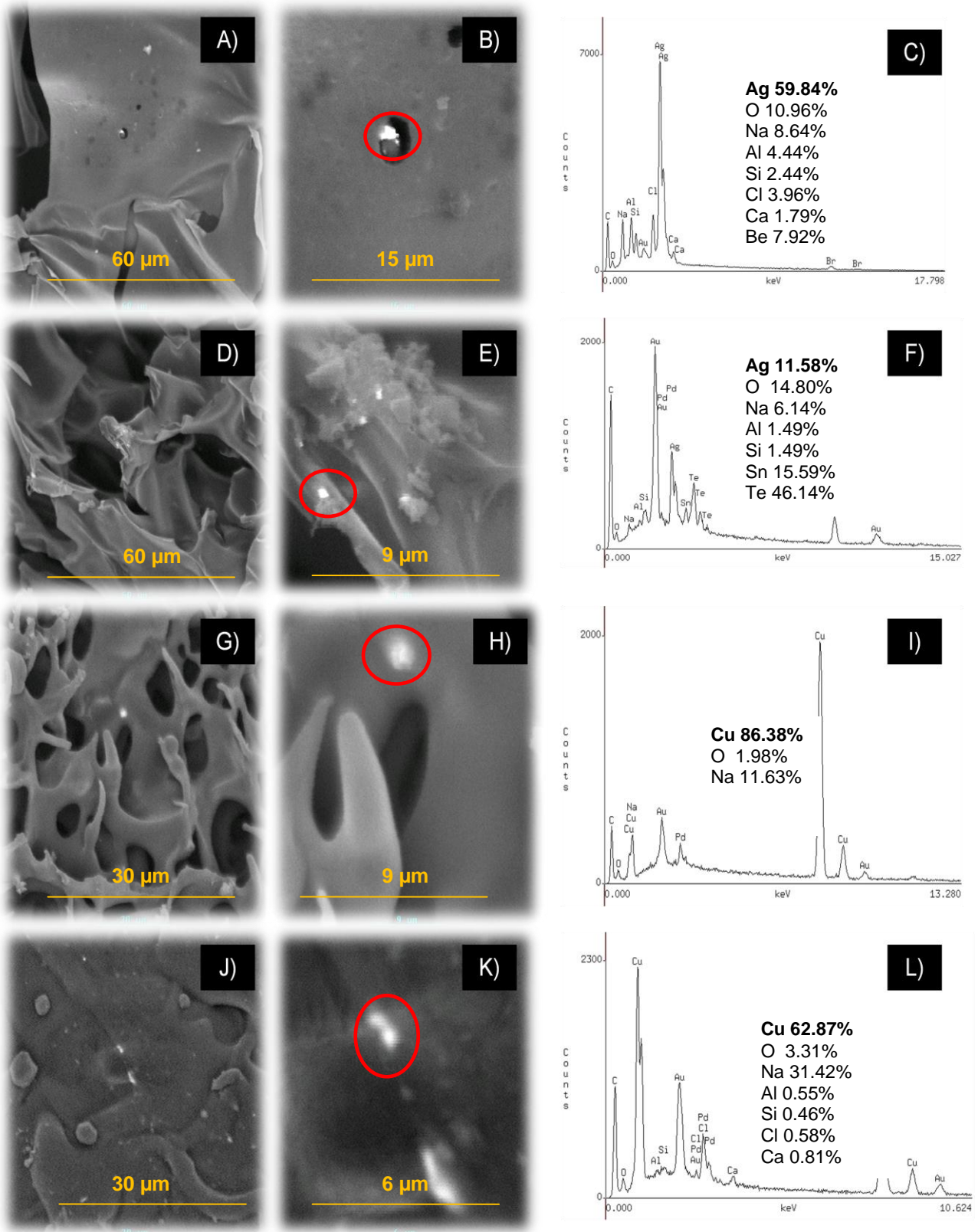


Figura 19. Imágenes BS-SEM de (A-C) AgNPs-ALG, (D-F) AgNPs-QUIT, (G-I) CuNPs-QUIT, (J-L) CuNPs-ALG.

4. Evaluación de las propiedades de inhibición de crecimiento bacteriano los diferentes sistemas NPs/biopolímeros.

Las propiedades bactericidas de los sistemas fueron evaluadas respecto a los halos de inhibición obtenidos en las diferentes placas. Los resultados mostraron que al comparar ambas suspensiones, el cobre tuvo mayor actividad bactericida que la plata. Todos los sistemas con nanopartículas, y todas las presentaciones de estos sistemas (esponja, esfera y gel), ejercieron actividad bactericida en mayor o menor grado. En todos los casos, el halo de inhibición fue siempre menor al obtenido con las suspensiones de nanopartículas. Los controles de alginato no mostraron actividad alguna, al contrario de los controles de quitosano, que si presentaron actividad bactericida para todas sus formas. En la **Figura 20** se muestran los halos representativos de las suspensiones puras de plata y cobre.

