

RECUBRIMIENTOS ANTIBACTERIANOS BASADOS EN SILICIO PARA IMPLANTES DENTALES

Beatriz Palla Rubio (2016)



***Directoras de Tesis:
Mariló Gurruchaga
Isabel Goñi***

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea



Facultad de Química-Kimika Fakultatea

Departamento de Ciencia y Tecnología de Polímeros-
Polimeroen Zientzia eta Teknologia Departamentua

***Recubrimientos antibacterianos basados en silicio
para implantes dentales***

Memoria presentada para Optar al Grado de Doctora en Ciencias Químicas por

Beatriz Palla Rubio

Bajo la dirección de las Doctoras:

Mariló Gurruchaga Torrecilla e Isabel Goñi Echave

Donostia, Septiembre 2016

Capítulo 1

Introducción y objetivos

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1. Implantes dentales.....	4
1.1. Implantes dentales de Titanio.....	5
1.2. El proceso de osteointegración.....	6
1.2.1. Biología del hueso.....	8
1.2.2. Mecanismos para favorecer la osteointegración.....	12
1.2.2.1. Modificaciones morfológicas de la topografía superficial...13	
1.2.2.2. Modificaciones físico-químicas.....	15
1.2.2.3. Modificaciones bioquímicas.....	16
2. Infecciones bacterianas.....	18
2.1. Periimplantitis.....	18
2.2. Causas de la colonización bacteriana.....	20
2.3. Agentes antibacterianos más utilizados.....	24
2.3.1. Metales.....	24
2.3.2. Antibióticos.....	25
2.3.3. Compuestos catiónicos.....	27
2.4. Implantes de titanio con características antibacterianas.....	31
2.4.1. Modificaciones superficiales de los implantes de titanio.....	32
2.4.2. Recubrimientos poliméricos antiadhesivos.....	33
2.4.3. Recubrimientos como matrices de liberación de agentes biocidas.....	35

3. Proceso Sol-Gel.....	38
3.1. Introducción.....	38
3.2. Recubrimientos sol-gel híbridos orgánico-inorgánicos.....	40
3.3. Alcóxidos de Silicio.....	40
3.4. Etapas del proceso Sol-Gel.....	41
3.5. Factores que influyen en el proceso sol-gel.....	43
3.6. Recubrimientos sol-gel sobre sustratos metálicos.....	45
4. Objetivos.....	46
Bibliografía.....	49

1. IMPLANTES DENTALES

Encontrar un sustituto ideal para la pérdida de una pieza dental ha sido uno de los objetivos principales de la odontología desde tiempos remotos. A pesar de que la ciencia de los biomateriales, y con ella la ciencia de los implantes, es muy reciente como disciplina científica, ya las antiguas civilizaciones reconocían el gran beneficio del reemplazo dental mediante el uso de diferentes materiales. Los intentos más antiguos descubiertos para lograr implantes dentales, corresponden a la civilización Maya y datan del año 600 d.C.^{1, 2}. Los arqueólogos han recuperado cráneos antiguos en los que los dientes fueron reemplazados por materiales que van desde piedras talladas como el jade, a fragmentos de conchas marinas. Sorprendentemente, aunque los métodos y materiales usados eran totalmente primitivos, algunos de estos primeros implantes estaban fusionados con el hueso de la mandíbula. También se han encontrado prótesis dentales en yacimientos arqueológicos del pueblo etrusco, que datan de alrededor del año 700 a.C. Estas costosas prótesis estaban formadas por dientes provenientes de animales y humanos y estaban sujetas con finas piezas de oro.

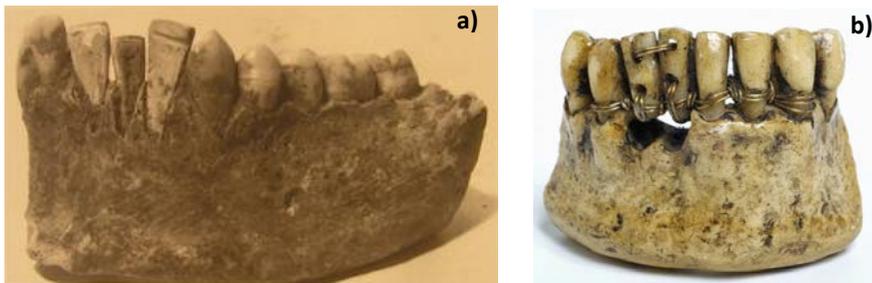


Figura 1.1: Mandíbula humana Maya (a) con sustituciones dentales hechas de nácar de las conchas, y dentadura humana etrusca (b) con un puente de soporte de oro para mantener las piezas dentales perdidas.

Durante las últimas décadas, la investigación en la implantología dental ha sufrido un intenso desarrollo como forma de reemplazar una pieza dental perdida con una tasa de éxito elevada³. La necesidad de esta sustitución surge como la respuesta lógica a la ausencia de los dientes que son elementos necesarios para la masticación e importantes para el prestigio y las relaciones sociales.

La función básica de los implantes dentales es la de servir como soporte sustituyendo a la raíz dental, creando de este modo una pieza sólida sobre la que

poder colocar la prótesis dental que resista las cargas aplicadas sobre ella. Por lo tanto, un implante dental es una raíz artificial creada para reemplazar una pieza dental perdida y que deberá integrarse con el resto de tejidos de la boca (figura 1.2).

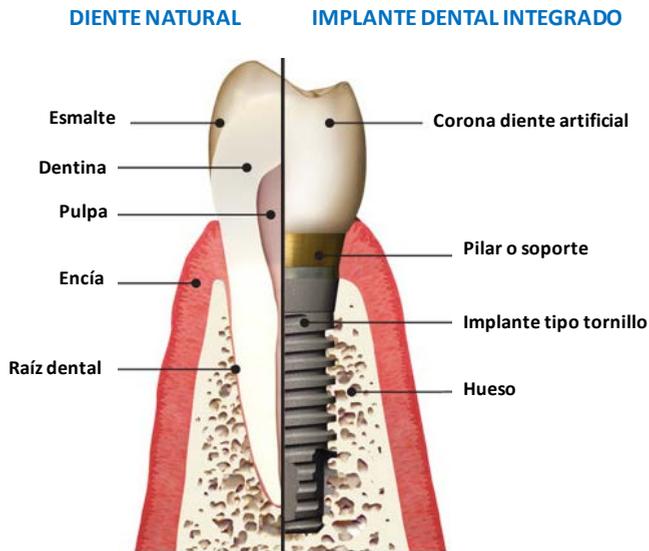


Figura 1.2: Comparación de las partes que componen un diente natural y un implante dental.

En los últimos 20 años la cantidad de implantes dentales colocados ha aumentado de manera muy rápida debido a la facilidad de implantación, y a la mejora en la calidad de vida que suponen, ya que afectan no sólo a nivel de salud sino también a nivel estético y social.

1.1. Implantes dentales de Titanio

Debido a los requerimientos de esta aplicación, procesos físicos y químicos como fuerzas de compresión, esfuerzos de abrasión, ataque químico de los alimentos o de productos del metabolismo, etc., los materiales más utilizados en los implantes son los metales y sus aleaciones⁴. El material metálico más utilizado para este tipo de aplicaciones es el titanio^{4, 5, 6}, tanto su versión comercialmente pura (cpTi), como su aleación Ti6Al4V. Esto es debido a que una de las características más importantes de éstos es la resistencia y la similitud de sus propiedades mecánicas con las del hueso receptor, puesto que cumpliendo su función deberán soportar la carga que antes soportaba el hueso. Además, entre otras propiedades del titanio, está su gran biocompatibilidad con el organismo, su capacidad de integrarse con el

hueso huésped y la durabilidad de este material en el tiempo. En esto radica su éxito y su enorme aceptación en la comunidad odontológica.

Como se ha comentado anteriormente, hoy en día el número de implantes dentales colocados ha aumentado en todo el mundo³, por lo que la utilización de implantes de Ti está totalmente extendida en la población. Estos implantes han conseguido importantes tasas de éxito (mayores del 89%) en cuanto a la recuperación funcional y estética de una pieza dental perdida. A pesar de esta elevada tasa de éxito, tras la colocación de un implante se pueden dar fallos por los que el implante, en algunos casos, tiene que ser eliminado del paciente. Estos fallos se dividen clínicamente en dos categorías, fallos mecánicos y fallos biológicos⁷.

Los fallos mecánicos son debidos a una excesiva carga aplicada sobre el implante (sobrecarga mecánica), problemas de bruxismo o incluso pueden ser debidos a una fractura o daño estructural de la pieza con la consiguiente eliminación de la misma. Éstos, en muchas ocasiones se asocian también a problemas en la integración del implante en el hueso maxilar, que a su vez, son debidos a la baja calidad ósea del paciente o a las características superficiales del implante.

En cuanto a los fallos biológicos, están asociados con la acumulación de placa microbiana, que puede llevar al desarrollo de infecciones en la zona periimplantar, y en algunos casos están asociados también con la fibrointegración debida al trauma quirúrgico.

En los apartados siguientes se explicará de forma más detallada, las causas del fallo biológico, siendo éste el tema central de esta tesis.

1.2. El proceso de Osteointegración

Tras la implantación, se pueden dar en el organismo dos tipos de respuesta⁸. El primer tipo implica la formación de tejido fibroso ligero alrededor del implante (cápsula fibrosa) lo que se traduce en una mala fijación biomecánica aislando el implante del hueso y evitando su osteointegración, lo que deriva en un fallo clínico del implante dental⁹. El segundo tipo de respuesta ósea está directamente relacionada con el contacto hueso-implante sin la intervención de una capa de tejido conectivo. Esta respuesta es conocida como osteointegración¹⁰ y es totalmente necesaria para asegurar una fijación temprana del implante al hueso y de este modo

mantener la estabilidad del implante a largo plazo. Además mediante la correcta osteointegración se minimiza el riesgo de infecciones y el aflojamiento del implante^{7, 11}.

Por lo tanto, un requisito básico e indispensable para la correcta unión hueso-implante y el éxito del tratamiento implantológico es la unión firme, estable y duradera del implante dental sujeto a carga y el sustrato óseo que lo rodea. El término de osteointegración fue introducido por Brånemark en el año 1956 y posteriormente desarrollado por T. Albrektsson refiriéndose a este proceso como el contacto histológico directo entre hueso e implante y estableciendo que el éxito de la colocación de un implante depende de la conexión estructural y funcional entre el hueso vivo ordenado y la superficie de un implante sometido a carga funcional^{12, 13}.

Esta definición viene determinada por las investigaciones realizadas en 1952 por el profesor Brånemark y su equipo de investigación, al realizar estudios microscópicos *in vitro* de la médula ósea en la tibia de conejos mediante la introducción de una cámara óptica de titanio en el hueso del conejo. Al intentar retirarla, la cámara de Titanio se había unido por completo al hueso y el tejido circundante había mineralizado, siendo congruente con las microirregularidades de la superficie del titanio (figura 1.3). Como consecuencia de todo ello, el profesor Brånemark desarrolló este nuevo concepto de osteointegración, que precedió al éxito y desarrollo de los implantes dentales de titanio actuales.

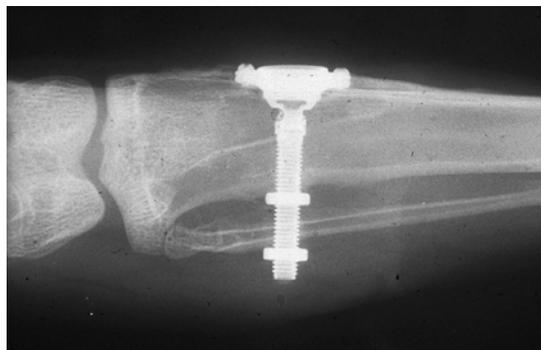


Figura 1.3: Cámara de titanio osteointegrada en la tibia de conejo¹⁴.

Para entender totalmente este concepto, es necesario comprender la biología elemental del hueso, ya que es el tejido receptor del implante.

1.2.1 Biología del hueso

El hueso es un tejido dinámico y altamente vascularizado que está en continua remodelación, crecimiento y resorción durante la vida de un individuo¹⁵. Desempeña un papel fundamental en la locomoción, constituye, junto con el cartílago, el esqueleto del organismo asegurando una adecuada capacidad de soporte de carga, y actúa como una cubierta protectora para los delicados órganos internos del cuerpo. Además el tejido óseo juega un papel muy importante en el proceso de homeóstasis, es decir, el almacenamiento de los iones Ca^{2+} y PO_4^{3-} mediante la regulación de los electrolitos clave en sangre^{15, 16}. Mediante este proceso se mantiene la constancia en las propiedades y la composición del medio interno del organismo.

Los huesos están formados por matriz orgánica, células especializadas y fase mineral. La fase orgánica aporta elasticidad, constituye el 30% del peso del hueso y está formado principalmente por fibras de colágeno tipo I orientadas. La fase inorgánica o mineral, aporta rigidez y resistencia, y está formada en un 80% por sales de fosfato depositadas en forma de cristales de hidroxiapatita entre las fibras de colágeno.

El tejido óseo con una alta organización, puede estar dispuesto como hueso compacto o cortical o como hueso esponjoso o trabecular¹⁷. El hueso cortical es mucho más denso que el trabecular y forma una capa exterior rígida y protectora alrededor de todos los huesos resistente a la deformación, mientras que el hueso esponjoso o trabecular interno está localizado por debajo de las capas del cortical y ayuda al hueso a mantener su forma cuando este se expone a esfuerzos mecánicos y proporciona resistencia al formar un sistema de contrafuertes internos. Por su morfología, el hueso trabecular no es una base estable para la fijación primaria de un implante, sólo el hueso compacto proporciona una base estable para esta fijación temprana¹⁸.

El tejido óseo que se encuentra en contacto directo con un implante dental, es el hueso alveolar. Este hueso forma la cavidad del hueso maxilar donde está insertada la raíz dental (alveolo dentario), y es una estructura odontodependiente, es decir, se forma con el diente, sostiene al diente mientras éste cumple su función y desaparece una vez que se pierde esta pieza dental¹⁹. El hueso alveolar está formado por hueso compacto o cortical recubierto por periostio y sirve como

envoltura para el hueso esponjoso o trabecular. En la figura 1.4 se ilustra la estructura del hueso alveolar.



Figura 1.4: Esquema de la estructura del diente, incluyendo los tejidos periodontales.

La curación o formación del hueso alrededor del implante es un fenómeno que implica la activación de procesos osteogénicos, vasculares e inmunológicos. Además, diferentes tipos de células y factores de crecimiento se ven envueltos, interactuando durante todo el proceso de osteointegración, que incluye inflamación, vascularización y formación del hueso^{20, 21}.

La primera respuesta en el organismo receptor al introducir un cuerpo extraño es la inflamación con la consecuente formación de un hematoma en la intercara hueso-implante, seguido del proceso reparador y por último la cicatrización. La respuesta del huésped consiste en una activación plaquetaria, la activación y migración de las células inflamatorias, células mesenquimales y la adhesión de osteoblastos¹¹.

Relacionados con la osteointegración, se encuentran también los términos de osteoinducción y osteoconducción²¹. La osteoinducción se define como la estimulación de las células primitivas, no diferenciadas y pluripotenciales para desarrollar una línea celular de formación de hueso. La osteoconducción es el proceso por el cual el material inorgánico implantado ofrece una matriz para el crecimiento de células óseas progenitoras sobre una superficie y es capaz de soportar el crecimiento de capilares, tejidos perivasculares y células osteoprogenitoras, desde un lugar receptor, por ejemplo desde un implante. Un

material osteoconductor puro no forma hueso de una forma intrínseca sino que sirve de andamio pasivo que lleva al crecimiento activo de hueso y de tejido fibrovascular²².

En todo este proceso, juegan un papel fundamental las células óseas diferenciadas¹¹, como son los osteoblastos, osteoclastos y osteocitos, pero también son de vital importancia las células no diferenciadas como son, las células madre mesenquimales, debido a que pueden dar origen a cinco tipos celulares distintos (fibroblastos, osteoblastos, condroblastos, adipocitos y mioblastos) y debido también a su importancia para una buena curación y anclaje del implante. A partir de estas células se pueden llegar a formar células osteoprogenitoras que son las encargadas de formar una población de células troncales capaces de dividirse y dar origen a células que se diferencian a osteoblastos, que a su vez son las células responsables de la formación y organización de la matriz extracelular del hueso y de su posterior mineralización.

Los osteoblastos se adhieren a la superficie del implante desde el primer día de su inserción²³ y son capaces de producir la práctica totalidad de las proteínas que constituyen la matriz osteoide (sintetizan las fibras de colágeno que forman esta matriz) además de dirigir la organización o disposición de esa matriz en forma de fibras que le confieren una gran resistencia. Llevan a cabo también la mineralización mediante la deposición de sales de fosfato sobre el osteoide, dando como resultado una capa ósea. Mediante la superposición de estas capas se produce el crecimiento óseo. A medida que los osteoblastos van sintetizando la matriz osteoide se cubren con su propia secreción y quedan atrapados en la matriz ósea, donde se diferencian a osteocitos.

Las células responsables de la resorción de la matriz ósea son los osteoclastos, células polinucleadas de gran tamaño que se localizan en las superficies óseas firmemente asociadas a la matriz ósea. Una de sus características fundamentales es que poseen un borde rugoso que consiste en una serie de proyecciones citoplasmáticas finas y adyacentes al hueso donde se lleva a cabo la resorción ósea por diferentes mecanismos. Estas células liberan algunos factores que son probablemente mediadores de la resorción ósea.

Por último, los osteocitos son células derivadas de los osteoblastos, son relativamente inactivas (no se dividen ni secretan matriz) pero su metabolismo es

crucial para la viabilidad del hueso y el mantenimiento de la homeostasis. Estas células quedan atrapadas en las lagunas de la matriz (lagunas óseas), pasando por varias fases de maduración hasta que quedan completamente rodeadas por la matriz y se mantienen en un estado de aparente reposo¹¹. Los osteocitos juegan un papel muy importante en la fisiología ósea ya que son capaces de detectar estímulos mecánicos y variaciones de tensión y morfología del hueso producidos por las cargas que soportan en su superficie. Además, mantienen las actividades celulares como el intercambio de nutrientes y productos de desecho.

Este proceso de formación ósea se ilustra en la figura 1.5.

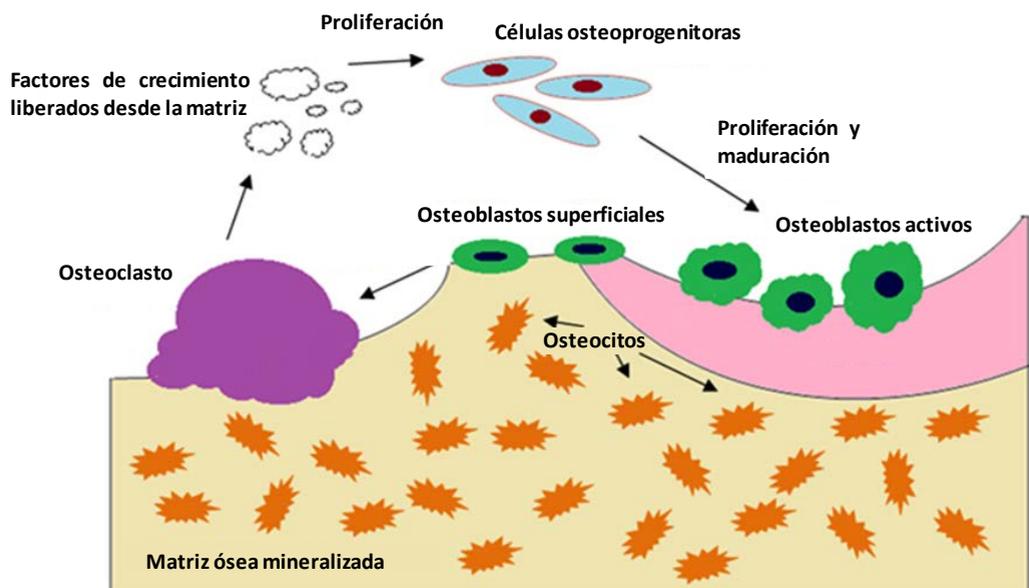


Figura 1.5: Proceso de reabsorción y formación ósea.

Por lo tanto y teniendo en cuenta todo lo anterior, una de las características más importante que debe tener la superficie de un implante para su correcta interacción con el hueso receptor, es la capacidad de favorecer y facilitar el proceso de osteointegración por mediación de las células anteriormente descritas concluyendo en un buen anclaje hueso-implante y de este modo minimizando los posibles rechazos así como las posibles infecciones bacterianas derivadas de un mal anclaje y aflojamiento del implante⁷.

