

Piezas 3D de Vidrios con Partículas de Plata para Potenciales Aplicaciones Antibacterianas en Infecciones Óseas

3-D Glass Scaffolds with Silver Particles as Antimicrobial in Bones' Infection

Adela González Jiménez, Ana García Fontecha y Sandra Sánchez Salcedo

Universidad Complutense de Madrid

Resumen

Los MBG (vidrios mesoporosos bioactivos) son biocerámicas de tercera generación usadas en regeneración del tejido óseo debido a su gran solubilidad y bioactividad. Este trabajo se centra en la síntesis vidrios mesoporosos trifásicos $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ mediante el método EISA (*Evaporation Induced Self-Assembly*), a los cuales se les ha ido sustituyendo SiO_2 por plata metálica para futuros ensayos bacterianos. Para ello, se sintetizaron materiales con distinta cantidad de plata (1 al 8%) y se estudiaron sus propiedades físicoquímicas. Posteriormente, se realizó la preparación de piezas tridimensionales (3D) meso-macroporosas por el método de prototipado rápido de estos materiales. Se realizó la caracterización físicoquímica de los materiales. Con los resultados obtenidos se puede concluir que se han logrado sintetizar materiales mesoporos y que la adición de plata no modifica la estructura, a valores igual o inferior al 5% de plata. Por tanto, podrían ser buenos candidatos en futuros ensayos antibacterianos para su utilización en el campo de las patologías óseas.

Palabras clave: biomaterial, vidrio mesoporoso bioactivo (MBG), nanopartículas de plata, antibacteriano.

Abstract

MBG (Mesoporous bioactive glasses) are third generation bioceramics which are used in the bone tissue regeneration due to its great solubility and bioactivity. This research is focused on $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ triphasic mesoporous glasses synthesis with EISA method (*Evaporation Induced Self-Assembly*), in which SiO_2 is substituted with silver. For this aim, several compositions were synthesized with a different composition of silver (1 to 8%) and their physic-chemistry properties were analyzed. After that, the preparation of meso-macroporous three-dimensional (3D) pieces was carried out by the rapid prototyping method of these materials. It can be concluded that mesoporous materials have been synthesized and that the addition of values equal to or less than 5% of silver do not modify the structure. Therefore, they could be good candidates for later antibacterial tests for their use in the bone's pathologies.

Keywords: biomaterial, mesoporous bioactive glasses (MBG), silver nanoparticles, antimicrobial.

Trabajo presentado en las XII Jornadas Complutenses, XI Congreso Nacional de Investigación en Ciencias de la Salud para Alumnos Pregraduados y XVI Congreso de Ciencias Veterinarias y Biomédicas.

Agradezco la colaboración al Departamento de Inorgánica y Bioinorgánica de la Facultad de Farmacia y especialmente a mis tutoras Sandra Sánchez Salcedo y Ana García Fontecha.

Introducción

Los avances en la ciencia de materiales y biomedicina han sido determinantes en el ámbito de los defectos y patologías óseas, ya que buscan crear materiales con el fin de reemplazar, reparar y regenerar el tejido óseo dañado (Hoppe, Güldal, y Boccaccini, 2011).

Los biomateriales se pueden clasificar en 3 familias: metales, polímeros y cerámicas. Estas últimas se subdividen en 3 generaciones:

La **primera** generación presenta poca reactividad química (cerámicas inertes), siendo biocompatibles, pero con tendencia a encapsularse en forma de quistes fibrosos.

La **segunda** generación comprende biocerámicas que interaccionaran con los tejidos biológicos dando lugar a un comportamiento bioactivo y/o bioabsorbible. Las más representativas corresponden a los fosfatos de calcio, vidrios bioactivos, biocerámicas, cementos, etc. En clínica se utilizan como relleno de defectos óseos (actúan entre el implante y el hueso impidiendo fricciones no deseables), reconstrucción ósea en cirugía máxilo-facial, sustitución ósea y como recubrimientos de implantes dentales y prótesis metálicas.

La **tercera** generación sustituye y regenera tejido óseo dañado. Presentan la ventaja añadida de poder incorporar en su estructura sustancias activas (fármacos), debido a su elevada superficie específica. Dentro de este grupo encontramos los vidrios de sílice, que presentan una mesoporosidad ordenada (3-9 nm de diámetro). Además, al ser solubles, se favorece su degradación facilitando la regeneración ósea y la formación de nuevo hueso (Xiaoxia, Chengzhong, Xufeng, Jiawer, y Dongyuan, 2011).