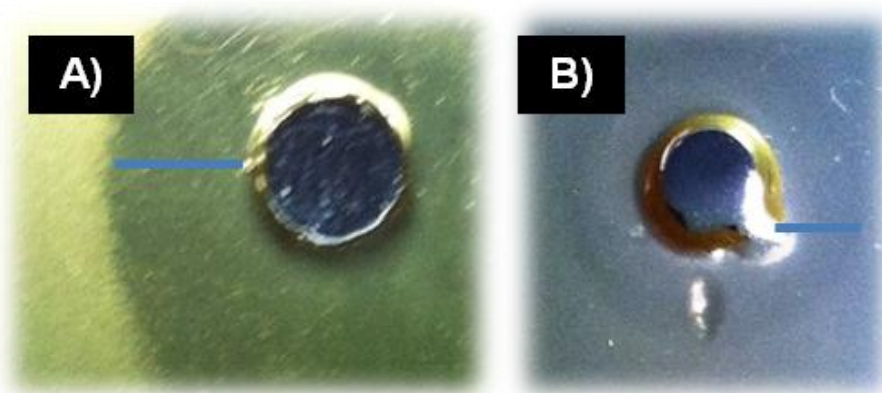


Figura 20. Halos de inhibición de las suspensiones acuosas de A) AgNPs 100 ppm y B) CuNPs 100 ppm

En las **Figuras 21 y 22** se muestran las imágenes de los halos de inhibición representativos de los diferentes sistemas y presentaciones: Esponja de ALG con AgNP (AEspAg) o CuNP (AEspCu) y control puro (AEspCon). Esfera de ALG con AgNP (AEsfAg) o CuNP (AEsfCu) y control puro (AEsfCon). Gel de ALG con AgNP (AGelAg) o CuNP (AGelCu) y control puro (AGelCon). Para las matrices de quitosano se usa la misma nomenclatura reemplazando la primera letra de las definiciones con Q. (QEspAg), (QEspCu), (QEspAg), etc.

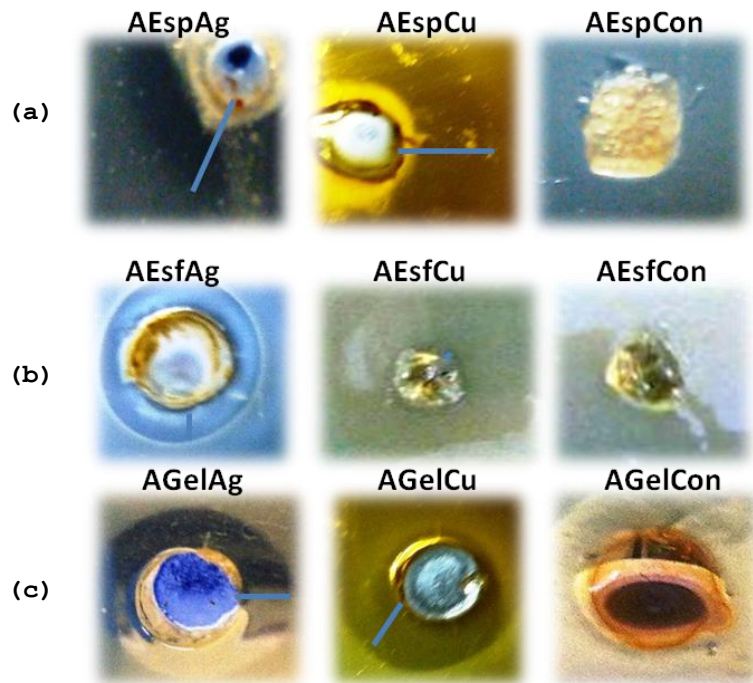


Figura 21. Halos de inhibición de los sistemas de alginato:(a) esponjas, (b) esferas y (c) geles

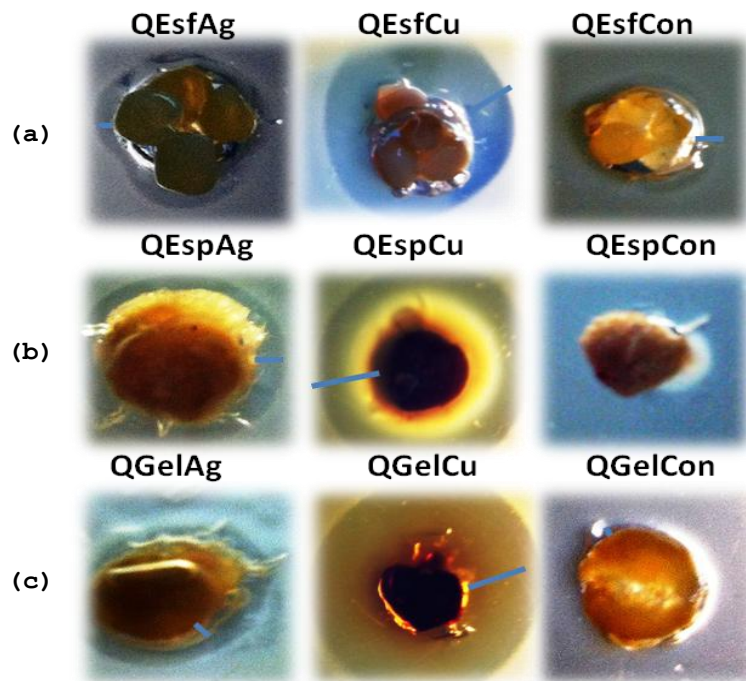


Figura 22. Halos de inhibición de los sistemas de quitosano:(a) esponjas, (b) esferas y (c) geles

Las mediciones de los resultados de los halos de inhibición se muestran **Tablas 4 y 5.**

Tabla 4. Resultados de los halos de inhibición (HI) de las suspensiones en promedio y su desviación estándar (S)