1.2.2. Mecanismos para favorecer la osteointegración

La correcta osteointegración del implante dental en el hueso alveolar es crucial para la supervivencia de la pieza implantada. A pesar del gran éxito en el campo de los implantes orales (95% en el hueso mandibular inferior y un 97% en el hueso maxilar superior), la necesidad de mejorar la correcta integración de un implante en la cavidad oral, sobre todo en pacientes con una pobre calidad y cantidad ósea²⁴ es de gran interés.

La osteointegración tiene su base en la resistencia a la corrosión del Ti (inercia química), ya que la formación de una capa fina de óxidos pasivantes lo protegen del ataque de los fluidos fisiológicos^{4, 8, 25}. Esta capa es muy resistente y estable actuando como barrera protegiendo además al metal subyacente del implante de los fluidos corporales, y protegiendo también al tejido óseo de los iones que pudiera liberar el metal al medio fisiológico^{26, 27}. Además, esta capa de óxido es totalmente biocompatible, reactiva y capaz de formar espontáneamente capas de fosfato cálcico, mayoritariamente compuesto por hidroxiapatita, que actúa como matriz para la adhesión y proliferación de las células osteogénicas dando así comienzo al proceso de osteointegración^{7, 12}. Adicionalmente, esta capa de óxido de titanio en la superficie del implante consigue una unión firme con la parte alta de la encía, restringiendo la entrada de microorganismos y consiguiendo por lo tanto una unión similar a la del hueso y la encía^{7, 13}.

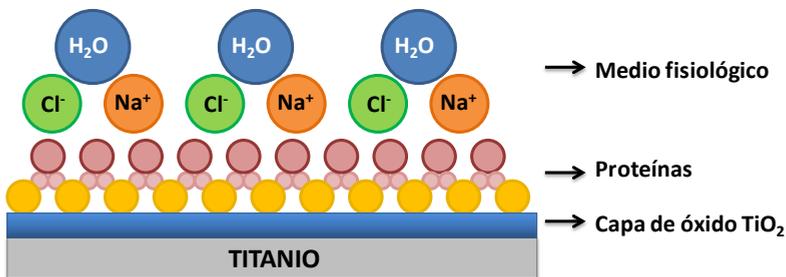


Figura 1.6: Intercara entre el implante de titanio y el fluido biológico en el instante inicial de la implantación.

Sin embargo, uno de los problemas más comunes del titanio es la falta de continuidad de esa capa a lo largo del implante y su posible desaparición. Por lo tanto, la osteointegración sin la capa de óxido de titanio biocompatible, se convierte

en un proceso excesivamente largo y costoso^{14, 28}, lo que puede derivar en un fallo del implante y su eliminación final. Esto se ha comprobado en distintos estudios en los que se ha investigado la superficie de implantes de titanio comerciales fallidos, observándose que la capa de óxido de titanio (TiO₂) en la superficie había reducido considerablemente su grosor y había variado en composición, o era prácticamente inexistente y no se observaba una correcta integración del mismo en el hueso maxilar²⁹. Ninguno de los implantes estudiados mostraba la composición regular de la capa de dióxido de titanio protectora y bioactiva. Todo esto se podría explicar por varias causas, siendo la más probable, la actuación de esta capa de óxido como intercambiador de iones mediante posibles reacciones de oxidación-reducción que pueden disolver la capa de óxido pasivante y hacer que los iones Ti⁴⁺ migren a los tejidos circundantes provocando el fallo del implante, debido a su interacción negativa en el proceso de osteointegración²⁹.

Por este motivo, y a pesar del uso extendido del titanio como biomaterial, la búsqueda de estrategias que mejoren la integración de la prótesis en la cavidad oral del paciente es de vital importancia.

El reto actual, por lo tanto, consiste en la modificación de la superficie del implante dental para mejorar la interacción célula-superficie y de este modo, favorecer la osteointegración. Para lograr este propósito, hay que tener en cuenta una serie de factores entre los que destacan los cuatro factores más relevantes que afectan al contacto directo entre el hueso y el implante, y que son, el tratamiento superficial del implante, la topografía, la energía superficial y la biofuncionalización con moléculas activas.

Existen tres métodos principales para modificar la superficie de un implante de titanio: 1) la modificación morfológica, 2) la modificación físico-química y 3) la modificación bioquímica.

1.2.2.1 Modificaciones morfológicas de la topografía superficial

Con el objetivo de acelerar la osteointegración, en los últimos años, se han desarrollado varias técnicas para obtener una topografía superficial adecuada que favorezca la interacción célula-implante, y por consiguiente, que favorezca también la adhesión, proliferación, diferenciación y migración de los osteoblastos⁸.

Los métodos que modifican la morfología superficial de un implante, varían la rugosidad de esta superficie aumentándola. En diversos estudios se ha demostrado que las superficies rugosas aumentan la velocidad de fijación primaria y la estabilidad mecánica a largo plazo de la prótesis^{8, 30, 31}, favorecen la adhesión osteoblástica primaria³², y mejoran considerablemente la producción de factores osteogénicos locales que aumentan la diferenciación celular en la superficie³³. A continuación se van a describir las técnicas más utilizadas para este tipo de modificación⁸.

a) Proyección por plasma de titanio (TPS)

Este método consiste en la introducción de partículas de titanio en una antorcha de plasma a alta temperatura. De este modo, las partículas de titanio son proyectadas sobre la superficie en cuestión, formando un recubrimiento de mayor rugosidad (40-50 μ m)⁸ y aumentando el área superficial del implante⁸. Uno de los inconvenientes de esta técnica es la liberación de partículas de titanio en los tejidos adyacentes que son altamente dañinas para el organismo, y, la disolución de iones titanio del recubrimiento liberando iones altamente nocivos.

b) Proyección de partículas (Grit-Blasting)

Se proyectan sobre la superficie del implante partículas cerámicas a alta velocidad, y en función del tamaño de partícula se obtienen diferentes rugosidades⁸.

Las partículas cerámicas proyectadas deben de ser químicamente estables, biocompatibles y no deben interferir en el proceso de osteointegración del implante⁸. Por ello, las partículas más utilizadas son partículas de alúmina, óxido de titanio y partículas de fosfato cálcico. Concretamente, las partículas de dióxido de titanio están consolidadas para esta aplicación gracias a la mejora que suponen el contacto de la intercara implante-hueso³⁴ y debido sus buenos resultados en estudios *in vitro*³⁵.

c) Ataque ácido (Acid-Etching)

El implante se introduce en una solución caliente de un ácido fuerte (HCl, HNO₃, H₂SO₄ etc.), formando microcanales en la superficie, con un diámetro de 0.5-2 μ m⁸. Mediante esta técnica y la formación de los microcanales se promueve la osteointegración del implante mediante la adhesión de células osteogénicas,

produciéndose la formación de hueso directamente en la superficie del implante^{36, 37}. Este método se usa normalmente en combinación con otras técnicas, lo que favorece la creación de una mayor rugosidad en la superficie. Este es el caso de la técnica combinada *Proyección de arena-Ataque ácido (Sandblasted and acid-etched, SLA)*³³. La proyección de partículas de arena antes del ataque ácido supone un incremento de la rugosidad superficial que incrementa la unión del hueso en comparación con el ataque ácido por sí solo^{38, 39}. Mediante la proyección de arena se crea la rugosidad superficial y tras ello, mediante el ataque ácido (ácido hidrociorídrico/sulfúrico) se crean los microcanales³⁹.

d) Anodizado

Mediante el anodizado potencioestático o galvanostático en ácidos fuertes (H_2SO_4 , H_3PO_4 , HNO_3 , HF), es posible producir superficies con micro o nano porosidad en implantes de titanio⁸. El resultado de la anodización es el aumento del espesor de la capa de óxido de titanio sobre el titanio, que sustituye a la capa de óxido fina nativa. Mediante las disoluciones electrolíticas de ácidos fuerte se disuelve la capa de óxido situada en el lugar por donde pase la corriente y se aumenta en las regiones contrarias obteniéndose una topografía rugosa. Este anodizado produce modificaciones en la microestructura y cristalinidad de la capa de óxido, y éstas dependen de parámetros como la densidad de corriente, la concentración molar de los ácidos y la composición y temperatura del electrolito.

Aunque los implantes dentales con superficies anodizadas presentan buenos resultados en cuanto a respuesta celular y a propiedades mecánicas, esta técnica requiere del control de muchos parámetros comentados anteriormente, lo que hace que el proceso sea muy complejo.

1.2.2.2. Modificaciones físico-químicas

Las características físico-químicas de un implante, tales como la energía superficial, la hidrofilia/hidrofobia o la composición de la superficie, son parámetros fundamentales que influyen en el comportamiento celular^{40, 41}. Se ha comprobado que los implantes de titanio con superficies hidrófilas mejoran el crecimiento celular la diferenciación osteoblástica⁴² por lo que estos dos factores (energía superficial y la hidrofilia de la superficie) juegan un papel muy importante en la interacción del implante con las proteínas e influyen fuertemente la adhesión celular^{43, 44}.

Al igual que la rugosidad superficial, estos parámetros pueden modificarse para mejorar la adhesión en la intercara hueso-implante, tanto en el proceso de producción del implante, como mediante la síntesis de recubrimientos para su deposición sobre la pieza.

Uno de los métodos más estudiados es la deposición de fosfato de calcio (CaP) debido a su similitud con la composición del hueso. Las técnicas de recubrimiento de implantes dentales, se basan en la síntesis de recubrimientos de fosfatos, casi siempre hidroxiapatita (HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) debido a que son considerados bioactivos y osteoinductivos. Este carácter bioactivo, se debe a que tras la implantación, se liberan al medio iones de calcio y fosfato, saturando el fluido biológico con estos iones y produciéndose una deposición de apatita biológica en la intercara implante-hueso⁴⁵. Esta capa de apatita actúa como matriz para la adhesión y proliferación de las células osteogénicas dando así comienzo al proceso de osteointegración^{46, 47}. De hecho se ha estudiado también, que los osteoclastos (células encargadas de la resorción ósea) son capaces de degradar el recubrimiento de fosfato de calcio de manera enzimática para crear canales de resorción en la superficie del recubrimiento⁴⁸.

Las técnicas más utilizadas para la modificación físico-química de los implantes son principalmente, la proyección por plasma (*plasma spraying*), la pulverización catódica (*sputter deposition*), la deposición electroforética (*electrophoretic deposition*), la precipitación biomimética que intenta simular el proceso natural y consiste en la precipitación de cristales de apatita biológica sobre el metal, a partir de fluidos biológicos simulados (FBS)⁴⁹, y la obtención de recubrimientos mediante el proceso *sol-gel*. De esta última técnica se hablará más adelante, ya que es la elegida para el desarrollo del presente trabajo.

1.2.2.3. Modificaciones bioquímicas

Este tipo de modificaciones ofrecen una alternativa a los dos tipos anteriores, y se basan en el entendimiento de los procesos biológicos y bioquímicos que tienen lugar en la adhesión, diferenciación y remodelación celular. El objetivo principal de estas técnicas, es el de crear superficies que estimulen estas respuestas celulares favorables cuando se implanta una prótesis, y para ello se inmovilizan en la superficie del implante, péptidos, factores de crecimiento, proteínas, enzimas y

moléculas activas (fármacos) que estimulen las respuestas celulares específicas para una correcta osteointegración.

La inmovilización de estas moléculas se puede dar por diferentes métodos siendo los más utilizados, la adsorción física, la unión covalente y la liberación de moléculas bioactivas directamente en la intercara implante-hueso³³.

La adsorción física de moléculas como proteínas y factores de crecimiento, ha demostrado un aumento de la actividad osteoblástica en cuanto a adhesión, proliferación y diferenciación, en comparación con superficies no tratadas⁵⁰. Esta adsorción física o fisorción depende de las características superficiales del material a implantar (rugosidad, hidrofilia, carga superficial). Sin embargo, su mayor inconveniente es la falta de control en la desorción de las moléculas³³ y la excesiva velocidad de la misma. Por este motivo, la unión covalente es una opción más atractiva, siendo la unión de las moléculas a la superficie mucho más estable e irreversible.

Uno de los métodos de unión covalente más comunes es la silanización, técnica en la que se recubre la superficie del titanio con un silano que actúa como molécula puente entre la superficie del titanio y la biomolécula⁵¹ (figura 1.7).

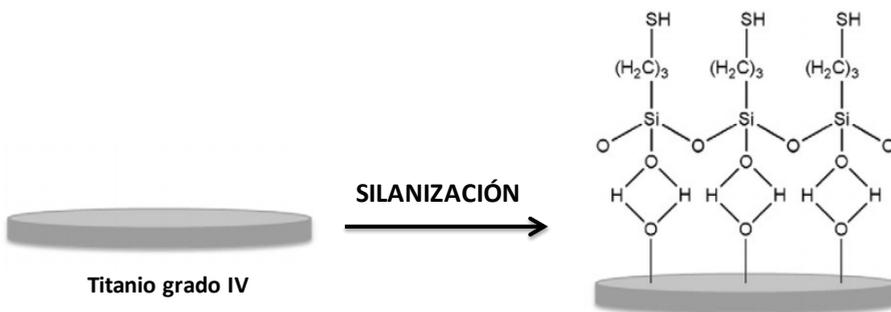


Figura 1.7: Diagrama esquemático del proceso de silanización⁵².

Normalmente, se utilizan péptidos en vez de proteínas para evitar las desnaturalizaciones de la estructura funcional de la proteína. Hay numerosos trabajos focalizados en el uso del péptido RGD⁵² formado por secuencias de aminoácidos arginina-glicina-ácido aspártico. El RGD contiene integrinas que presentan sitios de unión para las moléculas de la matriz extracelular ósea. Así, las

superficies conteniendo péptidos RGD podrían tener afinidad para atraer de manera activa a las células óseas tras la implantación⁵².

Por último, dentro de las modificaciones bioquímicas, se encuentra la liberación de moléculas activas mediante su introducción en un recubrimiento que actúa como matriz de liberación³³. Estas matrices de liberación pueden ser poliméricas, hidrogeles tipo sol-gel y pueden tratarse también de recubrimientos de fosfato de calcio-HA^{45, 46, 47}. Estas matrices se pueden funcionalizar con moléculas bioactivas, factores de crecimiento o fármacos que promuevan la osteointegración.

2. INFECCIONES BACTERIANAS

2.1. Periimplantitis

Los fallos biológicos que como se ha comentado en apartados anteriores, están asociados a la acumulación de placa microbiana y posterior formación de un biofilm bacteriano, se pueden subdividir en fallos tempranos o fallos tardíos.

Los fallos tempranos se asocian a una infección bacteriana debida a la contaminación en la misma colocación del implante, o a una deficiente cicatrización del tejido huésped. Los fallos tardíos, sin embargo, tienen lugar tras un año desde la colocación del implante y se deben a la acumulación de placa bacteriana en la superficie del implante, lo que puede derivar en una infección bacteriana, como la periimplantitis^{7, 53, 54}, siendo ésta una de las causas probables del fallo del implante.

Estas infecciones están causadas por la colonización bacteriana alrededor del implante, concretamente, en la intercara hueso-implante requiriendo, en muchos casos, la eliminación del mismo. La problemática de las infecciones bacterianas es un tema de gran actualidad debido al alto número de implantes que se están colocando en los últimos años³, y al mayor número de años en función de los implantes ya colocados, cifras que cada año aumentan exponencialmente. Durante los siguientes 1-5 años de la colocación del implante, la periimplantitis se da en un 20% de los pacientes y en un 10% de los implantes^{55, 56}, siendo ésta la causa biológica más probable en el fallo del implante a largo plazo^{57, 58}.

El término periimplantitis se introdujo hace un par de décadas y se atribuyó a las condiciones patológicas o al proceso infeccioso alrededor del implante⁵⁹. Más tarde, en 1993 en la primera Convención Europea de Periodontología, se redefinió

este concepto como el proceso destructivo alrededor de un implante en proceso de osteointegración, que puede resultar en la pérdida del soporte óseo y por lo tanto en la ausencia de la osteointegración (Albrektsson & Isidor 1994). Es en este punto, donde se puede diferenciar entre mucositis y periimplantitis⁵⁹, siendo ambas causadas por una infección bacteriana. La mucositis se define como una inflamación de los tejidos suaves alrededor del implante sin signos de pérdida ósea. Es un proceso reversible si se detecta y se trata tempranamente, pero, en caso de no ser correctamente tratada, puede afectar a los tejido periimplantarios afectando al hueso de soporte, y produciéndose la periimplantitis. Por lo tanto, en el caso de la periimplantitis, esta reacción inflamatoria coexiste con una pérdida del soporte óseo del implante y la consecuente pérdida de la pieza implantada (figura 1.8).

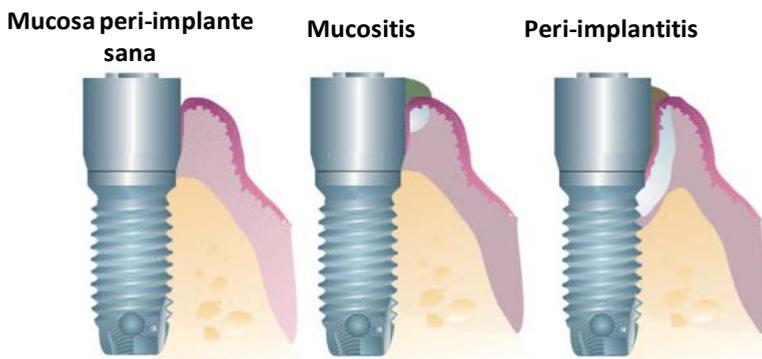


Figura 1.8: Implante dental sano y correctamente integrado r implante dental infectado con pérdida de osteointegración en el hueso receptor.

Dentro de las investigaciones realizadas para combatir la periimplantitis hay que tener en cuenta el desafío que supone dotar a la superficie de titanio de los implantes de propiedades antibacterianas, y a su vez, la gran resistencia que son capaces de desarrollar las cepas bacterianas a las terapias convencionales con antibióticos. Teniendo en cuenta que prevenir una colonización bacteriana es la clave para limitar la propagación de la infección, el desarrollo de recubrimientos antibacterianos bien antiadhesivos o bien capaces de erradicar un biofilm es, hoy en día, un campo muy activo de la investigación, influido en gran medida por la urgencia de encontrar alternativas a la tradicional toma sistemática de antibióticos, y a la resistencia desarrollada por cepas bacterianas a estos compuestos.

Por lo tanto, uno de los retos más importantes ha sido y es entender el mecanismo y las causas de la colonización bacteriana y de ese modo prevenirla o erradicarla.

2.2. Causas de la colonización bacteriana

La cavidad oral está colonizada por una enorme diversidad de bacterias, y es un lugar propicio para el desarrollo de biofilms microbianos. A pesar de la gran variedad de bacterias orales que coexisten, la formación de un biofilm sigue un patrón determinado que pasa por una colonización inicial rápida, seguida de una segunda colonización mediante adhesión entre bacterias^{60, 61} (figura 1.9). De este modo, las bacterias formadoras de placa dental (que puede derivar en una infección), se dividen en dos grupos en función de su efecto en la formación del biofilm: las bacterias colonizadoras tempranas (mayor capacidad de adherencia), y las bacterias colonizadoras tardías⁶². Existen además, otro tipo de bacterias como la cepa *Lactobacillus Salivarius*, que tiene un papel muy importante en cuanto a la formación del biofilm y su mantenimiento, tanto mediante su interacción con otras cepas bacterianas como mediante sus subproductos de desecho, que actúan aportando integridad al biofilm y favoreciendo la adhesión de más bacterias⁶³.

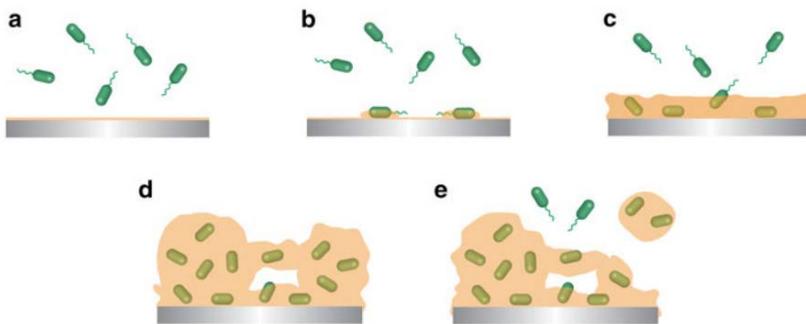


Figura 1.9: Formación de un biofilm bacteriano⁶¹. Adhesión bacteriana inicial sobre la superficie del sustrato (a), producción y secreción de sustancias poliméricas extracelulares bacterianas, EPS (b), adhesión y proliferación bacteriana (c), formación del biofilm maduro (d) y migración de algunas bacterias a los tejidos circundantes para iniciar una nueva colonización (e).