Uno de los principales problemas derivados de la cirugía es la infección bacteriana del implante, en el cual se puede formar un *biofilm* que puede inhibir el efecto de los antibióticos en la zona infectada. Esto hace que se requiera una se-

gunda intervención quirúrgica (lo cual aumenta el riesgo del paciente y el coste del tratamiento).

Afecta al 2 % de prótesis articulares y al 5% de dispositivos fijación de fractura implantados (Catalano et al., 2016).

La plata es un agente citotóxico que podría utilizarse contra la formación del *biofilm* bacteriano en el implante. Sin embargo, su mecanismo de acción no está totalmente elucidado. Una de las posibles explicaciones de su efecto citotóxico es su posible interacción con las enzimas bacterianas, inhibiendo así el metabolismo del oxígeno y aumentando el estrés oxidativo. A pesar de ello, también se cree que puede alterar la estructura de la hélice de DNA uniéndose a ella inhibiendo su replicación (Hui, Yan-yu, Tao, y Chuang, 2016).

El presente trabajo se centra en la síntesis de materiales mesoporosos bioactivos (MBG) trifásicos SiO₂-CaOP₂O₅, a los cuales se les ha ido sustituyendo SiO₂ por plata metálica (entre 1 y el 8%) para futuros ensayos bacterianos. Se estudiará cómo la adición de plata se ve reflejada en las propiedades fisicoquímicas de estos biomateriales y posteriormente se realizará la preparación de piezas tridimensionales (3D) meso-macroporosas por el método de prototipado rápido de estos materiales (García, Izquierdo-Barba, Colilla, López de Laorden, y Vallet-Regí, 2011).

Materiales y métodos

Síntesis del material: Método EISA

La síntesis de los materiales se llevó a cabo mediante el método EISA (*Evaporation Induced Self-Assembly*), que combina la técnica sol-gel con la química de surfactantes. Para ello, a una disolución formada por 2 g de P123 (Pluronic 123), HNO₃ 0,5 M y etanol se añadieron en intervalos

Tabla 1

Diferentes composiciones molares y reactivos empleados en la síntesis por el método EISA.

Muestra	Composición molar (%)	TEOS (mL)	TEP (mL)	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O (g)	AgNO ₃ (g)
MBG-0Ag	SiO ₂ (85%)-CaO(10%)-P ₂ O ₅ (5%)	3,96	0,32	0,49	--
MBG-1Ag	SiO ₂ (84%)-CaO(10%)-P ₂ O ₅ (5%)-Ag(1%)	3,91			0,035
MBG-2Ag	SiO ₂ (83%)-CaO(10%)-P ₂ O ₅ (5%)-Ag(2%)	3,86			0,070
MBG-3Ag	SiO ₂ (82%)-CaO(10%)-P ₂ O ₅ (5%)-Ag(3%)	3,78			0,105
MBG-4Ag	SiO ₂ (81%)-CaO(10%)-P ₂ O ₅ (5%)-Ag(4%)	3,73			0,140
MBG-5Ag	SiO ₂ (80%)-CaO(10%)-P ₂ O ₅ (5%)-Ag(5%)	3,68			0,175
MBG-6Ag	SiO ₂ (79%)-CaO(10%)-P ₂ O ₅ (5%)-Ag(6%)	3,64			0,210
MBG-7Ag	SiO ₂ (78%)-CaO(10%)-P ₂ O ₅ (5%)-Ag(7%)	3,59			0,245
MBG-8Ag	SiO ₂ (77%)-CaO(10%)-P ₂ O ₅ (5%)-Ag(8%)	3,55			0,280

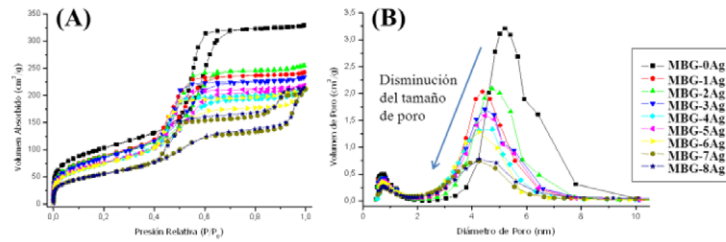


Figura 1. Graficas de adsorción-desorción de N_2 y distribución de tamaño de poro de las muestras MBG-xAg.