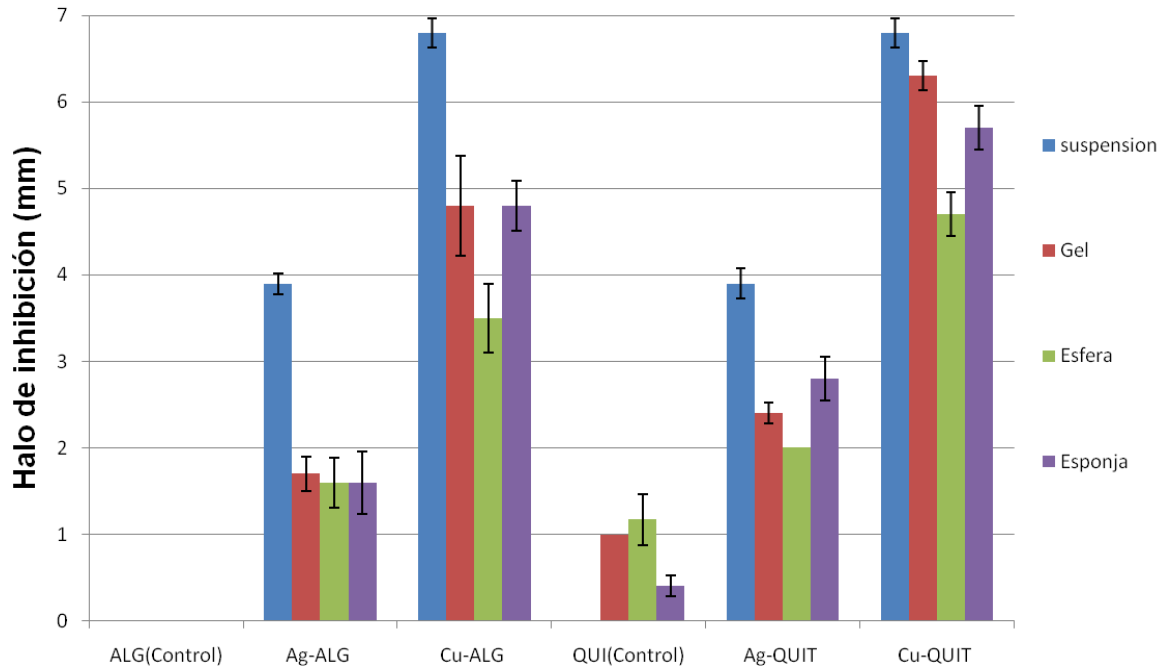
	Halo de Inhibición (mm)	Desviación. St.
Suspensión AgNPs 100 ppm	3,93	0,12
Suspensión CuNPs 100 ppm	6,80	0,25

Tabla 5. Resultados de los halos de inhibición (HI) de los sistemas biopolímero/NPs y controles en promedio y su desviación estándar (S)

	Gel		Esfera		Esponja	
	H.I (mm)	S	H.I (mm)	S	H.I (mm)	S
Alg-Control	0	0	0	0	0	0
AgNP-Alg	1,70	0,2	1,63	0,29	1,60	0,36
CuNP-Alg	4,83	0,58	3,27	0,40	4,83	0,29
Qui-Control	1	0	1,17	0,29	0,43	0,12
AgNP-Qui	2,43	0,12	2,0	0	2,77	0,25
CuNP- Qui	6,40	0,17	4,73	0,25	5,73	0,25

En el **Gráfico 2** se comparan los halos de inhibición de todos los sistemas estudiados. Los valores de cada sistema (nanocomposito o control) se compara con su máxima inhibición posible, determinada por el halo de inhibición de la suspensión pura de la nanopartícula (100 %).

Gráfico 2. Valores de halos de inhibición de los diferentes nanocompositos y de los controles de biopolímeros puros.