Por lo tanto, la adhesión bacteriana inicial tras la implantación es el resultado de un conjunto de interacciones tanto específicas como no específicas entre diferentes bacterias⁶⁴. Entre estas interacciones se encuentran la energía libre

superficial del sustrato, la hidrofilia/hidrofobia de la propia cepa bacteriana, la carga y la química de la superficie, la rugosidad y la presencia de proteínas, alguna de las cuales favorecen esta adhesión.

Sin embargo, en la infección de un implante tienen lugar muchos factores además de la formación de un biofilm microbiano. Éstos pueden ser factores generales (propios del paciente), o factores locales (propios de las características del implante dental)⁶⁵. En cuanto a los factores generales, diversos estudios han demostrado que aquellos pacientes con una enfermedad periodontal crónica son de cuatro a cinco veces más susceptibles de sufrir una periimplantitis^{59, 66}, al igual que los pacientes fumadores, diabéticos, que hayan recibido tratamientos de quimioterapia o aquellos con una baja densidad ósea. En estos casos, el fallo de los implantes se debe a la falta de unión entre el implante y el tejido óseo huésped, que favorece la formación de huecos para la colonización bacteriana debido al mal sellado biológico entre el implante y la encía (figura 1.10).



Figura 1.10: Comparación entre un implante dental recién insertado en el paciente (a), y tras sufrir una periimplantitis (b) con pérdida del soporte óseo.

En cuanto a los factores locales, destacan la rugosidad y la morfología superficial de los materiales implantados. Así, se ha comprobado que superficies rugosas favorecen la acumulación y retención de una mayor cantidad de placa bacteriana que las superficies lisas, ya que la rugosidad ofrece huecos que protegen a las bacterias de las defensas del organismo huésped y de los tratamientos rutinarios de higiene oral⁶⁷ y además, estas superficies rugosas tienen un área superficial mayor⁶⁴ (mayor área de contacto bacteria-superficie y mayor potencial de unión).

En todos los casos, tras la implantación, las bacterias migran desde pequeños huecos en los tejidos orales que rodean a la pieza dental perdida, hasta la superficie y los alrededores del implante para colonizarlo. La adhesión bacteriana consiste en una atracción inicial de las células hacia la superficie seguida de una adsorción y acoplamiento de las mismas a dicha superficie⁶⁴. Esta colonización comienza en las pequeñas irregularidades superficiales del implante para extenderse a lo largo del implante hasta su base⁶⁸. A su vez, estas irregularidades superficiales protegen a las bacterias de ser eliminadas de forma natural (por ejemplo mediante la saliva o tratamientos rutinarios de limpieza) y hacen que su adhesión y posterior proliferación aumente⁶⁷.

La habilidad bacteriana de adherirse a la superficie de un sustrato y formar un biofilm es una propiedad general de casi todas las bacterias y, tal y como se ha comentado anteriormente, depende de una serie específica de eventos, todos ellos característicos del tipo de bacteria, de la superficie del sustrato a colonizar y del entorno oral^{53, 69}. En cuanto al tipo de bacteria, hay que tener en cuenta que diferentes tipos y cepas bacterianas se adhieren de manera distinta a un sustrato debido a sus características fisicoquímicas⁶⁴, como por ejemplo, su hidrofobia/hidrofilia (bacterias hidrófobas son más proclives a colonizar superficies hidrófobas y viceversa) o como su carga superficial, a pesar no estar clara hoy en día su influencia en la colonización bacteriana.

En cualquier caso, diversos estudios han demostrado que transcurrida una hora desde la colocación del implante ya se pueden identificar diferentes tipos de bacterias, y que un biofilm bacteriano tarda sólo 2 semanas en formarse⁷⁰. Esto conlleva la necesidad de una rápida actuación para erradicar este biofilm y evitar que la infección siga adelante con la consecuente pérdida de masa ósea y la necesaria eliminación de la pieza.

Un hecho contrastado, es la gran diversidad de bacterias que se encuentran en la cavidad oral, teniendo en cuenta que un biofilm microbiano puede suponer más de 700 especies diferentes de bacterias interactuando entre ellas^{71, 72}. Por este motivo, es muy importante diferenciar si las colonias bacterianas que colonizan un implante son las mismas o son diferentes de aquellas que se encuentran en dientes naturales adyacentes⁷³. Mombelli (1995), sugirió la posibilidad de transferencia de bacterias desde lugares afectados por periodontitis hasta el lugar donde se inserta el

implante. Esto tiene una gran importancia en cuanto a las estrategias de erradicación de un biofilm, puesto que de este modo se puede determinar si la colonización bacteriana de un implante se debe a causas de contaminación adyacente o si existen tipos de bacterias concretas que infectan un implante sin tener relación con los dientes naturales.

Lo que está claro es que la infección bacteriana de un implante es un hecho mucho más complejo que una periodontitis. A pesar de ello se han encontrado bacterias asociadas a la periodontitis en casos de periimplantitis, (*Bacteroides*, *Campylobacter*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, and *Treponema species*). Por otro lado, también se encuentran otro tipo de bacterias en mucha mayor proporción cuando se trata de la infección en un implante que cuando se trata de una infección en un diente natural (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*)⁷⁴.

Uno de los tipos de bacteria más común asociado a infecciones relacionadas con la implantología pero no en el estudio de la periodontitis, es el patógeno *Staphylococcus aureus*. Este tipo de bacteria ha demostrado tener una afinidad específica por todo tipo de superficies de titanio⁷⁴. Esta adhesión está influenciada, como ya se ha comentado con anterioridad, por la topografía superficial del implante. Las infecciones producidas por este tipo de bacterias son muy difíciles de erradicar debido a la formación de un biofilm bien desarrollado que les protege de la acción de diferentes agentes antimicrobianos. Por este motivo, la cepa bacteriana *Staphylococcus aureus* es muy importante en el desarrollo de infecciones bacterianas relacionadas con material médico, especialmente en implantes dentales.

Todos estos estudios demuestran que las causas de la periimplantitis son complejas y muy variadas, dependen tanto del paciente en el que se va a realizar la cirugía como del diseño del implante que se va a colocar en el paciente.

Así, la búsqueda de una superficie que sea capaz de evitar la adhesión y colonización bacteriana en la zona que rodea el implante, es un tema de indudable interés, y buena muestra de ello es la gran cantidad de publicaciones que se han ido desarrollando a lo largo de estos últimos años en este campo.

2.3. Agentes antibacterianos más utilizados

Durante los últimos años, se han desarrollado recubrimientos antibacterianos cuya función depende de un amplio rango de moléculas que se incorporan para su liberación en el organismo o para su inmovilización, todas ellas con un marcado carácter antibacteriano^{75, 76, 77}. Estos agentes antibacterianos se pueden dividir en grupos en función de su composición o mecanismo de actuación: 1) metales, 2) antibióticos y 3) compuestos catiónicos.

2.3.1. Metales

Los iones, sales o nanopartículas metálicas son un tipo muy importante de agentes antibacterianos inorgánicos^{76, 77, 78, 79, 80}. Entre estos metales, los más conocidos por sus propiedades antibacterianas son la plata, el oro, el cobre, y el zinc.

En el caso concreto de la plata como agente biocida, ésta ha sido ampliamente utilizada y estudiada debido al amplio espectro de microorganismo que es capaz de erradicar (bacterias, hongos y levaduras), y debido a que las cepas bacterianas no desarrollan resistencia frente a ella^{81, 82}. Esta característica tiene su origen en los diferentes modos de acción de este metal, concretamente de los iones (Ag^+) que se liberan^{77, 78, 83}. Estos mecanismos han sido extensamente estudiados y pasan por alterar la función y estructura de las proteínas de la pared celular bacteriana, rompiéndola⁷⁷. También se cree que estos iones Ag^+ , se unen a los grupos tiol característicos de algunas proteínas que juegan un papel muy importante en la células bacteriana, y por lo tanto mediante esta unión causan la muerte del microorganismo. Por último, estos iones pueden interferir con al ADN bacteriano durante la división celular y posterior replicación. Debido a estos diferentes mecanismos de actuación se reduce considerablemente la capacidad de las bacterias de crear resistencia a los iones. Estos mecanismos de acción son extrapolables a los iones de cobre y zinc.

En los últimos años se ha desarrollado un interés creciente en el uso de estos metales (sobre todo de plata) en forma de nanopartículas metálicas como agentes antibacterianos^{79, 82, 84, 85}. Las nanopartículas, debido a su pequeño tamaño (menos 100 nm) tienen una gran área superficial lo que permite una alta liberación de iones de Ag^+ . Además, pueden unirse directamente a la membrana celular de las bacterias en incluso penetrarla, causando la muerte bacteriana. La capacidad bactericida de

las nanopartículas de plata depende en gran medida de sus dimensiones y tamaño, y uno de sus grandes inconvenientes es su posible citotoxicidad sobre células no bacterianas en el tejido huésped^{82, 86}, disminuyendo la viabilidad celular y, en algunos casos, provocando un fallo en la integración del implante.

En la figura 1.11 se muestran los posibles mecanismos de actuación de las nanopartículas de plata y de los iones de plata liberados, en contacto con una célula bacteriana.

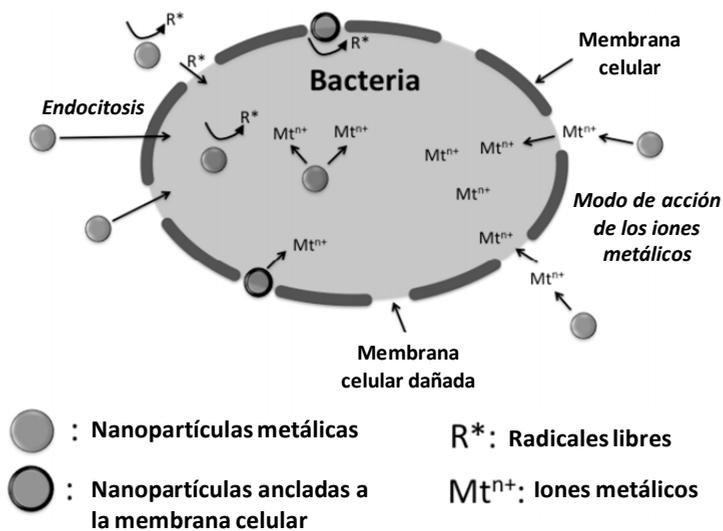


Figura 1.11: Mecanismos de actuación de las nanopartículas metálicas, en contacto con una bacteria.

2.3.2. Antibióticos

Otro importante tipo de agentes antibacterianos, son los antibióticos^{87, 88, 75, 76, 77}. El uso sistemático de este tipo de moléculas ha sido extensamente utilizado durante siglos como tratamiento rutinario ante una infección bacteriana. El mayor problema de los antibióticos es la capacidad de las bacterias de desarrollar resistencia frente a ellos, haciendo que su poder biocida disminuya e incluso, sea nulo⁸⁹, como es el caso de la cepa bacteriana *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina. Esto se debe a la matriz secretada por las colonias bacterianas que van adhiriéndose a la superficie para formar el biofilm, y que les protege de la acción de los antibióticos⁹⁰.

A pesar de ello, los antibióticos siguen siendo usados en todo el mundo, y están siendo objeto de nuevas investigaciones en el desarrollo de superficies antibacterianas, sobre todo por las nuevas posibilidades de liberación de estos agentes activos de manera localizada en el sitio de infección, y por la amplia posibilidad de modular esta liberación^{88, 91, 76}, administrando, por ejemplo, altas dosis en la zona de infección, sin exceder el límite sistemático de citotoxicidad del organismo⁹⁰. Entre los antibióticos más utilizados se encuentran la gentamicina, la cefalotina, la amoxicilina, el metronidazol, la tobramicina, y la vancomicina⁹².

Una de las prácticas más comunes en cirugía ortopédica, es la liberación de estos antibióticos a partir de matrices o recubrimientos de hidroxapatita o fosfato de calcio, ya que de este modo, se dota al material de capacidad antibacteriana a la vez que se favorece a biocompatibilidad^{76, 93, 94, 95, 96}. Uno de los ejemplos más llamativos, es la síntesis de cementos óseos de poli(metilmetacrilato), PMMA con incorporación de antibióticos⁹⁷. Sin embargo, una de las grandes limitaciones de este tipo de matrices es su incapacidad para liberar el 100% del fármaco encapsulado, así como su no biodegradabilidad, lo que supone una segunda intervención quirúrgica para eliminar el material tras la desaparición de la infección^{98,99}.

Del mismo modo, recubrimientos poliméricos o tipo sol-gel con la incorporación de antibióticos han experimentado un gran desarrollo estos últimos años como matrices para la liberación controlada de antibióticos sobre superficies de titanio^{97, 98}. En cuanto a los recubrimientos poliméricos, se han desarrollado recubrimientos de PDLLA con la incorporación de gentamicina sobre implantes de titanio, que han demostrado, no sólo la prevención de la adhesión bacteriana al implante (*Staphylococcus aureus*), sino también la liberación del antibiótico en el tiempo impidiendo el desarrollo de resistencia bacteriana y no dañando las células óseas¹⁰⁰.

Adicionalmente, en los últimos años el proceso sol-gel ha cobrado una gran importancia en el ámbito de los recubrimientos para su uso como matrices de liberación controlada. Esto se debe a la posibilidad que ofrece este proceso sol-gel de formar xerogeles en medio acuoso a temperatura ambiente, de manera que se posibilita la encapsulación de biomoléculas como, por ejemplo, antibióticos⁹⁸. Además, entre las ventajas de este proceso de síntesis se encuentra la estabilidad de los materiales obtenidos, su alta biocompatibilidad, su simplicidad de síntesis y su

degradabilidad. Por este motivo, el proceso sol-gel se ha convertido en una alternativa prometedora en el campo de los biomateriales y como matrices para encapsulación y liberación controlada de fármacos.

Hay varios trabajos de investigación en los que se han sintetizado recubrimientos multicapa mediante el proceso sol-gel (utilizando como precursor el Tetraetilortosilicato, TEOS y realizando la síntesis en medio ácido) con la introducción de diferentes porcentajes de vancomicina sobre superficies de titanio, obteniéndose no sólo buenos resultados antibacterianos frente a *Staphylococcus aureus*, sino también con la posibilidad de modular la liberación del antibiótico para diferentes necesidades terapéuticas^{101, 102, 103}. Otro ejemplo, es la síntesis de un vidrio bioactivo mediante el método sol-gel con la incorporación del antibiótico gentamicina. Estudios *in vivo* en fémur de conejo de este material han demostrado su alta biocompatibilidad, su capacidad de osteointegración en el hueso así como su validez como matriz local liberadora de gentamicina⁹⁹.

2.3.3. Compuestos catiónicos

Los compuestos catiónicos más utilizados como agentes biocidas son, compuestos de amonio cuaternario, péptidos antimicrobianos y moléculas naturales como el quitosano, entre otros⁹⁰.

En cuanto a los compuestos de amonio cuaternario^{87, 104, 105}, son los desinfectantes y antisépticos más utilizados actualmente en hospitales. Son reconocidos antisépticos de una alta efectividad frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas. A pesar de que su mecanismo de actuación no está totalmente esclarecido, hay dos hipótesis sobre este punto. La primera afirma que la larga cadena catiónica de estas moléculas penetra en la membrana celular bacteriana produciendo su lisis, mientras que la segunda propone un intercambio de iones entre la superficie cargada positivamente y la membrana bacteriana, ocurriendo en ambos casos la alteración de esta membrana y la muerte celular.

Dentro de este tipo de moléculas se encuentran compuestos de amonio cuaternario de silicio (Silicon Quaternary Ammonium Compounds, Si-QAC)¹⁰⁶, poliméricos (Polietilenimina cuaternizada o Q-PEI, Polivinilpiridina cuaternizada o Q-PVP, entre otros)^{107, 108} y algunas sales.

En cuanto a los compuestos de amonio cuaternario poliméricos, éstos tienen la desventaja y la limitación de no ser biocompatibles y llegar incluso a causar irritación en las células, como es el caso de los compuestos Q-PVP^{109, 110}.

Por este motivo, en los últimos años, el uso de compuestos de amonio cuaternario basados en silicio, han recibido una gran atención debido a su biocompatibilidad, y a la posibilidad de inmovilización de este tipo de compuestos sobre superficies hidroxiladas, como los óxidos metálicos de las superficies de los implantes. De esta manera, los grupos silanoles se anclan covalentemente al sustrato quedando los grupos amino libres para la bioactividad⁹⁰. Además, esta unión covalente asegura una larga acción bactericida en el tiempo ya que impide su difusión.

Este tipo de materiales son excepcionales bactericidas, y su mecanismo de actuación se basa en la absorción y penetración del agente en la pared celular, su reacción con la membrana citoplasmática, la degradación de proteínas esenciales y ADN y finalmente la lisis celular¹⁰⁴.

A pesar de que diversos estudios han demostrado la efectiva actividad antibacteriana de este tipo de compuestos, al igual que en el caso de la plata, su gran inconveniente es su posible citotoxicidad en el organismo receptor. Se cree que el hecho de que estos compuestos sean capaces de introducirse o perturbar la membrana celular de las bacterias, podría tener el mismo efecto en las membranas celulares humanas⁹⁰.

Además de los compuestos de amonio cuaternario, uno de los descubrimientos más recientes son los péptidos antimicrobianos (AMPs)^{77, 111, 112}. Estos péptidos son moléculas naturales secretadas por varios tipos de organismos vivos (vegetales, insectos, anfibios, etc.) como protección frente a microorganismos invasivos. Éstos, poseen un amplio espectro de actividad antibacteriana, tienen una alta efectividad incluso a bajas concentraciones, son altamente específicos e impiden el desarrollo de resistencia bacteriana frente a ellos¹¹³. Debido a su pequeño tamaño, su carácter anfifílico y su carácter catiónico (cargados positivamente), interfieren en la membrana celular bacteriana uniéndose a ella¹¹³, penetrando en el citoplasma bacteriano y finalmente, alterando esta membrana^{114, 115}, o actuando en el interior de la bacteria como objetivos internos para finalmente producir su muerte (figura 1.12).

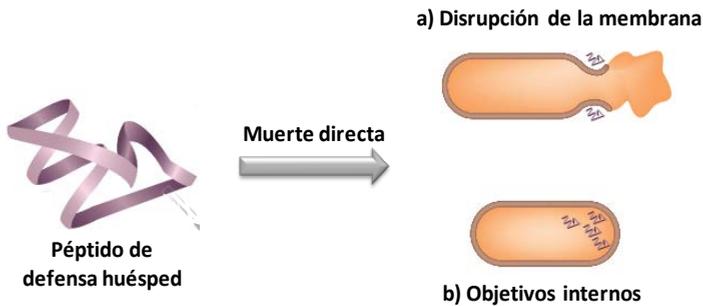


Figura 1.12: Posibles mecanismos de acción de los AMPs como agentes bactericidas¹¹⁵.

Otro de los avances más recientes y relevantes en el campo de los recubrimientos antibacterianos se basa en la utilización de un biopolímero catiónico natural como es el quitosano. El quitosano es un polímero policatiónico con un marcado carácter antimicrobiano. Se trata de un polisacárido procedente de la desacetilación de la quitina (macromolécula abundante en el exoesqueleto de crustáceos y algunos hongos)^{116, 117} (figura 1.13).

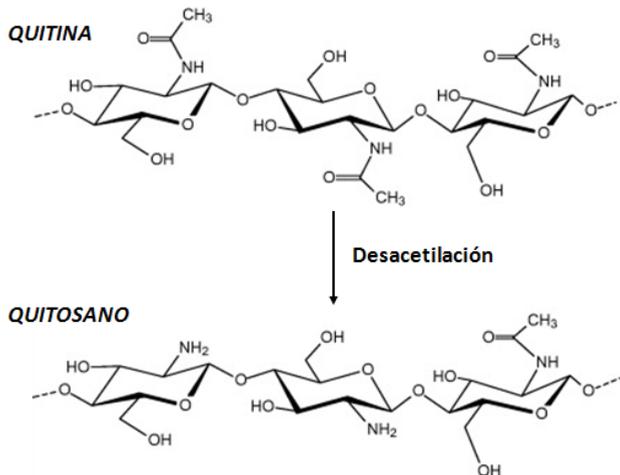


Figura 1.13: Estructura de la quitina y del quitosano por desacetilación de la quitina.