de 3 horas y en agitación constante TEOS (tetraetilortosilicato), TEP (trietilfosfato), $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ y $AgNO_3$ como precursores de SiO_2 , P_2O_5 y CaO y Ag metálica respectivamente, en cantidades indicadas en la Tabla 1. Se mantuvo la disolución en oscuridad para evitar la posible degradación de la plata por contacto con la luz. Tras 24 h de agitación la disolución resultante se traspasó a placas Petri en estufa a $30^\circ C$ para la obtención del gel. Transcurridos 3-4 días, el gel se calcinó a $700^\circ C$ durante 6 h para obtener los materiales en forma de sólidos blanco (MBG-0Ag, 0% Ag) o marrones (MBG-xAg, $x = 1-8\%$ Ag). Finalmente, se molturaron y tamizaron los sólidos obteniendo un tamaño de partícula de aproximadamente $63 \mu m$.

Tras la síntesis de estos materiales se realiza su caracterización fisicoquímica mediante las pruebas de Adsorción de N_2 , DRX (Difracción de Rayos X) y FTIR (Espectrometría Infrarroja por Transformada de Fourier), TG (Termogravimetría) y TEM (Microscopia Electrónica de Transmisión).

Conformado de las piezas 3D

El procedimiento es el mismo que el comentado en el apartado 3.1 y en el proceso de envejecimiento del gel se deja evaporar el disolvente hasta aproximadamente $\frac{1}{4}$ de su volumen. A continuación, se añaden 1.5 g de metilcelulosa, dando lugar a una pasta con la consistencia adecuada para poder ser extruida. El conformado de piezas tendrá lugar por el equipo de prototipado para el diseño de soportes cúbicos o cilíndricos de diferentes tamaños Posteriormente se calcina para eliminar el surfactante y obtener la estructura mesoporosa.

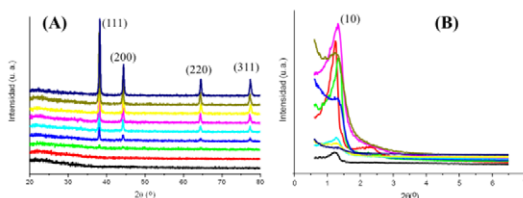


Figura 2: Difractogramas a alto ángulo (A) y bajo ángulo (B) de las muestras MBG-xAg.

Discusión y resultados

Caracterización fisicoquímica de los materiales MBG-xAg

Adsorción de N_2 : Las isothermas de adsorción-desorción de N_2 muestran para los materiales con un porcentaje de plata inferior a 6% un ciclo de histéresis de tipo H1 que corresponde a materiales mesoporosos ordenados (isoterma tipo IV) según la IUPAC (Figura 1A) Los materiales con un porcentaje superior no presentan mesoporosidad ordenada ya que no siguen este ciclo de histéresis. La distribución de tamaño de poro muestra dos máximos en todos los materiales, el primero de ellos corresponde a la zona de microporosidad y el segundo a la zona de mesoporosidad. Sin embargo, el valor de la superficie específica de los materiales va disminuyendo según aumenta el porcentaje de plata ($S_{BET} = 375 \text{ m}^2/\text{g}$ (MBG-0Ag) a $280 \text{ m}^2/\text{g}$ (MBG-5Ag)).

DRX: A partir de las muestras MBG-2Ag se observa en los difractogramas de alto ángulo (Figura 2A) la presencia de 4 nuevos máximos de difracción a valores de $2q = 38, 44, 64$ y 77° que se corresponden con las familias de planos (111), (200), (220), (311) confirmando la presencia de plata metálica embebida en la matriz $SiO_2-CaO-P_2O_5$. A bajo ángulo, se observa que la muestra MBG-0Ag presenta estructura mesoporosa ordenada, con un máximo de difracción a $2q$ entre $1.0-1.4^\circ$ que se corresponden con la familia de planos (10) de una típica estructura hexagonal de 2D ($p6mm$). La incorporación de la plata no modifica esa estructura, por lo menos a valores igual o inferior al 5% ya que estas muestras presentan patrones similares. Aquellas muestras con un mayor porcentaje en plata (MBG-xAg, $x \geq 6\%$) presentan máximos más anchos lo que parece indicar que se ha perdido el orden inicial.