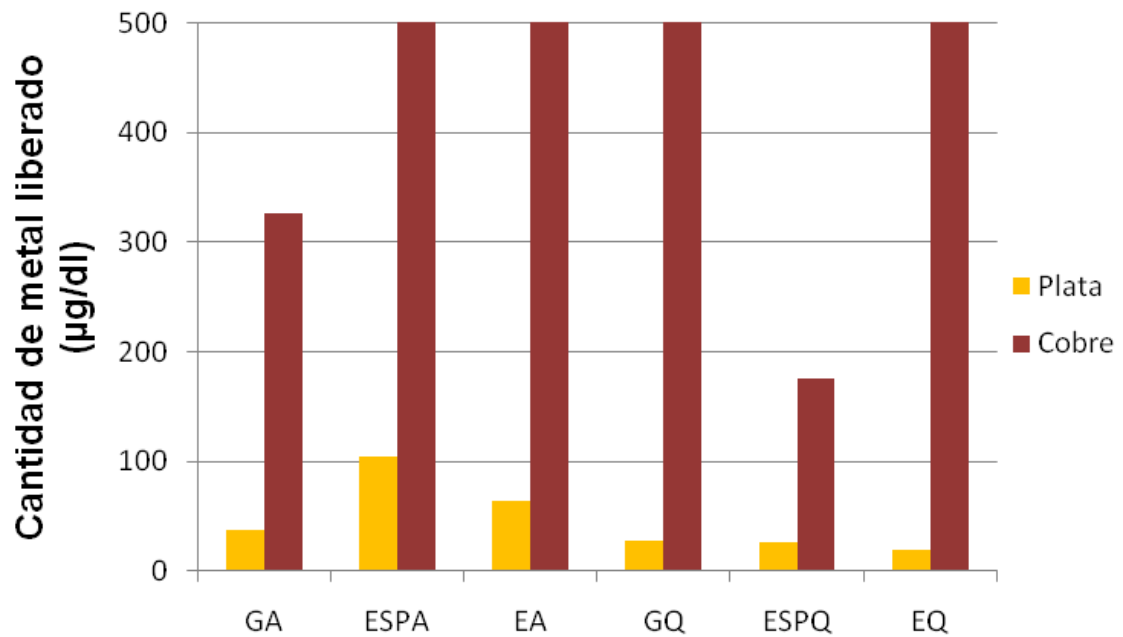


Se observan en general diferencias en cuanto a la actividad de los sistemas con cobre por sobre los que contienen plata. Con respecto al tipo de biopolímero, los nanocompositos a base de quitosano presentaron mayor actividad que aquellos preparados con alginato. En general, considerando la forma del nanocomposito, la actividad de las esferas (sistemas encapsulados) fue menor a la presentada por las esponjas y geles, cuya actividad al compararse entre ellas fue variable.

5. Estudio preliminar de liberación controlada de Ag o Cu.

Los resultados del estudio preliminar de liberación controlada se muestran en el **Gráfico 3**. Se observó liberación de plata y cobre en todas las presentaciones. Sin embargo, la liberación de cobre liberada desde todos los sistemas fue en todos los casos ampliamente superior a la cantidad liberada de plata

Gráfico 3. Liberación controlada de plata y cobre desde los diferentes sistemas luego de 1 hr de inmersión en los medios.



DISCUSIÓN

En el presente trabajo se sintetizaron geles, esponjas y esferas de alginato y quitosano con nanopartículas de plata y cobre a concentraciones de 100 y 20 ppm. Se encontró una correcta síntesis, caracterización y estabilidad de los sistemas, probando de manera preliminar su actividad bactericida y la liberación controlada de nanopartículas desde las diferentes matrices. Se evaluó la actividad bactericida de estas presentaciones con el fin de compararlas y poder encontrar el mejor vehículo de liberación controlada de los antimicrobianos inorgánicos (plata o cobre), así como una acción antimicrobiana eficiente y sostenida en el tiempo para posibles aplicaciones en terapia periodontal localizada.

Se logró la síntesis de suspensiones AgNPs y CuNPs mediante el empleo de agentes reductores biocompatibles (“química verde”), que permitieron en una parte la reducción de las NPs y por otra parte, mejorar la estabilidad de las suspensiones. Al caracterizarlas se pudo verificar que las NPs formadas correspondían precisamente a plata y cobre (plasmón de resonancia superficial) y además, que ambas presentaron un tamaño y morfología relativamente similar (~ 15-30 nm) (TEM). Estos resultados están de acuerdo con aquellos obtenidos por otros autores cuyos reactivos se han caracterizado por ser biocompatibles [16, 19,20]. Aunque similares en morfología y tamaño, se observó que las CuNPs, a diferencia de las AgNPs, son más propensas a decantar en solución acuosa y por lo tanto deben ser resuspendidas mediante agitación magnética al ser incorporadas en los diferentes sistemas. Sin embargo, en el presente trabajo, se consiguió mejorar la estabilidad de las suspensiones de CuNPs, utilizando almidón como dispersante de las nanopartículas. Las AgNPs mostraron una completa estabilidad en las suspensiones así como en los diferentes sistemas en los cuales fueron incorporadas

En cuanto a la preparación de los nanocompositos en la forma de geles, esponjas y esferas, ya sea utilizando alginato o quitosano, todos los procedimientos resultaron satisfactorios. La naturaleza física de los biopolímeros difirió a favor del quitosano, donde la viscosidad de los geles y la apariencia y resistencia mecánica de las esferas fue notablemente superior a su contraparte en

alginato. Esta situación puede deberse al entrecruzador usado en cada caso, ya que el quitosano utiliza el polimetafosfato de sodio cuyos enlaces generados, si bien iónicos como el entrecruzador de alginato (el ión Ca^{2+}), son más numerosos y complejos que el Ca^{2+} , resultando un gel más estable y esferas físicamente más resistentes. Las esponjas de alginato y quitosano no tuvieron mayores diferencias entre sí.

En relación a los nanocompositos, se encontró que las nanopartículas metálicas en ellos, presentan la misma estabilidad que en sus respectivas suspensiones. A diferencia de las AgNPs, las CuNPs, si bien estables dentro de las matrices, mostraron un cambio de coloración evidente en función del tiempo en las presentaciones de esferas de alginato y quitosano. De la misma manera en que la coloración de las esferas con CuNPs cambió, los geles, en particular de alginato, cambiaron levemente su viscosidad resultando más fluida que su contraparte con plata. Esta aparente inestabilidad de los sistemas con cobre se podría explicar por el mismo proceso de formación de las CuNPs. La **Figura 23** muestra las reacciones de reducción de los metales. El potencial redox expresado en Volts, indica la capacidad que tiene el ion metálico para reducirse y formar el metal (en este caso la nanopartícula metálica). Como el cobre tiene menor potencial redox (0,34 V), su reducción es más difícil que la de la plata. Al contrario, la oxidación del cobre es más favorecida que la de la plata.