En los últimos años, esta macromolécula ha sido ampliamente utilizada en el campo de los biomateriales debido a su gran biocompatibilidad, alta capacidad en la curación y cicatrización de heridas, su degradación *in vivo* mediante lisozimas y por supuesto, su poder antimicrobiano¹¹⁶. Este comportamiento se basa en la capacidad de prevenir el crecimiento bacteriano sobre la superficie que crea¹¹⁸ y este poder

antimicrobiano depende en gran medida del grado de desacetilación del quitosano¹¹⁹. Se basa en la interacción entre las cargas positivas de la molécula de quitosano y las membranas celulares microbianas, cargadas negativamente, que resulta en la alteración de la permeabilidad de la membrana microbiana, o en la perturbación de la integridad de la misma¹²⁰.

En cualquier caso, el uso del quitosano como agente antibacteriano suele ser mediante la síntesis de recubrimientos de este material sobre la superficie a proteger. También se suele combinar con otros agentes antimicrobianos como antibióticos, para potenciar su efecto antibacteriano. Este es el caso de los recubrimientos de quitosano-vancomicina^{121, 122}, actuando el quitosano como matriz de liberación del antibiótico, y obteniéndose buenos resultados en cuanto al carácter antibacteriano de los mismos.

Otra de las estrategias más utilizadas en cuanto a este polímero, es la síntesis de nanopartículas de quitosano también para su actuación como vehículos de liberación de biocidas encapsulados, por ejemplo, el antibiótico ciprofloxacino^{117, 120}, con la rápida liberación de dicho antibiótico y la reducción de *S. Aureus*.

También dentro de los compuestos catiónicos, se encuentran las bisbiguanidas, como es el caso de la clorhexidina. La clorhexidina (CHX) es un antiséptico, desinfectante y biocida de amplio espectro, eficaz contra un amplio espectro de microorganismo (bacterias Gram positivas, bacterias Gram negativas, hongos y levaduras)^{123, 124}. En función de su concentración, puede presentar acción bacteriostática (inhibe el crecimiento bacteriano) a concentraciones bajas, y por otro lado, acción bactericida (elimina las bacterias ya adheridas) a concentraciones altas^{123, 125}. Su acción está determinada por daño a la membrana celular, mediante la unión de sus grupos cargados positivamente a la membrana microbiana, alterando su equilibrio osmótico y finalmente produciendo su muerte¹²⁵.

El uso más relevante de este tipo de agente antimicrobiano en aplicaciones orales, es en forma de enjuagues bucales. En las aplicaciones orales, la clorhexidina se une al tejido bucal, a la mucosa oral y a los dientes. Después, se libera en el tiempo para llevar a cabo su acción bactericida¹²³. Para aplicaciones médicas, está disponible en forma de sal estable, como diacetato o gluconato de clorhexidina.

Finalmente, la octenidina también es un potente agente antimicrobiano de amplio espectro, válido contra una variedad de bacterias Gram positivas, Gram negativas, clamidias y hongos. Como en los casos anteriores, al ser una sustancia catiónica, se une al envoltorio celular bacteriano que está cargado negativamente, interrumpiendo las funciones vitales de la membrana celular, y produciendo por lo tanto la muerte celular. Debido a su estructura, la octenidina es estable bajo diferentes condiciones químicas y físicas, no siendo propensa a la hidrólisis. Además, es estable también bajo condiciones de pH que van desde valores de 1,6 hasta 12,2. Todo esto favorece su acción bactericida.

También resulta interesante porque es muy efectiva en la inhibición del crecimiento de la placa bacteriana. Reacciona con los polisacáridos en la pared celular de los microorganismos, ataca a los sistemas enzimáticos y destruye la función celular. Como resultado, también se altera la función mitocondrial. Su eficacia bacteriostática y bactericida es alrededor de 10 veces mayor que la de la clorhexidina. Su baja citotoxicidad y la alta eficacia antimicrobiana, hacen que sea un excelente candidato para prevenir las infecciones. La forma más utilizada es como dihidrocloruro de octenidina.

2.4. Implantes de titanio con características antibacterianas

La incorporación de los agentes antibacterianos descritos sobre la superficie de los implantes, tiene como finalidad el prevenir o eliminar infecciones bacterianas como la periimplantitis.

Teniendo en cuenta que una vez que se forma un biofilm microbiano, éste es muy difícil de erradicar debido a la matriz de polisacáridos que secretan las bacterias, y que las protege de la acción de los antibióticos^{90, 126}, el mayor reto es prevenir este ataque primario que da lugar a la colonización impidiendo la adhesión de los microorganismos, o, crear una superficie capaz de erradicar el biofilm tras su formación.

Así, los sistemas antimicrobianos se pueden clasificar en dos tipos básicos, los sistemas que evitan la adhesión bacteriana que se pueden denominar recubrimientos pasivos, y los que una vez adheridas, son capaces de erradicarlas, y que se podrían denominar recubrimientos activos (figura 1.14).

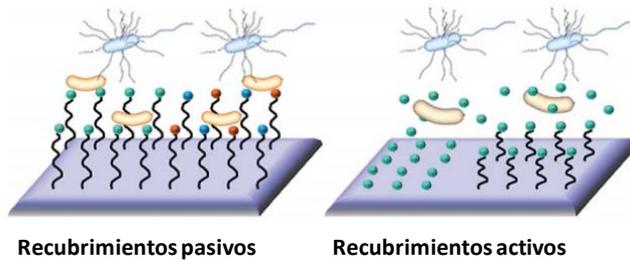


Figura 1.14: Representación esquemática del principio básico de los dos tipos generales de sistemas antibacterianos.

Para este fin, existen diferentes tipos de estrategias para dotar a los implantes de actividad antibacteriana, como son: 1) las modificaciones superficiales físicas y químicas del titanio, dando lugar a una superficie desfavorable para la adhesión bacteriana, 2) los recubrimientos poliméricos antiadherentes, y 3) las estrategias basadas en la incorporación de agentes biocidas en una matriz(encapsulación de fármacos)¹²⁷.

2.4.1. Modificaciones superficiales de los implantes de titanio

Al utilizar este tipo de estrategias, hay que tener en cuenta que las propiedades superficiales de un implante, como la rugosidad, hidrofilia, energía superficial, etc.^{64, 67} son factores muy importantes en la adhesión bacteriana inicial y la consecuente formación de un biofilm. En cuanto a la rugosidad, diferentes estudios *in vitro*, han demostrado que las superficies de titanio rugosas favorecen una mayor adhesión bacteriana comparándolas con superficies lisas¹²⁸. Del mismo modo, diferentes estudios *in vivo* establecieron una relación directa entre la rugosidad superficial de diferentes implantes de titanio y la adherencia bacteriana durante las primeras 24 horas tras la implantación¹²⁹. Estas 24 horas son muy importantes, puesto que estas bacterias colonizadoras primarias en contacto con la superficie van a determinar la fuerza de adhesión del resto de bacterias para la formación del biofilm.

Por tanto, la modificación físico-química de la superficie es uno de los métodos más estudiados y más efectivos como mecanismo para evitar la adhesión bacteriana inicial, y de este modo prevenir las infecciones bacterianas^{127, 130, 131}.

Durante los últimos años se ha investigado en cómo diferentes modificaciones superficiales en los implantes podría disminuir esta adhesión e incluso evitarla. Un ejemplo de este tipo de estrategia, es la irradiación de luz UV sobre el implante, lo que deriva en una mayor hidrofilia de la capa de óxido de titanio inhibiendo la adhesión bacteriana sin comprometer la osteointegración del sistema¹³². Del mismo modo, modificando la cristalinidad de la capa de óxido superficial del titanio, se puede reducir significativamente la adhesión bacteriana sin afectar a la actividad metabólica de las células receptoras. Otro de los métodos más efectivos y más utilizados actualmente, es el dopado de los implantes con agentes antibacterianos metálicos como plata, cobre o zinc⁸⁰.

Otro tipo de modificación superficial, es la deposición de plata en estado metálico y en estado oxidado sobre superficies de titanio (mediante anodizado electroquímico, etc.). Se ha demostrado una disminución significativa de dos cepas bacterianas presentes en las etapas de formación del biofilm^{62, 64}, disminuyendo la formación de dicho biofilm, sin afectar a la biocompatibilidad¹³³. En otros estudios, se ha utilizado la técnica de oxidación por microarco (MAO), para la incorporación de plata en la superficie de titanio, dando como resultado una actividad antibacteriana importante a la vez que una mejora de la biocompatibilidad (mediante la precipitación biomimética de hidroxiapatita en SBF)¹³⁴. Esta técnica es parecida a la técnica de anodizado convencional⁸, que forma microcanales en las superficies del titanio promoviendo una mejora de la osteointegración. En este caso se emplean mayores potenciales y electrolitos no tóxicos. La plata se introduce en forma de acetato de plata en el electrolito, y finalmente se deposita en forma de iones sobre la superficie del titanio.

En el caso del Zn, Petrini (2006), modificó la capa natural de óxido de titanio, promoviendo la formación de una capa mixta de óxido de titanio y zinc, disminuyendo la viabilidad de 5 cepas bacterianas orales¹³⁵.

2.4.2. Recubrimientos poliméricos antiadherentes

En cuanto a los recubrimientos antiadhesivos, éstos previenen la formación del biofilm bacteriano usando mecanismos no citotóxicos^{87, 136, 137}. Tal y como se ha explicado anteriormente, la formación de un biofilm bacteriano, pasa por varias etapas, una etapa de adhesión inicial, rápida y reversible, seguida de una segunda etapa que tiene lugar mediante interacciones específicas y no específicas entre

bacterias (figura 1.9)⁶⁴. La inmovilización en la superficie del sustrato, de moléculas que sean capaces de resistir esta adhesión, mediante la creación de una topografía superficial desfavorable o una química superficial desfavorable, es la clave para el desarrollo de este tipo de recubrimientos. Previene la adhesión bacteriana pero no implican una interacción activa con ellas ni producen muerte bacteriana¹³⁸ (figura 1.15).

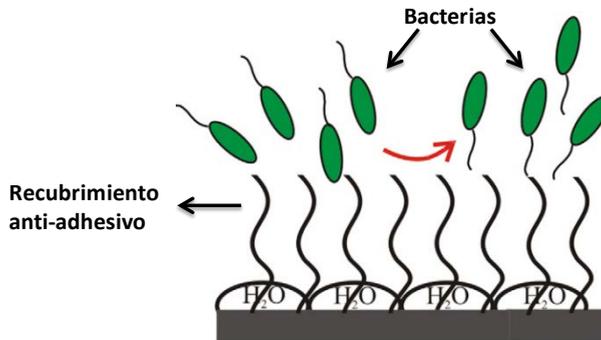


Figura 1.15: Mecanismo de actuación de los recubrimientos antibacterianos denominados antiadhesivos.

Dentro de este tipo de modificación superficial se encuentran los recubrimientos poliméricos⁷⁸, cuya deposición en implantes de titanio mediante la formación de una superficie inerte, inhiben la adhesión y el crecimiento bacteriano. El principio básico de este tipo de recubrimientos es repeler las bacterias evitando su adhesión.

Uno de los polímeros más estudiados y utilizados por sus propiedades antibacterianas es el Polietilenglicol (PEG)^{117, 139, 140}. Mediante la deposición de este material, se previene la adhesión del biofilm gracias a la capa protectora que forma, y que evita la adsorción de proteínas bacterianas y por lo tanto la adhesión de bacterias¹³⁸.

El PEG fue uno de los primeros polímeros usados en esta aplicación debido a su capacidad para reducir la adhesión de las células bacterianas sobre la superficie en la que se encuentra mediante la formación de un recubrimiento de tipo cepillo polimérico, *polymer brush coating*, (figura 1.16). Éste se puede incorporar a la superficies de los implantes mediante adsorción física, unión directa con la superficie, o unido a la superficie mediante enlaces que actúen de intermediarios.

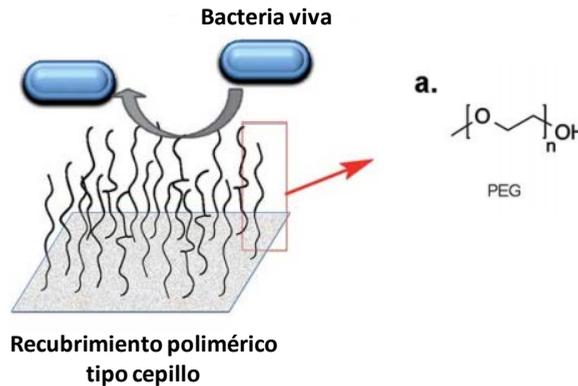


Figura 1.16: Representación esquemática de un recubrimiento antibacteriano tipo cepillo (polymer brush coating), que impide la adhesión bacteriana¹⁴¹.

A pesar de que durante años no se estudió este tipo de recubrimientos sobre superficies de titanio, recientemente, Buxadera-Palomero (2015)⁶³ han conseguido modificar la superficie de implantes dentales de titanio con recubrimientos basados en PEG, mediante polimerización por plasma. Además, en estudios *in vitro* se observa que estos recubrimientos disminuyen la adhesión bacteriana en la superficie de dos cepas bacterianas implicadas en la formación del biofilm sin comprometer la correcta adhesión celular (Fibroblastos humanos, hFFs, y línea celular de osteosarcoma humano).

Sin embargo, en lo referente a la prevención de la formación de un biofilm bacteriano en el tiempo, las estrategias de modificación superficial son bastante limitadas en cuanto a la eliminación de bacterias ya adheridas o de la erradicación de un biofilm ya formado. Por ello, en los últimos años se ha desarrollado en gran medida las investigaciones basadas en recubrimientos con incorporación de agentes antibacterianos que permiten la eliminación de las bacterias ya adheridas a la superficie del implante.

2.4.3. Recubrimientos como matrices de liberación de agentes biocidas.

Otra de las estrategias más utilizadas, es la utilización de agentes antibacterianos encapsulados en un matriz. Esta estrategia se diferencia de la anterior en que se requiere la síntesis o aplicación de un recubrimiento o matriz sobre la superficie del implante, con la encapsulación o incorporación de dichos

agentes¹²⁸, de manera que mediante la degradación de la red que los contiene difundan al exterior para actuar contra la infección.

La síntesis de recubrimientos liberadores de agentes antibacterianos, ha cobrado una gran importancia en los últimos años debido a la posibilidad que presentan en cuanto a erradicación de un biofilm mediante la liberación controlada del fármaco encapsulado. En función del tipo de biocida utilizado, y del mecanismo de incorporación del mismo, este tipo de recubrimientos puede tener una doble función, y evitar la adhesión bacteriana al implante, como prevención a la formación del biofilm, y además, prevenir las infecciones a largo plazo modulando la degradación de las matrices que contienen el biocida¹⁴². Además, mediante la modulación de la degradación, se pueden obtener diferentes velocidades de liberación, y de este modo se puede permitir una liberación muy rápida y concentrada inicial (crucial en el corto periodo post-implantación, donde tiene lugar la adhesión bacteriana, y cuando las defensas del huésped están más bajas)^{61, 76}.

Las dos principales estrategias en el desarrollo de recubrimientos antibacterianos^{75, 87, 136, 137, 143} se pueden diferenciar en función de su mecanismo de actuación. De este modo y dentro del tipo de recubrimientos que impiden la adhesión (recubrimientos pasivos), se encuentran los denominados *Contact-Killing*, recubrimientos de muerte por contacto. Por último, están los recubrimientos con capacidad de liberación del agente antibacteriano incorporado o recubrimientos activos. Las diferencias más significativas entre ellos son las siguientes:

1) Recubrimientos Contact Killing: Contienen agentes biocidas unidos covalentemente que causan la muerte bacteriana por contacto, impidiendo la adhesión y posterior formación de un biofilm.

2) Recubrimientos activos con liberación del biocida: Contienen al agente antibacteriano en una matriz y tras la degradación de ésta, difunde y se libera el principio activo causando la muerte bacteriana.

El mecanismo de actuación de los recubrimientos denominados *Contact Killing* (figura 1.17), se basa en la unión covalente del agente antibacteriano al sustrato mediante diferentes tipos de enlace, como por ejemplo, enlace covalente. Al entrar en contacto con las bacterias, éstas son eliminadas mediante la perturbación de su membrana celular por los agentes antibacterianos anclados a la

superficie^{136, 137, 138}. Uno de los ejemplos más notables de este tipo de recubrimientos son los que incorporan quitosano. Esta capacidad antimicrobiana, se basa en su naturaleza policatiónica, que interactúa con la membrana bacteriana cargada negativamente, produciendo la ruptura de sus componentes intracelulares¹⁴⁴. Otro de los ejemplos más significativos de este tipo de recubrimientos son los que unen covalentemente compuestos catiónicos, por ejemplo, compuestos de amonio cuaternarios¹³⁸.

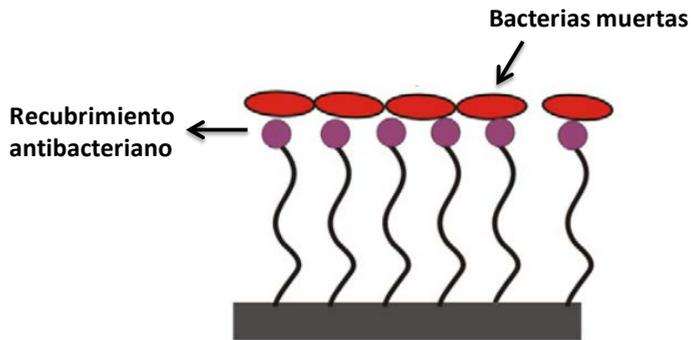


Figura 1.17: Mecanismo de actuación de los recubrimientos antibacterianos denominados "Contact-Killing".

En cuanto a los recubrimientos con capacidad liberadora del agente antibacteriano (recubrimientos activos)^{87, 136}, éstos basan su actividad en la difusión de la molécula activa en el tiempo, lo que permite eliminar las bacterias adheridas a la superficie del sustrato y las bacterias adyacentes (figura 1.18). Esta difusión tiene lugar cuando los recubrimientos están en medio acuoso, mediante la degradación o erosión de la matriz que los contiene, o bien mediante la hidrólisis de los enlaces que lo unen a la matriz⁸⁷. Una de las ventajas de este tipo de recubrimientos, es su capacidad de liberación local, es decir, en el punto exacto en que se da la colonización e infección bacteriana, sin exceder los límites de toxicidad sistemática. Además, estos materiales permiten la incorporación de una selección a medida de antibióticos para patógenos específicos asociados con las infecciones en implantes y disminuyendo los efectos adversos en otras zonas del organismo. Sin embargo, una de sus desventajas al tratarse de reservorios del agente activo, es que su acción está muy limitada temporalmente.

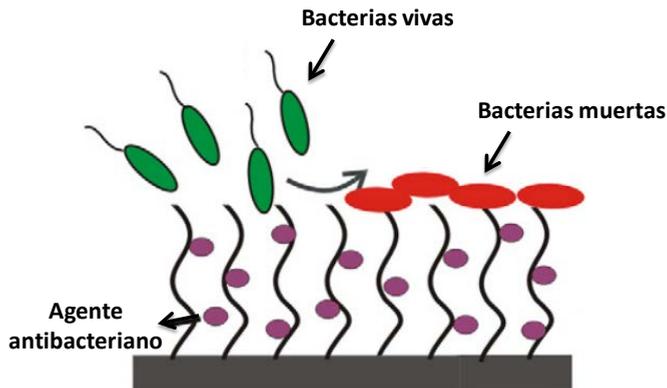


Figura 1.18: Mecanismo de actuación de los recubrimientos antibacterianos con encapsulación y liberación del agente biocida.

El método de síntesis sol-gel es una de las técnicas más prometedoras para su utilización en la deposición de agentes biocidas sobre implantes dentales. Esto se debe a la posibilidad que ofrece esta técnica de incorporación en la red sol-gel de componentes orgánicos o inorgánicos gracias a la baja T de síntesis requerida. Mediante esta técnica de deposición, se pueden encapsular, por ejemplo, iones metálicos (de plata cobre), que pueden ser liberados en el tiempo en función del medio líquido con efectiva acción bactericida, y sin comprometer la biocompatibilidad y bioactividad del sistema¹⁴⁵.

Así, en este trabajo, se han seleccionado una serie de agentes bactericidas y se han incorporado en formulaciones sol-gel con el objetivo principal de obtener diferentes tipos de recubrimientos antibacterianos.

3. PROCESO SOL-GEL

3.1 Introducción

Al pensar en la síntesis de un recubrimiento con capacidad antibacteriana mediante la incorporación del agente activo, hay que tener en cuenta que la capacidad antibacteriana de este recubrimiento no debe comprometer su biocompatibilidad en el medio receptor, ni su capacidad de osteointegración.