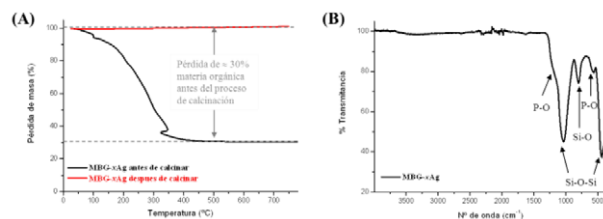


Figura 3: TG y FTIR de una de las muestras MBG-xAg (similares resultados se obtienen para el resto).

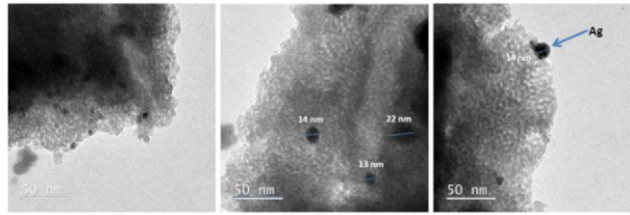


Figura 4. Micrografías TEM de la muestra MBG-3Ag.

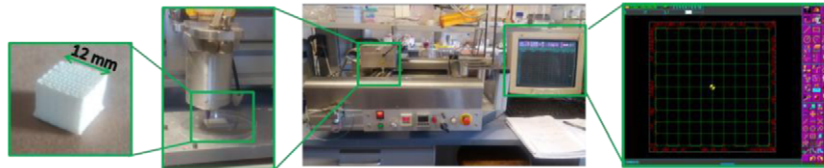


Figura 5. Equipo de prototipado rápido para el conformado de piezas 3D.

TG: Al estudiar la variación de la masa con la temperatura se observa la pérdida de surfactante, materia orgánica y nitratos. El proceso de calcinación es necesario en la síntesis para la aparición de los mesoporos libres en la matriz del MBG (Figura 3A).

FTIR: Todos los materiales presentan las bandas correspondientes a la vibración Si-O-Si a 450, 960 y 1050 cm^{-1} y P-O a 570 y 1100 cm^{-1} (Figura 3B), que son las bandas propias de la matriz $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$.

TEM: Se observa la distribución homogénea de partículas de plata metálica en la muestra con un tamaño de aproximadamente 15 nm (Figura 4), así como la presencia de poros a lo largo de la matriz en estructura tipo gusano.

CONFORMADO DE PIEZAS 3D: Se lograron extruir piezas cúbicas con canales uniformes (Figura 5).

Conclusiones

A través del método de síntesis EISA se han logrado sintetizar materiales mesoporos con tamaño de poro entre 5.5 y 6.3 nm a los que se ha incorporado homogéneamente nanopartículas de plata metálica. Se observa que a valores igual o inferior al 5% de plata embebida no modifica la estructura mesoporosa del MBG. Por lo tanto, este tipo de materiales se proponen como candidatos para futuros ensayos antibacterianos en el campo de las patologías óseas.

Referencias

- Catalano, P. N., Pezzoni, M., Costa, C., Soler-Illia, G. J. d. A. A., Bellino, M. G., & Desimone, M. F., (2016). Optically transparent silver-loaded mesoporous thin film coating with long-lasting antibacterial activity, *Microporous Mesoporous Materials*, 236, 158 -166. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2016.08.034>
- García, A., Izquierdo-Barba, I., Colilla, M., López de Laorden, C., & Vallet-Regí, M., (2011). Preparation of 3-D scaffolds in the $\text{SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$ system with tailored hierarchical meso-macroporosity. *Acta Biomaterialia*, 7, 1265-1273. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.10.006>
- Hoppe, A., Güldal, N. S., & Boccaccini, A. R. (2011). A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics Hoppe. *Biomaterials*, 32, 2757-2774. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.004>
- Hui, Y., Yan-yu, R., Tao, W., & Chuang, W (2016). Preparation and antibacterial activities of $\text{Ag}/\text{Ag}^+/\text{Ag}^{3+}$ nanoparticle composites made by pomegranate (*Punica granatum*) rind extract. *Results in Physics*, 6, 299-304. <https://doi.org/10.1016/j.rinp.2016.05.012>
- Xiaoxia, Y., Chengzhong, Y., Xufeng, Z., Jiawer, T., & Dongyuan, Z. (2011). Highly ordered mesoporous with bone forming bioactivities. *Angewandte Chemie International Edition*, 43, 5980-5984.