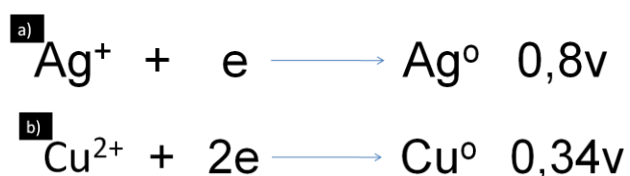


Figura 23. Reacciones redox y formación de nanopartículas, a) Plata, b) Cobre.

Esta menor estabilidad del cobre, dada por su inclinación a la re-oxidación, podría generar iones Cu^+ y Cu^{2+} en las esferas y geles (ya que están en solución) lo cual podría explicar el cambio de coloración en las esferas así como la disminución de la viscosidad en los geles de alginato, probablemente debido a un potencial desplazamiento que los iones monovalentes Cu^+ harían sobre los iones Ca^{2+} que actúan como entrecruzador del alginato.

En relación a los ensayos de actividad bactericida, se encontraron diferencias entre las suspensiones de plata y cobre, donde este último tuvo una considerable mayor actividad que la plata. Estos resultados, podrían indicar que *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sea una bacteria particularmente más susceptible al cobre que a la plata. La sensibilidad de las bacterias a las nanopartículas varía dependiendo de la especie microbiana [36]. Adicionalmente, esta mayor actividad encontrada puede deberse a la misma inestabilidad o tendencia a oxidarse del cobre, la cual podría estar aumentando la cantidad de iones generados y por otro lado formando pequeñas capas de óxido en la superficie de cada clúster de CuNPs [40]. Se conoce que estos óxidos de cobre que aumentan el efecto bactericida mediante interacciones bioeléctricas con las bacterias, situación que en la plata, por su potencial redox, no se daría al mismo nivel [35]. Cabe destacar que todas las suspensiones de NPs se usaron a pH neutro, sin embargo de manera adicional, se probaron las suspensiones con los valores de pH originales. Las CuNPs presentaron inicialmente un pH ácido (pH 1.8) y las AgNPs pH neutro, sin embargo, el cobre ya sea con pH 7 o pH 1.8 muestra exactamente la actividad antimicrobiana. Esto indica que la suspensión mata la bacteria por las propiedades del metal, y no por efecto del pH del medio.

En cuanto a los controles de alginato y quitosano, existen diferencias de actividad bactericida a favor del quitosano en todas sus presentaciones versus el alginato que no presentó actividad. Estos resultados son en parte esperados ya que el quitosano, a diferencia del alginato, posee reconocidas propiedades antibacterianas [37]. Las propiedades bactericidas del quitosano provienen de su estructura química, en particular de los grupos funcionales hidroxilo (OH-) y amino NH₂- (naturaleza policationica) presentes en ella.

Al comparar la actividad de las NPs en los nanocompositos con la de las nanopartículas puras, se pueden apreciar diferencias a favor de la actividad bactericida de las suspensiones puras. Estos resultados concuerdan con lo que se espera de los diferentes sistemas de biopolímeros/NPs (nanocompositos) y sus diversas presentaciones (sea gel esponja y esfera), donde cada matriz controla la liberación paulatina de las nanopartículas. De la misma manera y de forma esperada, los sistemas de biopolímeros-NPs mantuvieron al cobre con efectos superiores, por sobre la plata. En este mismo punto se notan diferencias de

actividad bactericida a favor de los sistemas de quitosano cargados con AgNP ó CuNP, por sobre las mismas preparaciones con alginato. Esto se explicaría por un efecto de potenciación entre la actividad bactericida de las NPs y la actividad bactericida propia y ya discutida del quitosano. Además de este efecto de potenciación, el quitosano presentó gran estabilidad física, estabilidad exhibida tanto con su entrecruzador como con las nanopartículas. Al analizar las diferentes presentaciones de los nanocompositos, se puede ver que las esferas, a excepción del sistema Ag-ALG, presentaron una menor actividad bactericida que los geles y esponjas, cuya actividad varió entre ellas. Es posible que sistemas encapsulados como las esferas presenten una liberación más controlada, manteniendo la actividad de las nanopartículas y permitiendo una biodegradación más gradual de su matriz. Las esferas al estar encapsuladas con un porcentaje importante de agua (en solución) y protegidas físicamente, podrían estar actuando como pequeñas capsulas que liberan NPs de forma paulatina y controlada. Además, al ponerse en contacto con los diferentes medios mantendrían una alta integridad física, lo que aseguraría una liberación sostenida de las nanopartículas. Esto evitaría que la acción bactericida sea de corto efecto, característica de matrices que se degradan de manera anticipada. Esto en contraste con los geles y esponjas cuyas matrices al no estar protegidas como las esferas, se ven notoriamente modificadas por los diferentes medios en los cuales se depositan. Al comparar las esferas de alginato y quitosano queda en evidencia que las esferas de quitosano, dada la naturaleza de su solución entrecruzante (más complejo), forman una encapsulación más eficiente que las de alginato. Las esferas de este biopolímero, como ya se ha comentado, son menos estables que las esferas de quitosano, lo cual podría explicar en parte porque el sistema Ag-ALG no tuvo diferencias entre sus distintas presentaciones.