En el presente trabajo, la técnica elegida para el desarrollo de este tipo de recubrimientos es la técnica sol-gel, debido a la posibilidad de obtener

recubrimientos y materiales híbridos orgánico-inorgánicos¹⁴⁶, a la facilidad de síntesis y a las ventajas que presenta sobre otras técnicas, las cuales se enumeran a continuación^{147, 148}.

- La temperatura a la que se lleva a cabo el proceso sol-gel es generalmente baja, con frecuencia, cercana a T ambiente. Por lo tanto la volatilización térmica y la degradación de las especies ocluidas, se reduce al mínimo.

- La posibilidad de incorporación en la red sol-gel inorgánica de componentes orgánicos debido a esta baja T de síntesis. Esta operación se realiza mediante la adición de estas partículas orgánicas al sol antes de su gelificación.

- La obtención de recubrimientos con formas complejas (por el uso de precursores líquidos) y producción películas delgadas sin necesidad de mecanizado o de fusión.

- La alta pureza de los recubrimientos obtenidos, debido a la pureza de los precursores utilizados, así como una gran homogeneidad. Además, es posible la obtención de materiales altamente porosos con control del tamaño del poro.

La técnica sol-gel se desarrolló hace más de 150 años. La primera publicación sobre la síntesis sol-gel fue en 1846 por parte del científico francés J.J Ebelmen, que fue quien sintetizó el primer alcóxido de silicio a partir de tetracloruro de silicio (SiCl_4) y alcohol, pudiendo llegar a gelificar a temperatura ambiente¹⁴⁹. Posteriormente, esta técnica se utilizó fundamentalmente en la preparación de materiales inorgánicos de alta pureza y homogeneidad tales como vidrios y cerámicas¹⁵⁰ y aún hoy en día, sigue recibiendo una gran atención como uno de los métodos más sencillos en la modificación de materiales¹⁵¹.

El proceso *sol-gel*, en términos generales, se puede describir como la creación de una red inorgánica en disolución a través de reacciones químicas a baja temperatura que son, básicamente, reacciones de condensación de los precursores moleculares en un medio líquido y formación de un *sol*, la gelificación del mismo y el secado mediante evaporación de este gel para formar un recubrimiento sólido, también llamado *xerogel*^{150, 152}.

3.2. Recubrimientos sol-gel híbridos orgánico-inorgánicos

Como se ha comentado con anterioridad, las capas de óxido inorgánicas que se forman en la superficie de los metales ofrecen a este tipo de sustratos una buena protección frente a la corrosión¹⁵⁵. Sin embargo, en muchos casos, estas capas de óxido presentan varios inconvenientes como su falta de continuidad a lo largo del implante y su posible desaparición, lo que dificulta el proceso de osteointegración^{14, 15}.

En función de la estructura química de los precursores, se pueden obtener materiales inorgánicos puros o híbridos, y éstos se clasifican en dos tipos:

a) *Recubrimientos inorgánicos o recubrimientos de óxido de silicio*: Se obtienen a partir de alcóxidos de silicio tipo $\text{Si}(\text{OR})_4$.

b) *Recubrimientos híbridos orgánico-inorgánicos*¹⁵⁵: Se obtienen por la incorporación de grupos orgánicos a la red inorgánica. Los más comunes son los obtenidos a partir de organoalcóxidos, $[\text{R}'_n \text{Si}(\text{OR})_{4-n}]$ ¹⁵⁵. El grupo R de estos alcóxidos es una molécula orgánica, que está unida al silicio mediante un enlace tipo Silicio-Carbono (-Si-C-). De este modo, variando este sustituyente orgánico, se varían también las propiedades del material final. Estos materiales híbridos combinan propiedades de los materiales inorgánicos puros y de los materiales orgánicos, y es posible obtener fácilmente una capa más gruesa que protegerá en mayor medida al metal de la corrosión, y que será una capa más flexible y menos frágil (sin grietas).

3.3. Alcóxidos de silicio

Los alcóxidos de silicio, $\text{Si}(\text{OR})_4$, reaccionan con agua a través de las reacciones de hidrólisis y condensación hasta formar una red de sílice (Si-O-Si). A este tipo de materiales se les denomina silicatos sol-gel o materiales sol-gel de base sílice¹⁵⁰. Al ser los alcóxidos que más se diferencian del resto, su química ha sido extensamente estudiada durante los últimos 30 años¹⁵⁶ debido a su importante papel en la formación de films para evitar la corrosión de sustratos metálicos. La red polisiloxánica formada protege al metal de la corrosión gracias a sus propiedades de alta resistencia térmica y química) y no implican ningún tipo de riesgo para la salud ni el medio ambiente.

Además, los materiales basados en alcóxidos de silicio son totalmente biocompatibles, y empleados en la síntesis de recubrimientos mediante la técnica sol-gel, producen la liberación por hidrólisis de ácido ortosilícico, Si(OH)_4 , que estimula la formación de colágeno tipo I y la posterior diferenciación osteoblástica en osteoblastos humanos confirmado en estudios *in vitro*¹⁵⁷ (ec. 1).

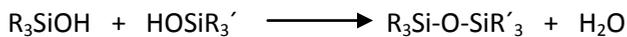
El ácido silícico se libera de la reacción de hidrólisis de los grupos siloxano en medio acuoso mediante la reacción que se observa en la ecuación 1.



Estas moléculas, en bajas concentraciones no solo no son tóxicas sino que además son osteoinductoras¹⁵⁸. Por un lado, los iones de silicio aumentan la bioactividad del material, favoreciendo la formación de la capa de hidroxiapatita biomimética en contacto con los fluidos corporales^{49, 158, 159} y por otro lado, el ácido ortosilícico, activa la producción de colágeno tipo I.

3.4. Etapas del proceso sol-gel

La síntesis sol-gel consta generalmente de varias etapas¹⁴⁹, siendo las principales la hidrólisis y la condensación de los precursores moleculares tal y como se puede observar en el siguiente mecanismo de reacción.



El proceso sol-gel es un proceso complejo con distintas etapas basadas en las reacciones básicas de hidrólisis y condensación; en la mayoría de los casos las reacciones de condensación comienzan a desarrollarse antes de la finalización de la hidrólisis, de modo que ambas reacciones se producen de modo simultáneo y además, en cada etapa influye lo ocurrido en la anterior.

A continuación se explicarán las características principales de cada etapa:

- **HIDRÓLISIS:** Se produce la hidrólisis de los grupos alcóxido (-OR) para dar lugar a los grupos hidroxilo (-OH) al entrar en contacto con el medio acuoso.

- **CONDENSACIÓN:** Se da la policondensación de los grupos hidroxilo bien reaccionando entre ellos, o con los grupos alcoxi residuales, para formar los grupos siloxano (-Si-O-Si-). Ambas etapas ocurren simultáneamente (la condensación tiene lugar antes de completarse la hidrólisis), y ambas etapas producen subproductos de reacción de bajo peso molecular (alcohol y agua), que son posteriormente eliminadas haciendo posible la formación del gel.

- **GELIFICACIÓN:** Esta etapa pasa por la formación de la red tridimensional polisiloxánica. Se produce un aumento de la viscosidad, aunque dentro de la red siguen quedando atrapadas partículas de sol, y líquidos como subproductos de la reacción.

- **ENVEJECIMIENTO:** En este proceso continúa la polimerización de los grupos hidroxilo que no habían reaccionado, aumentando la conectividad de la red. Este proceso sucede a la vez que un cierto encogimiento irreversible de la red gelificada y puede ser un proceso lento si se realiza a temperatura ambiente, aunque puede acelerarse jugando con las condiciones de síntesis del material, tales como temperatura y pH.

- **SECADO:** Se trata de la pérdida de agua, alcohol y otros componentes volátiles observándose una contracción y un endurecimiento (o densificación) del gel. La velocidad a la que se evapora el disolvente está determinada por la porosidad del gel obtenido y la capacidad para estos componentes volátiles de difundir a través de los poros.

- **DENSIFICACIÓN:** Es la etapa en la que se somete al material a un tratamiento térmico para favorecer aún más la policondensación o el entrecruzamiento y mejorar las propiedades mecánicas y estabilidad estructural del material obtenido. Esta densificación puede tener diferentes grados en función de la temperatura a la que se lleve a cabo el secado del material. El proceso sol-gel global se puede observar en la figura 1.19:

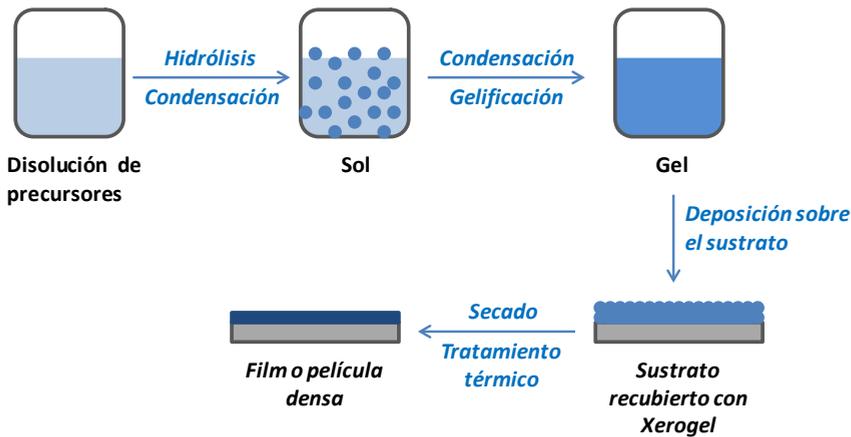


Figura 1.19: Etapas y reacción global del proceso sol-gel.

El proceso de gelificación, y por lo tanto las propiedades finales del material obtenido, están influenciadas por varios parámetros iniciales de reacción como son, la temperatura, el pH, la relación molar de los precursores o la composición del disolvente, entre otros. A continuación se detallan algunos de esos factores.

3.5. Factores que influyen en el proceso sol-gel

a) Naturaleza del disolvente

En la síntesis sol-gel, el disolvente juega un papel muy importante para evitar la separación de fases durante las primeras etapas de hidrólisis¹⁵³. Debido a que los precursores no son miscibles con agua, se utilizan otros disolventes, como alcoholes, para homogeneizar el sistema^{159, 160}. En algunos casos, también es posible llevar a cabo la síntesis sin utilizar alcohol como medio, ya que el alcohol creado durante la síntesis puede llegar a homogeneizar el sistema¹⁶¹.

En todos los casos, el disolvente determina las reacciones de gelificación modulando su velocidad¹⁵⁶. A su vez, esto va a influir en la etapa de secado del material y por lo tanto en su microestructura final. Al utilizar disolventes tipo alcohol, no sólo es más fácil la homogeneización del sistema, sino que además se acelera la etapa de secado (debido a la baja temperatura de evaporación de los mismos en comparación con el agua) y se puede llegar a evitar la degradación térmica del material.

b) Relación molar de los precursores ($r= \text{H}_2\text{O}:\text{Si}$)

El agua desempeña un papel importante en la velocidad de la reacción sol-gel debido a que las variaciones en la relación molar agua: precursores hacen variar las reacciones de hidrólisis del sistema¹⁵³ y consecuentemente, el tiempo necesario para su gelificación. Estas variaciones, influirán en la morfología final del material. Del mismo modo, esta relación molar y su efecto en la hidrólisis del sistema, determinarán también la cantidad de enlaces siloxano formados, ya que una mayor velocidad de hidrólisis aumenta la concentración de moléculas de alcoxisilanos conteniendo grupos silanol. Esto aumenta también la posibilidad de que tengan lugar reacciones de condensación silanol-silanol, dando lugar a estos grupos siloxano¹⁵¹.

c) Influencia del pH (Catálisis ácida/básica)

El proceso sol-gel puede tener lugar mediante catálisis ácida o básica y el tipo de material final (tipo de red formada), dependerá en gran medida del pH al que se realiza la síntesis¹⁶².

La catálisis ácida tiene lugar a pHs ácidos (valores entre 1 y 2). En este caso, la velocidad de las reacciones de hidrólisis es baja, estando las reacciones de condensación favorecidas. Además, se forman moléculas lineales en el sol, que se entrecruzan como se observa en la figura 1.20. Estas cadenas moleculares se enmarañan y forman ramificaciones adicionales que dan lugar al gel¹⁶².

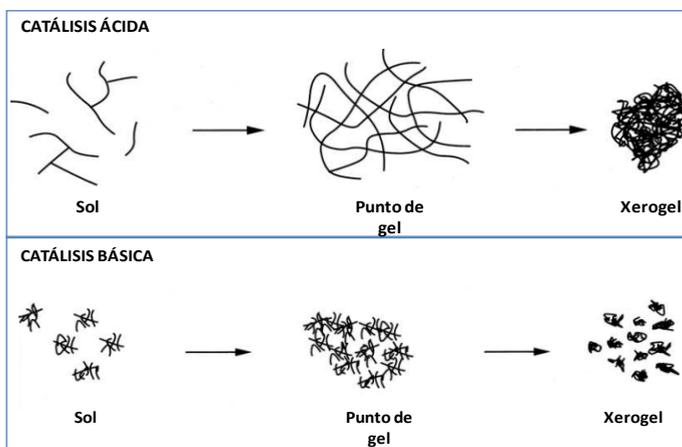


Figura 1.20: Estructura del gel formado en el caso de catálisis ácida y básica.

Mediante la catálisis básica, las reacciones de hidrólisis están favorecidas (los precursores se hidrolizan rápidamente). Esta rápida hidrólisis hace que las especies formadas condensan en agregados muy ramificados que no se enredan entre sí, obteniéndose un gel más reticulado, ya que en la policondensación se producen partículas coloidales que se enlazan unas con otras para formar una estructura tridimensional (figura 1.20) y más porosa.

d) Influencia del tipo de precursor utilizado y de su efecto estérico

Los precursores utilizados para la síntesis sol-gel tienen que cumplir dos requisitos básicos. El primero de ellos es ser soluble en el medio de reacción, y el segundo es que tienen que ser lo suficientemente reactivos para dar lugar a la formación del gel¹⁶³.

El efecto estérico de los sustituyentes del precursor tiene gran influencia en la velocidad de reacción de hidrólisis. Los grupos alcoxi voluminosos presentan un mayor obstáculo para las moléculas de agua, ralentizando la reacción de hidrólisis²⁰.

La reactividad de los precursores de silicio teniendo en cuenta el grupo alcoxi que tienen como sustituyente es la siguiente: $\text{Si}(\text{OCH}_3)_4 > \text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4 > \text{Si}(\text{O}^n\text{C}_3\text{H}_7)_4 > \text{Si}(\text{O}^n\text{C}_3\text{H}_7)_4 > \text{Si}(\text{O}^n\text{C}_4\text{H}_9)_4 > \text{Si}(\text{OC}_6\text{H}_{13})_4$ ¹⁶⁴.

Además del tamaño del sustituyente, otro de los factores importantes a la hora de elegir el precursor adecuado es la introducción de cadenas o sustituyentes orgánicos. A este tipo de silicatos orgánicamente modificados, se les conoce como ORMOSILS y son precursores que tienen uno o más sustituyentes orgánicos no hidrolizables^{155, 165, 166}. El tipo de grupo orgánico también influirá en el proceso sol-gel y en las propiedades del material final obtenido, debido a que el hecho de que no sea hidrolizable hace que la conectividad de la red formada sea menor. Además, propiedades químicas importantes como la hidrofilia del material, la reactividad y la flexibilidad se verán afectadas en función de este grupo orgánico^{165, 166}.

3.6. Recubrimientos sol-gel sobre sustratos metálicos

Una de las ventajas fundamentales de esta técnica, es la capacidad de deposición de sol formado sobre sustratos con diferentes morfologías. En este trabajo, se van a desarrollar recubrimientos para su deposición sobre implantes

dentales, por lo que la capacidad de adhesión de éstos sobre este tipo de sustrato metálico tiene que ser óptima.

Un factor relevante a la hora de usar la reacción sol-gel, es la buena adhesión de los recubrimientos obtenidos al sustrato metálico que compone el implante dental. Esto se debe a que, al recubrir el tornillo con la disolución sol-gel, se produce una interacción mediante puentes de hidrógeno entre los grupos silanol y el metal (los grupos hidroxilo MeOH de sus superficie), que pasan a enlaces covalentes tras someter al material al tratamiento térmico de curado¹⁵⁵ (figura 1.21).

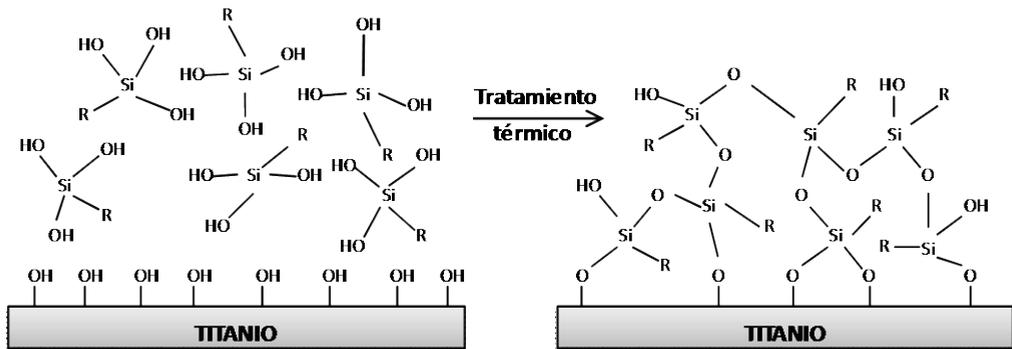


Figura 1.21: Formación de enlace covalente entre el sustrato metálico y el film sol-gel antes y después de la densificación producida durante el curado.

4. OBJETIVOS

A la vista de la revisión anterior, queda clara la necesidad de encontrar nuevos sistemas que impidan la proliferación bacteriana y consecuentemente, la periimplantitis, y que a la vez, promuevan el proceso de osteointegración del implante en el hueso mandibular, o que al menos no lo perjudiquen.

Como se ha expuesto anteriormente, el mercado de la implantología dental es muy amplio y a la vez, los casos de periimplantitis van aumentando de forma exponencial, poniendo en peligro el porcentaje de éxito de esta tecnología. Esto hace que haya una gran cantidad de grupos de investigación buscando una solución a este problema. Sin embargo, a pesar de las diferentes técnicas propuestas, todavía hay una necesidad real de encontrar una técnica simple y resolutive tanto para evitar el desarrollo de la infección bacteriana, como para eliminarla totalmente una vez producida.

En este contexto, el principal objetivo de esta tesis es el desarrollo de recubrimientos osteoinductores, obtenidos vía sol-gel para la elaboración de implantes dentales que no permitan la colonización bacteriana o que sean capaces de erradicarla mediante la liberación del agente antibacteriano.

La consecución de este objetivo general se desglosa en la consecución de los siguientes objetivos específicos:

1. *Obtener un recubrimiento antibacteriano de larga permanencia.*

Se desarrollará una primera familia de recubrimientos antibacterianos que puedan permanecer adheridos al implante durante largo tiempo. Asimismo, el recubrimiento deberá impedir la adherencia de proteínas inductoras de la proliferación bacteriana.

2. *Obtener un recubrimientos antibacteriano biodegradable capaz de liberar de forma controlada diferentes agentes biocidas.*

Se desarrollará otra familia de recubrimientos que sirvan como vehículo de liberación de los agentes biocidas elegidos. Los parámetros para conseguir el control de la liberación serán fundamentalmente la elección de la composición de los precursores que determinarán el tipo de red formada, y, la hidrofilia del recubrimiento que determinará a su vez, no sólo la liberación, sino también, la cinética de degradación.

3. *Obtener un recubrimiento antibacteriano para su aplicación in situ.*

Se desarrollará un último tipo de recubrimientos con incorporación de agentes antibacterianos cuyo principal objetivo sea su uso *in situ*, es decir, aplicándose directamente sobre el lugar en el que se ha producido la infección con anterioridad, eliminándola y evitando su reaparición, sin necesidad de cirugía para retirar el implante infectado.

La metodología seguida para la realización de este trabajo se muestra a continuación en la figura 1.22.