En cuanto a los ensayos preliminares de liberación controlada, estos se realizaron con el objetivo de poder tener una idea de la cantidad de nanopartícula liberada por cada matriz en contacto con un medio líquido. En el caso de los sistemas con AgNPs se puede apreciar un relativo equilibrio entre todos los sistemas, donde la menor liberación está dada por las esferas de quitosano. En el caso de los nanocompositos con CuNPs, todos ellos liberan cantidades mucho mayores en comparación a los sistemas con AgNPs. Cabe destacar que estos

resultados son medidos luego de 1 hora de sumergir los diferentes sistemas en medios acuosos, mientras que los experimentos de actividad bactericida a las 48 hrs. Deberían, por lo tanto, realizarse en el futuro, ensayos de liberación controlada usando periodos más prolongados de tiempo, para obtener conclusiones más definitivas respecto al comportamiento de liberación de los sistemas.

Dentro de la información obtenida es posible observar ciertas tendencias en cuanto al comportamiento de los metales en los sistemas donde el cobre tiene una mayor y dramática diferencia de liberación en relación a la plata, situación que puede ser consecuencia de la inestabilidad del cobre como nanopartícula, como fue antes discutido. La plata por otro lado mantiene niveles relativamente constantes de liberación entre sus presentaciones, hecho aun más marcado en las presentaciones de quitosano lo cual podría deberse a la naturaleza noble de la plata y su fuerte estabilidad una vez que las nanopartículas se forman así como a la estructura química del quitosano entrecruzado. La Espectrometría con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo (**ICP-OES**) es una técnica de análisis inorgánico que es capaz de detectar concentraciones muy pequeñas de elementos pero no distingue si están en forma iónica o estado metálico. Por lo tanto es complejo poder definir qué porcentaje realmente se encuentra como nanopartícula o ion en las muestras liberadas por los diferentes sistemas.

Queda en evidencia que la menor estabilidad del cobre puede aumentar sus propiedades bactericidas así como a la vez alterar su liberación desde las matrices. Por otro lado, la plata, con importantes propiedades antimicrobianas, muestra también una gran estabilidad química.

Es importante mencionar que la plata, en comparación a otros metales, es muy poco tóxica para las células humanas y se usa a concentraciones muy bajas in vivo. Se ha demostrado que las AgNPs han inhibido a *Cándida albicans* a concentraciones de 0,2 µg/ml lo cual es marcadamente menor que las concentraciones necesarias para exhibir toxicidad en los fibroblastos humanos (30 µg/ml) [35, 37]. En el caso de las CuNPs, en un estudio *in vitro* en el que se evaluaron 24 distintas nanopartículas se llegó a la conclusión de que las más tóxicos para fibroblastos y macrófagos son el cobre y el zinc, estos solo necesitan una concentración de alrededor de 15 µg/ml para producir alteraciones en las células

[15]. Aunque no existen muchos estudios al respecto se ha logrado establecer que la mayor toxicidad del cobre viene de la alta generación de iones Cu^{+2} . Sin embargo, se ha demostrado que nanopartículas insertas en matrices biopoliméricas, como las del presente trabajo, pueden presentar actividad antimicrobiana en las bacterias mientras que las células eucariontes se mantienen indemnes [19]. El propósito de incorporar las NPs en matrices de biopolímeros, por un lado persigue disponer de un sistema de acción antimicrobiana controlada; pero también debería mejorar la cito y biocompatibilidad de estos agentes antimicrobianos. Es por ello, que es de vital importancia seguir investigando el comportamiento de estos sistemas, que consideren también ensayos de citocompatibilidad de estas nanopartículas.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede suponer que el uso de biopolímeros como quitosano y alginato se presentan como alternativas viables de uso como vehículos de liberación controlada de antimicrobianos inorgánicos como AgNP y CuNP. Estos sistemas podrían constituirse en nueva alternativa para la terapia antimicrobiana localizada. En el caso de la periodontitis, estos sistemas evitarían los inconvenientes que actualmente conlleva el uso las terapias sistémicas y/o los antibacterianos tópicos clásicos.

CONCLUSIONES

- El método estudiado en este trabajo, utilizando reactivos biocompatibles como almidón (reductor y estabilizante) y ácido ascórbico , permite la formación de nanopartículas de plata y cobre de manera satisfactoria y con características compatibles para aplicaciones biomédicas.
- La incorporación de las NPs en biopolímeros tales como alginato y quitosano, permite preparar materiales nanocompuestos en la forma de geles, esponjas y esferas, los cuales presentan distinta estabilidad química
- Las suspensiones acuosas de AgNPs y CuNPs (partículas puras) exhiben un claro efecto antimicrobiano, donde el cobre, a las mismas concentraciones que la plata, mostró mejores propiedades contra *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.
- Todos los sistemas biopolímero-NPs exhiben efecto antimicrobiano y presentan una liberación controlada atribuible a la degradación gradual de la matriz donde se contienen la nanopartículas. Las esferas, en especial de quitosano, presentan mayor estabilidad que los geles y esponjas así como una actividad antimicrobiana más controlada.
- El quitosano mostró propiedades bactericidas propias y ventajas físicas considerables en comparación al alginato; además de presentar mayor estabilidad en función del tiempo. Se apreció una actividad sinérgica entre el quitosano y las nanopartículas así como una mayor actividad de los compósitos de cobre por sobre los plata, situación concordante con lo mostrado por las suspensiones puras de la NPs.
- La mayor actividad bactericida de las CuNPs tanto puras como en combinación con los biopolímeros, se atribuye a su mayor capacidad a formar iones en solución (oxidarse) que la plata, así como probablemente por alguna especificidad frente A.a.