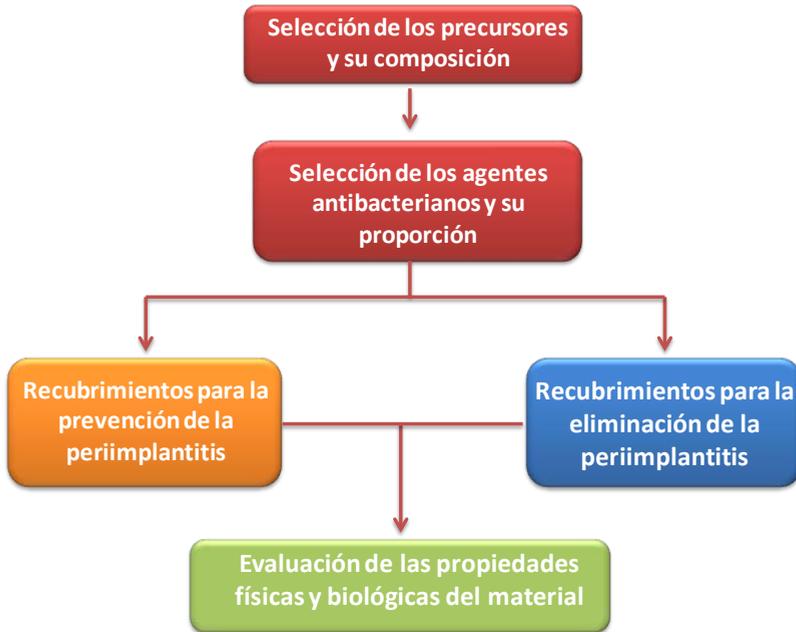


Figura 1.22: Representación esquemática de la metodología seguida para la obtención de los recubrimientos.

Esta tesis se ha realizado en el marco de un proyecto del Ministerio de Economía y Competitividad dentro del Programa INNPACTO de colaboración Universidad-Empresa.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., & Lemons, J. E. (2004). Biomaterials science: a multidisciplinary endeavor. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*, 1-9.
2. Gaviria, L., Salcido, J. P., Guda, T., & Ong, J. L. (2014). Current trends in dental implants. *Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 40(2), 50-60.
3. Setzer, F. C., & Kim, S. (2014). Comparison of long-term survival of implants and endodontically treated teeth. *Journal of dental research*, 93(1), 19-26.
4. R. Sastre, S. Aza, J.San Roman. *Biomateriales*. Faenza Editrice ibérica, 2004
5. Subramani, K., & Mathew, R. T. (2011). Titanium Surface Modification Techniques for Dental Implants—. *Emerging Nanotechnologies in Dentistry: Processes, Materials and Applications*, 85.
6. Massaro, C., Rotolo, P., De Riccardis, F., Milella, E., Napoli, A., Wieland, M., & Brunette, D. M. (2002). Comparative investigation of the surface properties of commercial titanium dental implants. Part I: chemical composition. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 13(6), 535-548.
7. Pye, A. D., Lockhart, D. E. A., Dawson, M. P., Murray, C. A., & Smith, A. J. (2009). A review of dental implants and infection. *Journal of Hospital Infection*, 72(2), 104-110.
8. Le Guéhennec, L., Soueidan, A., Layrolle, P., & Amouriq, Y. (2007). Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dental materials*, 23(7), 844-854.
9. Satomi, K., Akagawa, Y., Nikai, H., & Tsuru, H. (1988). Bone-implant interface structures after nontapping and tapping insertion of screw-type titanium alloy endosseous implants. *The Journal of prosthetic dentistry*, 59(3), 339-342.
10. Branemark, P. I. (1983). Osseointegration and its experimental background. *The Journal of prosthetic dentistry*, 50(3), 399-410.

11. Dimitriou, R., & Babis, G. C. (2007). Biomaterial osseointegration enhancement with biophysical stimulation. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 7(3), 253-265.
12. Hansson, H. A., Albrektsson, T., & Brånemark, P. I. (1983). Structural aspects of the interface between tissue and titanium implants. *The Journal of prosthetic dentistry*, 50(1), 108-113.
13. Albrektsson, T., Brånemark, P. I., Hansson, H. A., & Lindström, J. (1981). Osseointegrated titanium implants: requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthopaedica*, 52(2), 155-170.
14. Brånemark, P. I. (1983). Osseointegration and its experimental background. *The Journal of prosthetic dentistry*, 50(3), 399-410
15. Stevens, M. M. (2008). Biomaterials for bone tissue engineering. *Materials today*, 11(5), 18-25.
16. Harada, S. I., & Rodan, G. A. (2003). Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature*, 423(6937), 349-355.
17. Yaszemski, M. J., Payne, R. G., Hayes, W. C., Langer, R., & Mikos, A. G. (1996). Evolution of bone transplantation: molecular, cellular and tissue strategies to engineer human bone. *Biomaterials*, 17(2), 175-185.
18. Peñarrocha, M., Oltra, M. J., & Sanchís, J. M. (2006). Conceptos generales de implantología. *Peñarrocha Diago M, ed. Implantología Oral. Barcelona: Medicina stl Editores*, 3-7.
19. Histología, E. Ingeniería tisular bucodental. *ME. Ferraris, A. Campos (Eds)*.
20. Linder, L., Obrant, K., & Boivin, G. (1989). Osseointegration of metallic implants: II. Transmission electron microscopy in the rabbit. *Acta Orthopaedica*, 60(2), 135-139
21. Albrektsson, T., & Johansson, C. (2001). Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *European Spine Journal*, 10(2), S96-S101.
22. Medina Macías, S., Morales Doreste, M., Navarro García, R., Pérez García, E., Erdocia Eguía, P., & Hernández Lecuona, A. (2000). Osteoconducción en implantes.

23. Meyer, U., Joos, U., Mythili, J., Stamm, T., Hohoff, A., Fillies, T., ... & Wiesmann, H. P. (2004). Ultrastructural characterization of the implant/bone interface of immediately loaded dental implants. *Biomaterials*, 25(10), 1959-1967.
24. Simon, Z., & Watson, P. A. (2002). Biomimetic dental implants-new ways to enhance osseointegration. *Journal-Canadian Dental Association*, 68(5), 286-289.
25. Kasemo, B., & Lausmaa, J. (1988). Biomaterial and implant surfaces: a surface science approach. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 3(4).
26. Steinemann, S. G. (1998). Titanium—the material of choice?. *Periodontology 2000*, 17(1), 7-21.
27. Choi, J., Wehrspohn, R. B., Lee, J., & Gösele, U. (2004). Anodization of nanoimprinted titanium: a comparison with formation of porous alumina. *Electrochimica Acta*, 49(16), 2645-2652.
28. Gaintantzopoulou, M., Zinelis, S., Silikas, N., & Eliades, G. (2014). Micro-Raman spectroscopic analysis of TiO₂ phases on the root surfaces of commercial dental implants. *Dental Materials*, 30(8), 861-867.
29. Arys, A., Philippart, C., Dourov, N., He, Y., Le, Q. T., & Pireaux, J. J. (1998). Analysis of titanium dental implants after failure of osseointegration: Combined histological, electron microscopy, and X-ray photoelectron spectroscopy approach. *Journal of biomedical materials research*, 43(3), 300-312.
30. Ahmed, F., BDS, M., Rashid, H., BDS, M., Farookhi, S., Verma, V., & Sheikh, Z. (2015). Surface modifications of endosseous dental implants by incorporation of roughness and hydroxyapatite coatings. *JPDA*, 24(04), 162.
31. Steigenga, J. T., Al-Shammari, K. F., Nociti, F. H., Misch, C. E., & Wang, H. L. (2003). Dental implant design and its relationship to long-term implant success. *Implant dentistry*, 12(4), 306-317.
32. Wilkinson, A., Hewitt, R. N., McNamara, L. E., McCloy, D., Meek, R. D., & Dalby, M. J. (2011). Biomimetic microtopography to enhance osteogenesis in vitro. *Acta biomaterialia*, 7(7), 2919-2925.

33. Bruschi, M., Steinmüller-Nethl, D., Goriwoda, W., & Rasse, M. (2015). Composition and Modifications of Dental Implant Surfaces. *Journal of Oral Implants*, 2015.
34. Rasmusson, L., Roos, J., & Bystedt, H. (2005). A 10-Year Follow-Up Study of Titanium Dioxide–Blasted Implants. *Clinical implant dentistry and related research*, 7(1), 36-42.
35. Cooper, L. F., Masuda, T., Whitson, S. W., Yliheikkila, P., & Felton, D. A. (1999). Formation of mineralizing osteoblast cultures on machined, titanium oxide grit-blasted, and plasma-sprayed titanium surfaces. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, 14(1), 37-47.
36. Park, J. Y., & Davies, J. E. (2000). Red blood cell and platelet interactions with titanium implant surfaces. *Clinical oral implants research*, 11(6), 530-539.
37. Cho, S. A., & Park, K. T. (2003). The removal torque of titanium screw inserted in rabbit tibia treated by dual acid etching. *Biomaterials*, 24(20), 3611-3617.
38. Szmukler-Moncler, S., Perrin, D., Ahossi, V., Magnin, G., & Bernard, J. P. (2004). Biological properties of acid etched titanium implants: effect of sandblasting on bone anchorage. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 68(2), 149-159.
39. Anil, S., Alghamdi, H., Jansen, J. A., & Anand, P. S. (2011). *Dental implant surface enhancement and osseointegration*. InTech Open Access Publisher.
40. Hallab, N. J., Bundy, K. J., O'Connor, K., Moses, R. L., & Jacobs, J. J. (2001). Evaluation of metallic and polymeric biomaterial surface energy and surface roughness characteristics for directed cell adhesion. *Tissue engineering*, 7(1), 55-71.
41. Zhao, G., Schwartz, Z., Wieland, M., Rupp, F., Geis-Gerstorfer, J., Cochran, D. L., & Boyan, B. D. (2005). High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 74(1), 49-58.
42. Vlacic-Zischke, J., Hamlet, S. M., Friis, T., Tonetti, M. S., & Ivanovski, S. (2011). The influence of surface microroughness and hydrophilicity of titanium on the up-regulation of TGFβ/BMP signalling in osteoblasts. *Biomaterials*, 32(3), 665-671.

43. Sullivan, D. Y., Sherwood, R. L., & Mai, T. N. (1997). Preliminary results of a multicenter study evaluating a chemically enhanced surface for machined commercially pure titanium implants. *The Journal of prosthetic dentistry*, 78(4), 379-386.
44. Schwarz, F., Herten, M., Sager, M., Wieland, M., Dard, M., & Becker, J. (2007). Histological and immunohistochemical analysis of initial and early osseous integration at chemically modified and conventional SLA® titanium implants: Preliminary results of a pilot study in dogs. *Clinical Oral Implants Research*, 18(4), 481-488.
45. Ballo, A. M., Palmquist, A., Omar, O., & Xia, W. (2011). *Dental Implant Surfaces-Physicochemical Properties, Biological Performance, and Trends*. INTECH Open Access Publisher.
46. Davies, J. E. (2003). Understanding peri-implant endosseous healing. *Journal of dental education*, 67(8), 932-949.
47. Lavenus, S., Louarn, G., & Layrolle, P. (2010). Nanotechnology and dental implants. *International journal of biomaterials*, 2010.
48. Leeuwenburgh, S., Layrolle, P., Barrere, F., De Bruijn, J., Schoonman, J., Van Blitterswijk, C. A., & De Groot, K. (2001). Osteoclastic resorption of biomimetic calcium phosphate coatings in vitro. *Journal of biomedical materials research*, 56(2), 208-215.
49. Kokubo, T., & Takadama, H. (2006). How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?. *Biomaterials*, 27(15), 2907-2915.
50. Ku, Y., Chung, C. P., & Jang, J. H. (2005). The effect of the surface modification of titanium using a recombinant fragment of fibronectin and vitronectin on cell behavior. *Biomaterials*, 26(25), 5153-5157.
51. Nanci, A., Wuest, J. D., Peru, L., Brunet, P., Sharma, V., Zalzal, S., & McKee, M. D. (1998). Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules. *Journal of biomedical materials research*, 40(2), 324-335.

52. Chen, W. C., & Ko, C. L. (2013). Roughened titanium surfaces with silane and further RGD peptide modification in vitro. *Materials Science and Engineering: C*, 33(5), 2713-2722.
53. Gristina, A. G. (1987). Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science*, 237(4822), 1588-1595.
54. Atieh, M. A., Alsabeeha, N. H., Faggion Jr, C. M., & Duncan, W. J. (2013). The frequency of peri-implant diseases: a systematic review and meta-analysis. *Journal of periodontology*, 84(11), 1586-1598.
55. Han, A., Tsoi, J. K., Rodrigues, F. P., Leprince, J. G., & Palin, W. M. (2016). Bacterial adhesion mechanisms on dental implant surfaces and the influencing factors. *International Journal of Adhesion and Adhesives*.
56. Daubert, D. M., Weinstein, B. F., Bordin, S., Leroux, B. G., & Flemmig, T. F. (2015). Prevalence and predictive factors for peri-implant disease and implant failure: a cross-sectional analysis. *Journal of periodontology*, 86(3), 337-347.
57. Duske, K., Jablonowski, L., Koban, I., Matthes, R., Holtfreter, B., Sckell, A., & Kocher, T. (2015). Cold atmospheric plasma in combination with mechanical treatment improves osteoblast growth on biofilm covered titanium discs. *Biomaterials*, 52, 327-334.
58. Aglietta, M., Siciliano, V. I., Zwahlen, M., Brägger, U., Pjetursson, B. E., Lang, N. P., & Salvi, G. E. (2009). A systematic review of the survival and complication rates of implant supported fixed dental prostheses with cantilever extensions after an observation period of at least 5 years. *Clinical oral implants research*, 20(5), 441-451.
59. Mombelli, A., & Décaillot, F. (2011). The characteristics of biofilms in peri-implant disease. *Journal of clinical periodontology*, 38(s11), 203-213.
60. Rosan, B., & Lamont, R. J. (2000). Dental plaque formation. *Microbes and infection*, 2(13), 1599-1607.
61. Ivanova, E. P., & Crawford, R. J. (2015). *Antibacterial Surfaces*. Springer.
62. Godoy-Gallardo, M., Wang, Z., Shen, Y., Manero, J. M., Gil, F. J., Rodriguez, D., & Haapasalo, M. (2015). Antibacterial Coatings on Titanium Surfaces: A Comparison

Study Between in Vitro Single-Species and Multispecies Biofilm. *ACS applied materials & interfaces*, 7(10), 5992-6001.

63. Buxadera-Palomero, J., Canal, C., Torrent-Camarero, S., Garrido, B., Gil, F. J., & Rodríguez, D. (2015). Antifouling coatings for dental implants: Polyethylene glycol-like coatings on titanium by plasma polymerization. *Biointerphases*, 10(2), 029505.

64. Katsikogianni, M., & Missirlis, Y. F. (2004). Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur Cell Mater*, 8(3).

65. Renvert, S., & Quirynen, M. (2015). Risk indicators for peri-implantitis. A narrative review. *Clinical oral implants research*, 26(S11), 15-44.

66. Sánchez Garcés, M. Á., & Gay Escoda, C. (2004). Periimplantitis. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, 2004, vol. 9, num. supl., p. 63-74.

67. Quirynen, M., De Soete, M., & Van Steenberghe, D. (2002). Infectious risks for oral implants: a review of the literature. *Clinical oral implants research*, 13(1), 1-19.

68. Norowski, P. A., & Bumgardner, J. D. (2009). Biomaterial and antibiotic strategies for peri-implantitis: A review. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 88(2), 530-543.

69. Salvi, G. E., Fürst, M. M., Lang, N. P., & Persson, G. R. (2008). One-year bacterial colonization patterns of *Staphylococcus aureus* and other bacteria at implants and adjacent teeth. *Clinical oral implants research*, 19(3), 242-248.

70. Fürst, M. M., Salvi, G. E., Lang, N. P., & Persson, G. R. (2007). Bacterial colonization immediately after installation on oral titanium implants. *Clinical oral implants research*, 18(4), 501-508.

71. Sánchez, M. C., Llama-Palacios, A., Fernández, E., Figuero, E., Marín, M. J., León, R. & Sanz, M. (2014). An in vitro biofilm model associated to dental implants: Structural and quantitative analysis of in vitro biofilm formation on different dental implant surfaces. *Dental Materials*, 30(10), 1161-1171.

72. Foster, J. S., & Kolenbrander, P. E. (2004). Development of a multispecies oral bacterial community in a saliva-conditioned flow cell. *Applied and environmental microbiology*, 70(7), 4340-4348.
73. Lang, N. P., & Berglundh, T. (2011). Periimplant diseases: where are we now?—Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *Journal of clinical periodontology*, 38(s11), 178-181.
74. Persson, G. R., & Renvert, S. (2014). Cluster of Bacteria Associated with Peri-Implantitis. *Clinical implant dentistry and related research*, 16(6), 783-793.
75. Cloutier, M., Mantovani, D., & Rosei, F. (2015). Antibacterial Coatings: Challenges, Perspectives, and Opportunities. *Trends in Biotechnology*, 33(11), 637-652.
76. Hetrick, E. M., & Schoenfisch, M. H. (2006). Reducing implant-related infections: active release strategies. *Chemical Society Reviews*, 35(9), 780-789.
77. Ferraris, S., & Spriano, S. (2015). Antibacterial titanium surfaces for medical implants. *Materials Science and Engineering: C*.
78. Lemire, J. A., Harrison, J. J., & Turner, R. J. (2013). Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nature Reviews Microbiology*, 11(6), 371-384.
79. Palza, H. (2015). Antimicrobial polymers with metal nanoparticles. *International journal of molecular sciences*, 16(1), 2099-2116.
80. Dizaj, S. M., Lotfipour, F., Barzegar-Jalali, M., Zarrintan, M. H., & Adibkia, K. (2014). Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C*, 44, 278-284.
81. Sotiriou, G. A., & Pratsinis, S. E. (2011). Engineering nanosilver as an antibacterial, biosensor and bioimaging material. *Current opinion in chemical engineering*, 1(1), 3-10.
82. Knetsch, M. L., & Koole, L. H. (2011). New strategies in the development of antimicrobial coatings: the example of increasing usage of silver and silver nanoparticles. *Polymers*, 3(1), 340-366.

83. Rai, M., Yadav, A., & Gade, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology advances*, 27(1), 76-83.
84. Sondi, I., & Salopek-Sondi, B. (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*, 275(1), 177-182.
85. Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramírez, J. T., & Yacaman, M. J. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16(10), 2346.
86. Johnston, H. J., Hutchison, G., Christensen, F. M., Peters, S., Hankin, S., & Stone, V. (2010). A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. *Critical reviews in toxicology*, 40(4), 328-346.
87. Green, J. B. D., Fulghum, T., & Nordhaus, M. A. (2011). A review of immobilized antimicrobial agents and methods for testing. *Biointerphases*, 6(4), MR13-MR28.
88. Swartjes, J. J. T. M., Sharma, P. K., Kooten, T. G., van der Mei, H. C., Mahmoudi, M., Busscher, H. J., & Rochford, E. T. J. (2015). Current Developments in Antimicrobial Surface Coatings for Biomedical Applications. *Current medicinal chemistry*, 22(18), 2116-2129.
89. Fernández, L., Breidenstein, E. B., & Hancock, R. E. (2011). Creeping baselines and adaptive resistance to antibiotics. *Drug Resistance Updates*, 14(1), 1-21.
90. Vasilev, K., Michelmore, A., Griesser, H. J., & Short, R. D. (2009). Substrate influence on the initial growth phase of plasma-deposited polymer films. *Chem. Commun.*, (24), 3600-3602.
91. Darouiche, R. O. (2003). Antimicrobial approaches for preventing infections associated with surgical implants. *Clinical infectious diseases*, 36(10), 1284-1289.
92. Kirmanidou, Y., Sidira, M., Drosou, M. E., Bennani, V., Bakopoulou, A., Tsouknidas, A., & Michalakis, K. (2016). New Ti-Alloys and Surface Modifications to Improve the Mechanical Properties and the Biological Response to Orthopedic and Dental Implants: A Review. *BioMed Research International*, 2016.