- El ensayo preliminar de liberación controlada muestra que la plata se libera de forma relativamente homogénea desde los diferentes sistemas, siendo en el quitosano donde se registran los menores niveles. Por otro lado, la liberación de cobre es más alta que la de plata, lo cual podría estar relacionado con su menor estabilidad.
- El uso de biopolímeros (alginato y quitosano) como vehículos de liberación controlada de antimicrobianos inorgánicos como AgNP y CuNP aparecen como una alternativa promisorio para el tratamiento antimicrobial localizada. En el caso de la periodontitis, estos sistemas podrían evitar los inconvenientes asociados a las terapias sistémicas y/o al uso de antibacterianos tópicos clásicos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ando ES y cols (2010). Immune response to Cytolethal Distending Toxin of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in Periodontitis Patients. *J Periodont Res.*; 45: 471-80.
2. Comprehensive Periodontal Therapy: A Statement by the American Academy of Periodontology. [www.joponline.org/doi/pdf/10.1902/jop.2011.117001\(3/03/2013\)](http://www.joponline.org/doi/pdf/10.1902/jop.2011.117001(3/03/2013))
3. David Herrera, Bettina Alonso y cols. (2008) Antimicrobial therapy in periodontitis: the use of systemic antimicrobials against the subgingival biofilm
4. Dongwei Wei a, Wuyong Sun b, (2009). The synthesis of chitosan-based silver nanoparticles and their antibacterial activity. *Carbohydrate Research* 344 2375–2382 Chitosan-Ag nanop
5. E.M. Zactiti, T.G. Kieckbusch. (2006). Potassium sorbate permeability in biodegradable alginate films: Effect of the antimicrobial agent concentration and crosslinking degree. *Journal of Food Engineering* 77 462–467.
6. Flores R. Roberto. (2011). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Rev Chil Infect*; 28 (6): 579-580.
7. Giovanni E. Salvi, Andrea Mombelli y cols. (2002) Local antimicrobial therapy after initial periodontal treatment A randomized clinical I comparing three biodegradable sustained release polymers. *J Clin Periodontol* 2002: 29: 540–550
8. <http://www.ipt.arc.nasa.gov/nanotechnology.html> (19/10/2012)(Nasa.)
9. http://www.iqb.es/d_mellitus/medico/guias/g15/g15_10.htm (19/10/2012)
10. Jae Hyung Park, Gurusamy Saravanakumar y cols. (2010). Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives. *Advanced Drug Delivery Reviews* 62 28–41
11. Jayesh P. Ruparelia, Arup Kumar Chatterjee. (2008) Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Acta Biomaterialia* 4, 707–716
12. J. F. Hernández-Sierra, F. Ruiz, D. y cols. (2008). The antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans* to nanoparticles of silver, zinc oxide, and gold. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 4 237–240.

13. J. Morones, J.L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J. Kouri, J. T. Ramírez, *et al.*, (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 16,2346-2353.
14. Kapoor, S (1998). Preparation, characterization and surface modification of silver nanopartículas. *Langmiur*, 14, 1021-25.
15. Lanone S, Rogerieux F, Geys J, Dupont A, Maillot-Marechal E, Boczkowski J y cols (2009). Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines. *Part Fibre Toxicol*.
16. Mahendra Rai, Alka Yadav, Aniket Gade (2009) Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology advances*. Jan-Feb; 27(1): 76-83
17. Marambio-Jones Catalina • Eric M. V. Hoek (2010). A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *J Nanopart Res* 12: 1531–1551.
18. Mario Castillo-Ruiz, Enrique D. Vinés y cols. (2011). Isolation of a Novel Aggregatibacter actinomycetemcomitans Serotype b within a Biofilm Bacteriophage Capable of Lysing Bacteria actinomycetemcomitans Serotype b [isolation of a novel].
19. Mayur Valodkar, Puran Singh Rathore y cols. (2012) Cytotoxicity evaluation and antimicrobial studies of starch capped water soluble copper nanoparticles
20. Mayur Valodkar, Shefaly Modi y cols. (2011) Synthesis and anti-bacterial activity of Cu, Ag and Cu–Ag alloy nanoparticles: A green approach
21. Melaiye AYW (2005). Silver and its application as an antimicrobial agent. *Expert Opin Ther Pat*; 15:125–130.
22. Mintz KP, Fives-Taylor PM. (1994). Identification of an immunoglobulina Fc receptor of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun.*; 62(10):4500-4505.
23. N. Cioffi AE N. Ditaranto y cols. (2005) Synthesis, analytical characterization and bioactivity of Ag and Cu nanoparticles embedded in poly-vinyl-methyl-ketone films.
24. N. Vigneshwaran, R. P. Nachane y cols. (2006). A novel one-pot ‘green’ synthesis of stable silver nanoparticles using soluble starch. *Carbohydrate Research* 341, 2012–2018.
25. Papone VY, Morteo G. (2005). Un Patógeno Periodontal Virulento *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Actas Odontol*; 2 (1): 43-50.

26. Parameters of care (2000). All parameters of care. *Journal of Periodontology* volume 71; Number 5
27. Percival SL, Bowler PG, Russell D (2005). Bacterial resistance to silver in wound care. *J Hosp Infect*, 60: 1–7
28. Position paper. (2000) The Role of Controlled Drug Delivery for Periodontitis. *J periodontal* 2000; 71:125-140
29. Position paper (2001). Treatment of Plaque-Induced Gingivitis, Chronic Periodontitis, and other clinical conditions. *J periodontal* 2001; 72:1790-1800
30. Position paper. (2003) Diagnosis of periodontal diseases. *J periodontal* 2003; 74:1237-1247
31. Position paper. (2004) Systemic antibiotics in periodontics. *J periodontal* 2004; 75:1553-1565
32. P. Raveendran, J. Fu, S.L. Wallen (2003). Completely "green" synthesis and stabilization of metal nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 13940-13941.
33. Rainer Buchmann, Rüdiger F. Müller. (2003) Change of antibiotic susceptibility following periodontal therapy. A pilot study in aggressive periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 222–229
34. Ramos Perfecto Donald, Moromi Nakata Hilda, Martínez Cadillo Elba y cols., (2010). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: Patógeno importante en la periodontitis. *Odontol. Sanmarquina* 2010; 13(2): 42-45
35. R.P. Allaker. 2010 The Use of Nanoparticles to Control Oral Biofilm Formation. *Journal of Dental Research* 89: 1175
36. Ruparelia, Jayesh P. et al., (2008) Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Acta Biomaterialia* 4 , pp. 707–716
37. Ruth Expósito Harris. Quitosano, un biopolímero con aplicaciones en sistemas de liberación controlada de fármacos. <http://eprints.ucm.es/11160/1/T32051.pdf> (20/09/2012)
38. Sondia Ivan y Salopek-Sondib Branka (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science*. Volume 275, Issue 1, 1 July 2004, 177–182.
39. Thabet M. Tolaymat, et al., (2010). An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and

applications: A systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers. *Science of the Total Environment* 408 (2010) 999–1006.

40. T. Theivasanthi, M. Alagar. (2011). Studies of Copper Nanoparticles Effects On Micro-Organisms
41. Vandana Srikrishna Chadha, Kapil Arora y cols. (2012) Local drug delivery in periodontics: Current concepts and trends. *International journal of advanced research on oral sciences*.
42. Vincent E. Friedewald, Kenneth S. Kornman y cols. (2009) The American Journal of Cardiology and Journal of Periodontology Editors' Consensus: Periodontitis and Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *J Periodontal* 2009;80:1021-1032.
43. William E. Frey. Localized therapy with controlled-release anti-microbials. (10/09/2012)
44. www.actaodontologica.com/ediciones/1998/2/antibioticos_tratamiento_periodontal.asp (21/09/2012)
45. www.redsalud.gov.cl/temas_salud/saludbucal2.html. (3/03/2013)
46. Yuki Hori, Amy M. Winans y cols. (2009). Modular injectable matrices based on alginate solution/microsphere mixtures that gel in situ and co-deliver immunomodulatory factors. *Acta Biomaterialia* 5 969–982
47. Zambon JJ, *et al.*, (1998). *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of Human Periodontal Disease. *Adv Dent Res* :2(2):269-274.

ANEXOS

MATERIALES

1. Reactivos Utilizados

1.1 Síntesis de NPs y nanocompositos.

- Agua destilada.
- Nitrato de Plata (Aldrich ®).
- Almidón (Merck ®).
- Aceite siliconado.
- Acetato de Cobre (Aldrich ®).
- Acido Ascórbico
- Alginato (Merck ®).
- Quitosano (Merck ®)
- Polimetafosfato de sodio
- Gluconato de calcio
- Hidróxido de sodio

2. Materiales Estudio Microbiológico

- Agua destilada
- Medio de cultivo BHI (Merk ®)
- Agar Agar (Merk ®)
- Estándar turbidez McFarland 0,5.
- Cepa clínica de *A. actinomycetemcomitans*, serotipo B, parcialmente caracterizado.
- Placa Petri.
- Asa de siembra

3. Material de Vidrio y Laboratorio

- Pinzas, espátulas.
- Tubos de ensayo
- Viales de vidrio 20 ml.
- Jeringas de 10 ml.
- Vasos Precipitados: 50,100, 200 ml.
- Matraces de Aforo: 10, 50,100 y 200 ml.
- Frascos de vidrio con tapa 100 ml.
- Micro pipetas 20,100, 1000 y 5000 μ l.
- Pipetas 1 y 10 ml.
- Placas Petri.
- Soporte y pinzas.
- Portaobjetos.
- Gradilla.
- Balanza analítica.
- Pinzas, espátulas.
- Balón 100 y 250 ml.
- Matraces de Aforo: 10, 50,100 y 200 ml.
- Pipetas 1 y 10 mL y micro pipetas 1000 y 5000 μ l.
- Tijeras para corte de metal.

4. Equipos Utilizados.

- Microscopio electrónico de barrido/microanálisis EDS (SEM-EDS) modelo Jeol5410.
- Microscopio electrónico de transmisión (TEM) modelo Zeiss ® m-109, 50 kv
- Difractómetro de rayos X de polvo, modelo SIEMES D 5000 con radiación CuK α
- Espectrofotómetro UV-Visible.
- Electrodo específico plata-sulfuron Oakton ®.

- pH metro, Oakton ® 510 series
- Sonificador Labtech ®, 750 W.
- Mufla programable (1200°C). Labtech ®.
- Lupa estereoscópica.