93. Stigter, M., Bezemer, J., De Groot, K., & Layrolle, P. (2004). Incorporation of different antibiotics into carbonated hydroxyapatite coatings on titanium implants, release and antibiotic efficacy. *Journal of controlled release*, *99*(1), 127-137.
94. Forsgren, J., Brohede, U., Strømme, M., & Engqvist, H. (2011). Co-loading of bisphosphonates and antibiotics to a biomimetic hydroxyapatite coating. *Biotechnology letters*, *33*(6), 1265-1268.
95. Radin, S., Campbell, J. T., Ducheyne, P., & Cuckler, J. M. (1997). Calcium phosphate ceramic coatings as carriers of vancomycin. *Biomaterials*, *18*(11), 777-782.
96. Takigami, I., Ito, Y., Ishimaru, D., Ogawa, H., Mori, N., Shimizu, T., & Shimizu, K. (2010). Two-stage revision surgery for hip prosthesis infection using antibiotic-loaded porous hydroxyapatite blocks. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*, *130*(10), 1221-1226.
97. Minelli, E. B., Caveiari, C., & Benini, A. (2002). Release of antibiotics from polymethylmethacrylate cement. *Journal of chemotherapy*, *14*(5), 492-500.
98. Wang, X., Ben Ahmed, N., S Alvarez, G., V Tuttolomondo, M., Héлары, C., F Desimone, M., & Coradin, T. (2015). Sol-gel encapsulation of biomolecules and cells for medicinal applications. *Current topics in medicinal chemistry*, *15*(3), 223-244.
99. Meseguer-Olmo, L., Ros-Nicolás, M. J., Vicente-Ortega, V., Alcaraz-Baños, M., Clavel-Sainz, M., Arcos, D., & Meseguer-Ortiz, C. (2006). A bioactive sol-gel glass implant for in vivo gentamicin release. Experimental model in Rabbit. *Journal of orthopaedic research*, *24*(3), 454-460.
100. Vester, H., Wildemann, B., Schmidmaier, G., Stöckle, U., & Lucke, M. (2010). Gentamycin delivered from a PDLLA coating of metallic implants: in vivo and in vitro characterization for local prophylaxis of implant-related osteomyelitis. *Injury*, *41*(10), 1053-1059.
101. Radin, S., Ducheyne, P., Kamplain, T., & Tan, B. H. (2001). Silica sol-gel for the controlled release of antibiotics. I. Synthesis, characterization, and in vitro release. *Journal of biomedical materials research*, *57*(2), 313-320.

102. Radin, S., & Ducheyne, P. (2007). Controlled release of vancomycin from thin sol-gel films on titanium alloy fracture plate material. *Biomaterials*, 28(9), 1721-1729.
103. Adams, C. S., Antoci, V., Harrison, G., Patal, P., Freeman, T. A., Shapiro, I. M., & Ducheyne, P. (2009). Controlled release of vancomycin from thin sol-gel films on implant surfaces successfully controls osteomyelitis. *Journal of Orthopaedic Research*, 27(6), 701-709.
104. Carmona-Ribeiro, A. M., & de Melo Carrasco, L. D. (2013). Cationic antimicrobial polymers and their assemblies. *International journal of molecular sciences*, 14(5), 9906-9946.
105. Stratton, T. R., Rickus, J. L., & Youngblood, J. P. (2009). In vitro biocompatibility studies of antibacterial quaternary polymers. *Biomacromolecules*, 10(9), 2550-2555.
106. Li, Z., Lee, D., Sheng, X., Cohen, R. E., & Rubner, M. F. (2006). Two-level antibacterial coating with both release-killing and contact-killing capabilities. *Langmuir*, 22(24), 9820-9823.
107. Gao, B., Zhang, X., & Zhu, Y. (2007). Studies on the preparation and antibacterial properties of quaternized polyethyleneimine. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 18(5), 531-544.
108. Tiller, J. C., Liao, C. J., Lewis, K., & Klibanov, A. M. (2001). Designing surfaces that kill bacteria on contact. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(11), 5981-5985.
109. Li, G., Shen, J., & Zhu, Y. (1998). Study of pyridinium-type functional polymers. II. Antibacterial activity of soluble pyridinium-type polymers. *Journal of applied polymer science*, 67(10), 1761-1768.
110. Stratton, T. R., Howarter, J. A., Allison, B. C., Applegate, B. M., & Youngblood, J. P. (2010). Structure- Activity Relationships of Antibacterial and Biocompatible Copolymers. *Biomacromolecules*, 11(5), 1286-1290.
111. Glinel, K., Thebault, P., Humblot, V., Pradier, C. M., & Jouenne, T. (2012). Antibacterial surfaces developed from bio-inspired approaches. *Acta biomaterialia*, 8(5), 1670-1684.

112. Raphel, J., Holodniy, M., Goodman, S. B., & Heilshorn, S. C. (2016). Multifunctional Coatings to Simultaneously Promote Osseointegration and Prevent Infection of Orthopaedic Implants. *Biomaterials*.
113. Costa, F., Carvalho, I. F., Montelaro, R. C., Gomes, P., & Martins, M. C. L. (2011). Covalent immobilization of antimicrobial peptides (AMPs) onto biomaterial surfaces. *Acta Biomaterialia*, 7(4), 1431-1440.
114. Chan, D. I., Prenner, E. J., & Vogel, H. J. (2006). Tryptophan-and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1758(9), 1184-1202.
115. Hancock, R. E., & Sahl, H. G. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature biotechnology*, 24(12), 1551-1557.
116. Connell, L. S., Romer, F., Suárez, M., Valliant, E. M., Zhang, Z., Lee, P. D., & Jones, J. R. (2014). Chemical characterisation and fabrication of chitosan–silica hybrid scaffolds with 3-glycidoxypropyl trimethoxysilane. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(6), 668-680.
117. Raphel, J., Holodniy, M., Goodman, S. B., & Heilshorn, S. C. (2016). Multifunctional Coatings to Simultaneously Promote Osseointegration and Prevent Infection of Orthopaedic Implants. *Biomaterials*.
118. Paladini, F., Pollini, M., Sannino, A., & Ambrosio, L. (2015). Metal-based antibacterial substrates for biomedical applications. *Biomacromolecules*, 16(7), 1873-1885.
119. Swartjes, J. J. T. M., Sharma, P. K., Kooten, T. G., van der Mei, H. C., Mahmoudi, M., Busscher, H. J., & Rochford, E. T. J. (2015). Current Developments in Antimicrobial Surface Coatings for Biomedical Applications. *Current medicinal chemistry*, 22(18), 2116-2129.
120. Tay, F. R., Durán, G., Paula, A. J., & Durán, N. (2015). Advances in Dental Materials through Nanotechnology: Facts, Perspectives and Toxicological Aspects.
121. Ordikhani, F., Tamjid, E., & Simchi, A. (2014). Characterization and antibacterial performance of electrodeposited chitosan–vancomycin composite coatings for

prevention of implant-associated infections. *Materials Science and Engineering: C*, 41, 240-248.

122. Swanson, T. E., Cheng, X., & Friedrich, C. (2011). Development of chitosan–vancomycin antimicrobial coatings on titanium implants. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 97(2), 167-176.

123. Puig, S. M., & Almerich, S. J. (2008). Use of chlorhexidine varnishes in preventing and treating periodontal disease. A review of the literature. *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal*, 13(4), E257-60.

124. Carrilho, M. R., Carvalho, R. M., Sousa, E. N., Nicolau, J., Breschi, L., Mazzone, A., & Pashley, D. H. (2010). Substantivity of chlorhexidine to human dentin. *Dental Materials*, 26(8), 779-785.

125. Mohammadi, Z., & Abbott, P. V. (2009). The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *International endodontic journal*, 42(4), 288-302.

126. Tiller, J. C. (2010). Antimicrobial surfaces. In *Bioactive surfaces* (pp. 193-217). Springer Berlin Heidelberg.

127. Bazaka, K., Jacob, M. V., Chrzanowski, W., & Ostrikov, K. (2015). Anti-bacterial surfaces: natural agents, mechanisms of action, and plasma surface modification. *RSC Advances*, 5(60), 48739-48759.

128. Wu-Yuan, C. D., Eganhouse, K. J., Keller, J. C., & Walters, K. S. (1994). Oral bacterial attachment to titanium surfaces: a scanning electron microscopy study. *The Journal of oral implantology*, 21(3), 207-213.

129. Rimondini, L., Faré, S., Brambilla, E., Felloni, A., Consonni, C., Brossa, F., & Carrassi, A. (1997). The effect of surface roughness on early in vivo plaque colonization on titanium. *Journal of periodontology*, 68(6), 556-562.

130. Lorenzetti, M., Dogan, T., Stopar, D., Kalin, M., Kobe, S., & Novak, S. (2015). The Influence of Surface Modification on Bacterial Adhesion to Titanium-Based Substrates. *ACS applied materials & interfaces*, 7(3), 1644-1651.

131. Pham, V. T., Bhadra, C. M., Truong, V. K., Crawford, R. J., & Ivanova, E. P. (2015). Designing Antibacterial Surfaces for Biomedical Implants. *Antibacterial Surfaces* (pp. 89-111). Springer International Publishing.
132. Gallardo-Moreno, A. M., Pacha-Olivenza, M. A., Saldaña, L., Pérez-Giraldo, C., Bruque, J. M., Vilaboa, N., & González-Martín, M. L. (2009). In vitro biocompatibility and bacterial adhesion of physico-chemically modified Ti6Al4V surface by means of UV irradiation. *Acta biomaterialia*, *5*(1), 181-192.
133. Godoy-Gallardo, M., Rodríguez-Hernández, A. G., Delgado, L. M., Manero, J. M., Javier Gil, F., & Rodríguez, D. (2015). Silver deposition on titanium surface by electrochemical anodizing process reduces bacterial adhesion of *Streptococcus sanguinis* and *Lactobacillus salivarius*. *Clinical oral implants research*, *26*(10), 1170-1179.
134. Teker, D., Muhaffel, F., Menekse, M., Karaguler, N. G., Baydogan, M., & Cimenoglu, H. (2015). Characteristics of multi-layer coating formed on commercially pure titanium for biomedical applications. *Materials Science and Engineering: C*, *48*, 579-585.
135. Petrini, P., Arciola, C. R., Pezzali, I., Bozzini, S., Montanaro, L., Tanzi, M. C., & Visai, L. (2006). Antibacterial activity of zinc modified titanium oxide surface. *The International journal of artificial organs*, *29*(4), 434-442.
136. Goodman, S. B., Yao, Z., Keeney, M., & Yang, F. (2013). The future of biologic coatings for orthopaedic implants. *Biomaterials*, *34*(13), 3174-3183.
137. Hasan, J., Crawford, R. J., & Ivanova, E. P. (2013). Antibacterial surfaces: the quest for a new generation of biomaterials. *Trends in biotechnology*, *31*(5), 295-304.
138. Charnley, M., Textor, M., & Acikgoz, C. (2011). Designed polymer structures with antifouling-antimicrobial properties. *Reactive and Functional Polymers*, *71*(3), 329-334.
139. Ista, L. K., Fan, H., Baca, O., & López, G. P. (1996). Attachment of bacteria to model solid surfaces: oligo (ethylene glycol) surfaces inhibit bacterial attachment. *FEMS microbiology letters*, *142*(1), 59-63.

140. Razatos, A., Ong, Y. L., Boulay, F., Elbert, D. L., Hubbell, J. A., Sharma, M. M., & Georgiou, G. (2000). Force measurements between bacteria and poly (ethylene glycol)-coated surfaces. *Langmuir*, *16*(24), 9155-9158.
141. Hadesfandiari, N., Yu, K., Mei, Y., & Kizhakkedathu, J. N. (2014). Polymer brush-based approaches for the development of infection-resistant surfaces. *Journal of Materials Chemistry B*, *2*(31), 4968-4978.
142. Subramani, K., Jung, R. E., Molenberg, A., & Hämmerle, C. H. (2009). Biofilm on dental implants: a review of the literature. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, *24*(4).
143. Gallo, J., Holinka, M., & Moucha, C. S. (2014). Antibacterial surface treatment for orthopaedic implants. *International journal of molecular sciences*, *15*(8), 13849-13880.
144. Junter, G. A., Thébault, P., & Lebrun, L. (2016). Polysaccharide-based antibiofilm surfaces. *Acta biomaterialia*, *30*, 13-25.
145. Palza, H., Escobar, B., Bejarano, J., Bravo, D., Diaz-Dosque, M., & Perez, J. (2013). Designing antimicrobial bioactive glass materials with embedded metal ions synthesized by the sol-gel method. *Materials Science and Engineering: C*, *33*(7), 3795-3801.
146. Schubert, U., Huesing, N., & Lorenz, A. (1995). Hybrid inorganic-organic materials by sol-gel processing of organofunctional metal alkoxides. *Chemistry of materials*, *7*(11), 2010-2027.
147. Brinker, C. J., Hurd, A. J., Schunk, P. R., Frye, G. C., & Ashley, C. S. (1992). Review of sol-gel thin film formation. *Journal of Non-Crystalline Solids*, *147*, 424-436.
148. Jitianu, A., Britchi, A., Deleanu, C., Badescu, V., & Zaharescu, M. (2003). Comparative study of the sol-gel processes starting with different substituted Si-alkoxides. *Journal of Non-Crystalline Solids*, *319*(3), 263-279.
149. Ciriminna, R., Fidalgo, A., Pandarus, V., Béland, F., Ilharco, L. M., & Pagliaro, M. (2013). The sol-gel route to advanced silica-based materials and recent applications. *Chemical reviews*, *113*(8), 6592-6620.

150. Wen, J., & Wilkes, G. L. (1996). Organic/inorganic hybrid network materials by the sol-gel approach. *Chemistry of Materials*, 8(8), 1667-1681.
151. Morosanova, E. I. (2012). Silica and silica-titania sol-gel materials: synthesis and analytical application. *Talanta*, 102, 114-122.
152. Schmidt, H. (1988). Chemistry of material preparation by the sol-gel process. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 100(1-3), 51-64.
153. Bounor-Legaré, V., & Cassagnau, P. (2014). In situ synthesis of organic-inorganic hybrids or nanocomposites from sol-gel chemistry in molten polymers. *Progress in Polymer Science*, 39(8), 1473-1497.
154. Brinker, C. J., & Scherer, G. W. (2013). Sol-gel science: the physics and chemistry of sol-gel processing. Academic press.
155. Wang, D., & Bierwagen, G. P. (2009). Sol-gel coatings on metals for corrosion protection. *Progress in Organic Coatings*, 64(4), 327-338.
156. Owens, G., Singh, R. K., Foroutan, F., Alqaysi, M., Han, C. M., Mahapatra, C. & Knowles, J. C. (2016). Sol-gel Based Materials for Biomedical Applications. *Progress in Materials Science*.
157. Reffitt, D. M., Ogston, N., Jugdaohsingh, R., Cheung, H. F. J., Evans, B. A. J., Thompson, R. P. H. & Hampson, G. N. (2003). Orthosilicic acid stimulates collagen type 1 synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells in vitro. *Bone*, 32(2), 127-135.
158. Gupta, R., & Kumar, A. (2008). Bioactive materials for biomedical applications using sol-gel technology. *Biomedical Materials*, 3(3), 034005.
159. Sugahara, Y., Okada, S., Kuroda, K., & Kato, C. (1992). ²⁹Si-NMR study of hydrolysis and initial polycondensation processes of organoalkoxysilanes. I. Dimethyldiethoxysilane. *Journal of non-crystalline solids*, 139, 25-34.
160. Parashar, G., Srivastava, D., & Kumar, P. (2001). Ethyl silicate binders for high performance coatings. *Progress in Organic Coatings*, 42(1), 1-14.

161. Avnir, D., & Kaufman, V. R. (1987). Alcohol is an unnecessary additive in the silicon alkoxide sol-gel process. *Journal of non-crystalline solids*, 92(1), 180-182.
162. The sol-gel preparation of silica gels. *Journal of chemical education*, 1994, vol. 71, no 7, p. 599.
163. Wright, J. D., & Sommerdijk, N. A. (2000). *Sol-gel materials: chemistry and applications* (Vol. 4). CRC press.
164. Milea, C. A., Bogatu, C., & Duta, A. (2011). The influence of parameters in silica sol-gel process. *Bulletin of The Transilvania University of Brasov*, 4, 53.
165. Collinson, M. M. (1998). Analytical applications of organically modified silicates. *Microchimica Acta*, 129(3-4), 149-165.
166. Serra, A., Ramis, X., & Fernández-Francos, X. (2016). Epoxy Sol-Gel Hybrid Thermosets. *Coatings*, 6(1), 8.

Capítulo 2

Materiales y Técnicas experimentales

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y TÉCNICAS EXPERIMENTALES

1. Introducción.....	70
1.1. Materiales utilizados.....	70
1.1.1. Alcoxisilanos.....	70
1.1.2. Agentes bactericidas.....	72
2. Método de síntesis y obtención de los recubrimientos.....	75
2.1. Hidrólisis y condensación.....	75
2.2. Aplicación, secado y curado.....	75
2.3. Técnicas de deposición utilizadas.....	77
3. Técnicas experimentales.....	79
3.1. Caracterización morfológica.....	79
3.1.1. Ensayo de adherencia.....	79
3.1.2. Caracterización mediante Microscopía Electrónica de Barrido.....	80
3.2. Caracterización química.....	80
3.2.1. Resonancia Magnética Nuclear del átomo de silicio.....	80
3.2.2. Resonancia Magnética Nuclear del átomo de carbono.....	82
3.2.3. Espectroscopia de infrarrojo con Transformada de Fourier.....	83
3.3. Determinación del grado de hidrofilia/hidrofobia.....	83
3.4. Ensayo de degradación hidrolítica.....	84
3.5. Ensayo de liberación de silicio.....	85

3.6. Estudios de la liberación del agente bactericida.....	85
3.7. Ensayos <i>in vitro</i>	86
3.7.1. Medida de la viabilidad celular utilizando el ensayo de MTT.....	86
3.7.2. Medida de la adhesión y proliferación celular utilizando el ensayo de Alamar Blue.....	88
3.7.3. Determinación de la actividad antibacteriana.....	88
Bibliografía.....	90

1. INTRODUCCIÓN

Teniendo en cuenta estudios anteriores del grupo de investigación, se han desarrollado recubrimientos híbridos orgánico-inorgánicos para implantes dentales con una combinación de diferentes precursores de silicio, todos ellos alcoxisilanos, mediante la obtención de una red polisiloxánica a través del método de síntesis *sol-gel*.

Los silicatos obtenidos vía *sol-gel* suponen una de las alternativas más interesantes como recubrimientos para implantes dentales, ya que combinan una serie importante de ventajas; los materiales pueden ser biorreabsorbibles en mayor o menor grado, permiten la incorporación de diferentes sustancias mediante la funcionalización de su superficie, la disolución de los vidrios de Si tipo *sol-gel* se produce mediante una reacción de hidrólisis que da lugar a productos no-tóxicos y en baja concentración y el ácido silícico desprendido es osteoinductor. Además, y lo más importante, es la posibilidad de incorporar moléculas “frágiles” en la matriz inorgánica sin destruirla.

En este trabajo, se han sintetizado materiales a partir de sistemas de dos alcóxidos de silicio (sistemas binarios) y a partir de tres alcóxidos (sistemas ternarios), obteniéndose en todos los casos materiales híbridos con buenas propiedades superficiales y químicas.

1.1. Materiales utilizados

1.1.1. Alcoxisilanos

Los precursores de Silicio utilizados son el Tetraetilortosilicato (TEOS, Sigma Aldrich), Metiltrimetoxisilano (MTMOS, Sigma Aldrich) y Glicidoxipropiltrimetoxisilano (GPTMS, Sigma-Aldrich). Todos ellos se han combinado en diferentes proporciones para obtener recubrimientos híbridos con diferentes características en función de la proporción de precursores en cada caso.

Las estructuras de los precursores pueden observarse a continuación en la figura 2.1.

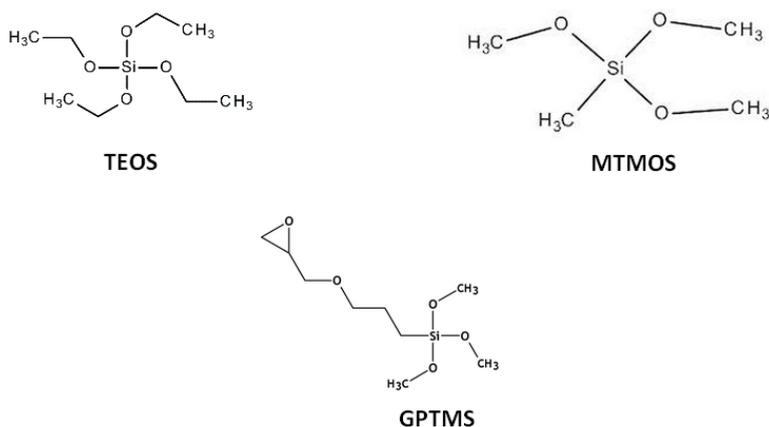


Figura 2.1: Estructura molecular de los precursores de silicio utilizados, TEOS, MTMOS y GPTMS.

La elección de estos precursores para el desarrollo de nuestros materiales, se debe tanto a los buenos resultados obtenidos en estudios anteriores^{1, 2, 3}, como a que cada precursor presenta propiedades específicas cuya combinación permite obtener recubrimientos con las características deseadas y buenas propiedades para su aplicación final.

El TEOS es un precursor incoloro y altamente hidrófilo, cuyos recubrimientos sufren una degradación completa en medio acuoso debido a su carácter totalmente inorgánico, por lo tanto, variando la proporción de TEOS se puede modular la hidrofobia/hidrofilia de los sistemas, y las velocidades de degradación y de liberación de Si del recubrimiento.

El GPTMS es un precursor de carácter inorgánico con una larga cadena orgánica (grupo glicidoxilopropilo) que permanece en el recubrimiento tras la síntesis. Mediante la adición de GPTMS se consigue funcionalizar la superficie del recubrimiento debido a los grupos epoxi que presenta en su estructura y que pueden favorecer el anclaje de moléculas activas, mediante la apertura de este anillo en medio acuoso.

Por último, el precursor MTMOS, cuenta también con una cadena orgánica corta (grupo metilo) que permanece intacta tras la síntesis posibilitando el carácter híbrido de la red formada. Su introducción mejora la biocompatibilidad del sistema.

1.1.2. Agentes bactericidas.

Como agentes bactericidas para este trabajo se han elegido, el quitosano, el dihidrocloruro de octenidina, el diacetato de clorhexidina, y el nitrato de plata.

El **quitosano** (Chitosan, low molecular weight, Sigma Aldrich), es un polímero policatiónico natural de la familia de los polisacáridos, que se obtiene de la desacetilación parcial de la quitina por la reacción que se observa en la figura 2.2.

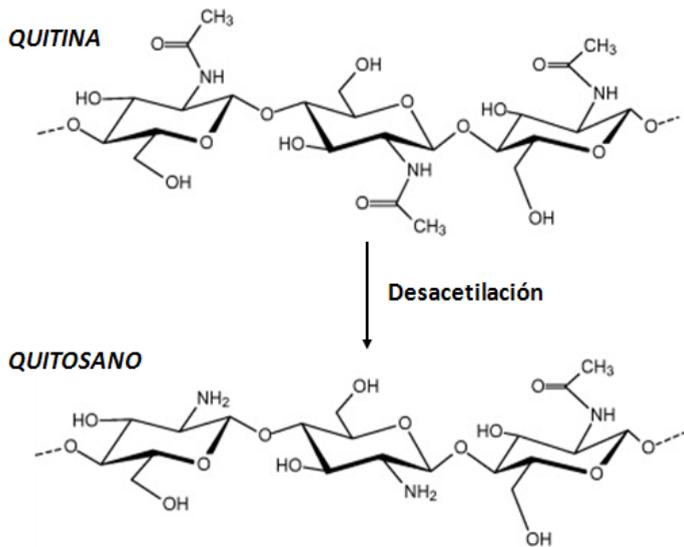


Figura 2.2: Estructura de la quitina y del quitosano por desacetilación de la quitina⁴.

Tal y como se ha comentado en el capítulo 1, se trata de un copolímero compuesto por unidades de *D*-glucosamina y *N*-acetil-*D*-Glucosamina y tiene una estructura muy similar a la de la celulosa. Es insoluble en la mayoría de los disolventes orgánicos, en medios alcalinos y en agua, pero es soluble en ácidos orgánicos diluidos (a un pH inferior de 6) como por ejemplo el ácido acético, lo que hace que puedan obtenerse películas por casting o dipping obteniéndose estructuras densas y altamente porosas⁵.

Como segundo agente bactericida está el **dihidrocloruro de octenidina**⁶ (Octenidine Dihydrochloride, TCI). La octenidina es un potente antibacteriano sintético (sintetizado por primera vez hace dos décadas) que muestra propiedades de los compuestos químicos cargados positivamente. Pertenece a la familia de las

bispiridinaminas (figura 2.3), por lo que además, exhibe propiedades únicas no comunes a las demás sustancia catiónicas antisépticas. Así, una de las características más importantes es que no se ha observado que la octenidina esté afectada por ninguno de los mecanismos que generan resistencia en las bacterias, como es el caso de otros antimicrobianos de naturaleza catiónica.

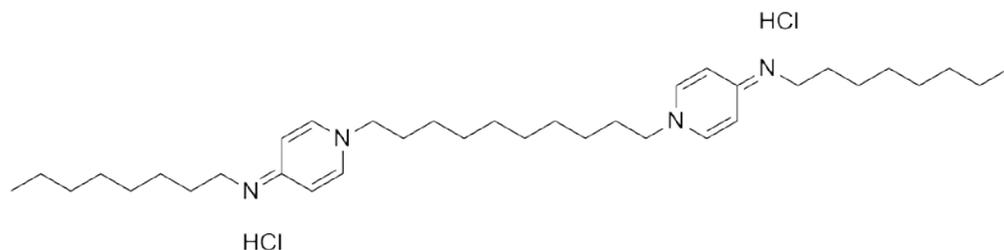


Figura 2.3: Estructura de la octenidina.

Además, la octenidina tiene un amplio espectro de actuación frente a un amplio rango de microorganismos⁷ (bacterias Gram positivas, Gram negativas y hongos), y sin embargo presenta una buena biocompatibilidad con los tejidos y no presenta toxicidad sistemática⁸. Todo esto, convierte a esta molécula, en un potente bactericida que además, posee dos centros activos catiónicos, que no interactúan entre ellos por estar separados mediante una larga cadena alifática, tal y como se observa en la figura 2.4, y que aumentan su potencial antibacteriano.

Una de sus aplicaciones más conocidas y utilizadas es en aplicaciones tópicas como desinfectante dérmico, de membranas mucosas y heridas, y también en biomateriales como parches dérmicos y suturas entre otros^{9,10,11}.

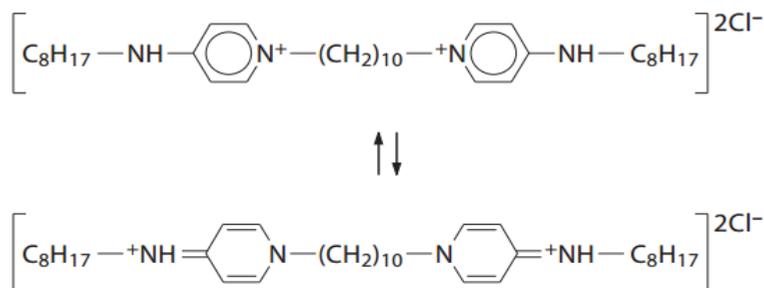


Figura 2.4: Estructura de la octenidina y resonancia de sus grupos cargados positivamente⁹.

En siguiente lugar se encuentra **el diacetato de clorhexidina** (Chlorhexidine Diacetate, TCl). La clorhexidina es también un bactericida de amplio espectro procedente de la familia de las biguanidas, y se trata de un biocida ampliamente utilizado en antisépticos, sobre todo de toma oral¹² y en la industria dental, en modo de colutorios para enjuague bucal y dentífricos^{13, 14}.

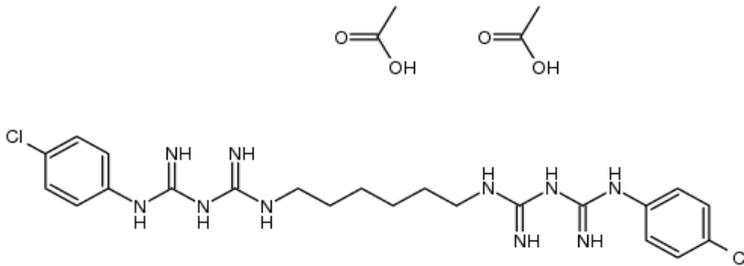
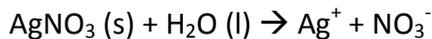


Figura 2.5: Estructura del diacetato de clorhexidina.

El mecanismo de actuación de la clorhexidina, consiste en desestabilizar y penetrar en las membranas celulares bacterianas. La clorhexidina precipita el citoplasma e interfiere en la función de la membrana, inhibiendo la utilización de oxígeno, lo que ocasiona la muerte celular. A bajas concentraciones, la clorhexidina puede exhibir un efecto bacteriostático, mientras que a altas concentraciones posee un efecto bactericida. Diversos estudios clínicos han demostrado que no hay un aumento significativo de la resistencia bacteriana ni desarrollo de infecciones oportunistas durante el tratamiento a largo plazo con clorhexidina.

Por último, está el **nitrate de plata (AgNO₃)**. Como se ha comentado anteriormente, la plata es uno de los bactericidas de mayor interés debido a su específica actividad antibacteriana. Presenta gran poder bactericida a bajas dosis contra bacterias comunes en la cavidad oral como, por ejemplo, *Staphylococcus aureus*¹⁵. Los recubrimientos cargados con nitrate plata son químicamente resistentes y liberan iones de plata durante un largo periodo de tiempo¹⁶. La liberación de los iones Ag⁺ se producirá mediante la migración de éstos hacia el exterior de la matriz de sílice. Por estos motivos se ha elegido el nitrate de plata (Sigma Aldrich) como precursor para la liberación de los iones plata por la fácil disociación de esta sal en medio acuoso.



2. MÉTODO DE SÍNTESIS Y OBTENCIÓN DE LOS RECUBRIMIENTOS

2.1 Hidrólisis y condensación

Para obtener los recubrimientos se preparan disoluciones de los precursores de silicio elegidos en cada caso, en isopropanol (2-Propanol, Sigma Aldrich), con una relación en volumen alcohol:precursor=1:1. Esto se debe a que uno de los problemas más frecuentes cuando se trabaja con precursores de silicio es su insolubilidad en agua, por lo que es necesario utilizar como medio de reacción alcohol. Además el isopropanol mejora la miscibilidad entre los precursores.

Esta disolución se agita magnéticamente y se añade gota a gota la cantidad estequiométrica de agua acidificada necesaria para la hidrólisis de todos los grupos susceptibles de hidrólisis de los precursores, es decir, los grupos alcóxido (Figura 2.6).



Figura 2.6: Hidrólisis y condensación de los alcóxidos de Silicio.

Todas las síntesis se han llevado a cabo a pH ácido (catálisis ácida), utilizando como catalizadores HNO_3 0,1N (Ácido Nítrico, Sigma Aldrich) y HCl 0,1N (Ácido Clorhídrico, Sigma Aldrich) según las necesidades de la síntesis.

Tras la adición del catalizador, la disolución se deja en agitación durante 1h para conseguir la hidrólisis de la mayoría de los grupos alcóxido y 1h adicional sin agitación (etapa de gelificación) para estabilizar el sistema.

2.2. Aplicación, secado y curado de los materiales

En todos los casos y como se ha mencionado, después de la etapa de gelificación, tras la segunda hora de síntesis, las diferentes formulaciones se aplican sobre distintos sustratos en función de la caracterización posterior a la que vaya a ser sometido el recubrimiento.

Los sustratos elegidos dependen del ensayo en el que vayan a ser utilizados los materiales. Antes de la deposición, todos los sustratos son sometidos a tratamientos de limpieza específicos:

- **Placas de acero AISI316L** (suministrado por Ramón Navarrete S.L): Limpieza con agua y jabón, agua destilada y acetona tras su lijado.

- **Porta-objetos de vidrio** (76 mm x 26 mm x 1 mm, LineaLAB): Primero Inmersión en ácido nítrico (HNO_3 al 25% en peso) y baño de ultrasonidos durante 30 minutos aproximadamente, y después se repite el mismo procedimiento con agua destilada.

- **Moldes de teflón** ($\varnothing = 5$ cm, 2 mm profundidad): Limpieza con agua destilada y acetona.

- **Discos de Titanio** (cpTi grado IV, 12 y 10 mm diámetro y 1.2 mm de espesor, suministrado por Ilerimplant S.L): Descontaminación y esterilización mediante radiación gamma.

- **Tornillos de Titanio** (cpTi grado IV GMI® modelo Frontier, 3,75 mm de diámetro y 8 mm de longitud, Ilerimplant S.L): Descontaminación y esterilización mediante radiación gamma.

Así, se recubren placas de acero 316L para la caracterización morfológica y para el estudio de la mojabilidad o ángulo de contacto de los recubrimientos, mientras que para estudios de degradación hidrolítica y de liberación de silicio mediante la técnica de ICP se recubren porta-objetos de vidrio. La caracterización química se realiza por medio de la espectroscopia FT-IR y de ^{29}Si -RMN tanto en estado líquido como en estado sólido siendo para éste último necesaria la obtención de los recubrimientos en modo de film libre en moldes de teflón. Por último, tanto para el estudio de la rugosidad superficial por SEM como para los estudios *in vitro* se utilizan discos de titanio granallado sometidos también a ataque ácido. En la figura 2.7, se muestran los sustratos utilizados.

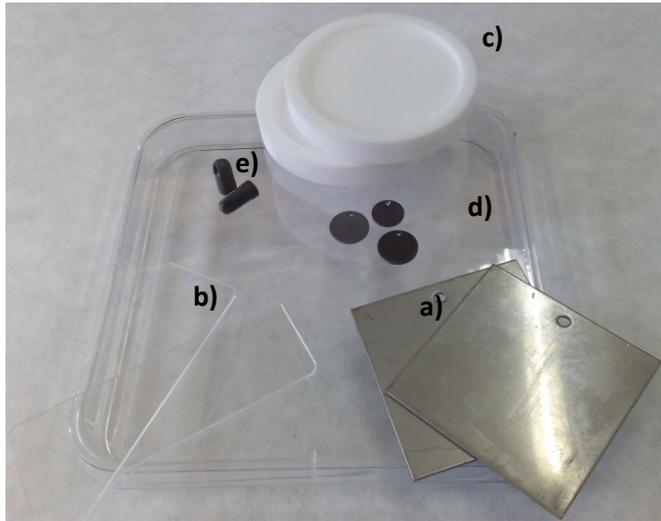


Figura 2.7: Sustratos utilizados en los diferentes estudios. Placas de acero 316L (a), porta objetos de vidrio (b), moldes de teflón (c), discos de titanio (d) y tornillos de titanio (e).

En función del ensayo a realizar y del sustrato a recubrir se utilizan distintas técnicas de deposición del *sol* sobre el sustrato.

2.3. Técnicas de deposición utilizadas

La técnica de ***flow-coating*** (figura 2.8). Esta técnica se basa en verter la disolución a aplicar sobre el sustrato a recubrir mediante una pipeta Pasteur de forma continua. Este proceso se repite 3 veces para asegurar que todo el sustrato haya sido recubierto. En el caso de las placas de acero, el recubrimiento se aplica únicamente por el lado previamente lijado mientras que en el caso de los porta-objetos de vidrio se recubre por ambas caras.

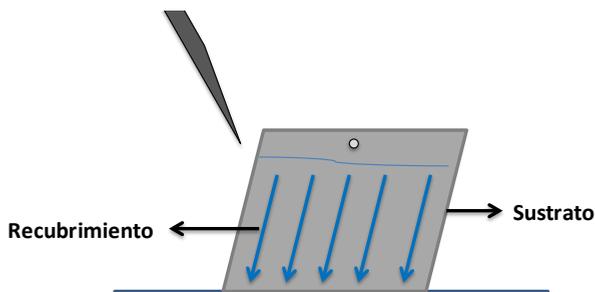


Figura 2.8: Técnica de deposición *flow-coating*.

El espesor del recubrimiento obtenido dependerá del ángulo de inclinación del sustrato, de la viscosidad del líquido aplicado y de la velocidad de evaporación de disolvente. Una de las ventajas más importantes de esta técnica es que se pueden recubrir con relativa facilidad superficies o sustratos que no sean del todo lisos.

La técnica de deposición **dip-coating** tiene su base en la inmersión del sustrato en la disolución a aplicar durante un tiempo determinado (figura 2.9). Tanto las velocidades de bajada del sustrato como la de subida son determinadas por el usuario siendo en este caso una velocidad de bajada de 50.01mm/min, un minuto en inmersión y una velocidad de subida 100.03 mm/min. Esta técnica se utiliza para recubrir los discos de titanio.

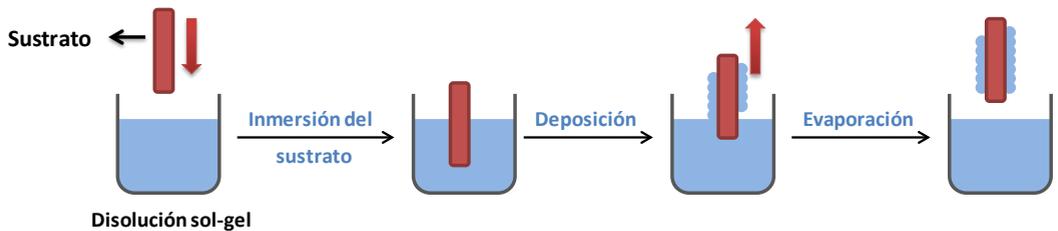


Figura 2.9: Técnica de deposición dip-coating.

La técnica **drop-coating** consiste en depositar una cantidad previamente medida del *sol* sobre el sustrato (figura 2.10). Es importante tratar de expandir homogéneamente el sol por toda la superficie y evitar que se pierda material por los bordes.

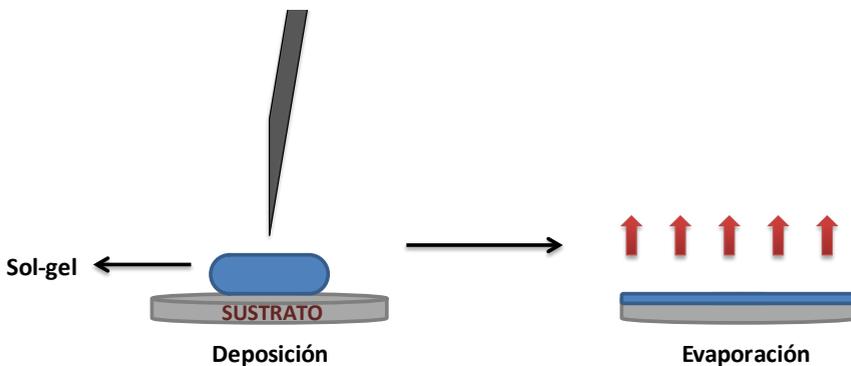


Figura 2.10: Técnica de deposición drop-coating.

En todos los casos, tras la aplicación del gel, la densificación de la red y por lo tanto la obtención del recubrimiento se lleva a cabo mediante la llamada etapa de curado, en la que el sustrato recubierto es introducido en la estufa a una T determinada y previamente elegida. De este modo se elimina el contenido residual en alcohol y agua, y la red se va haciendo cada vez más densa para finalmente solidificar.

3. TÉCNICAS EXPERIMENTALES

3.1 Caracterización morfológica

3.1.1. Ensayo de adherencia

La adherencia de los recubrimientos al sustrato metálico se mide mediante el ensayo de corte por enrejado. El método consiste en someter las muestras aplicadas a cortes cruzados y perpendiculares con una cuchilla con una separación entre cortes de 2mm. Seguidamente se cubre con una cinta adhesiva la zona de los cortes, tirando de ella con un movimiento rápido.

Dependiendo del posible desprendimiento de los cortes, se establece una clasificación entre 0 y 5. El 0 se asigna al área cuadrículada que no presentan alteración y el 5 a desprendimientos de película superiores al 65%, tal y como se observa en la figura 2.11.

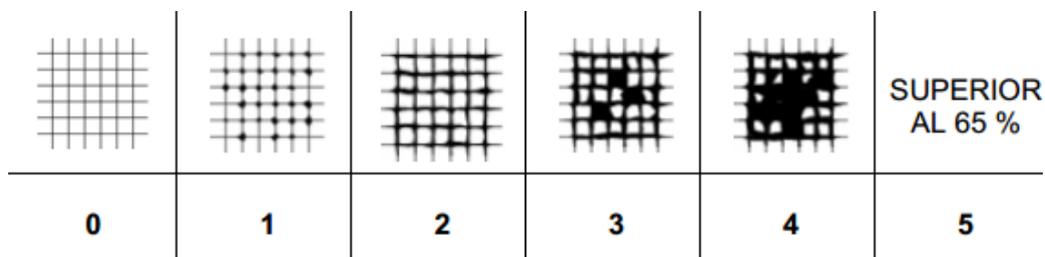


Figura 2.11: Clasificación del ensayo de corte-enrejado según la norma ISO 2409.

Este ensayo se realiza sobre los recubrimientos obtenidos en placa metálica de acero, por su similitud con la adherencia al titanio, y la cantidad desprendida de los mismos se observa con un microscopio óptico (LEICA microsystems) a varios aumentos.

3.1.2. Caracterización mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Para estudiar la superficie de algunas muestras, se empleó la técnica de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). Esta técnica se basa en un haz de electrones que incide sobre la superficie a analizar, desprendiéndose de ésta un haz de electrones secundarios que tratados adecuadamente dan lugar a la imagen que se obtiene de la superficie. Los materiales no conductores, como los materiales poliméricos, necesitan un recubrimiento conductor (etapa de dorado) para ser analizados por esta técnica. Se utilizó un Microscopio SEM HITACHI S-2700, adquiriendo las imágenes a un voltaje de 15kV. Para el pretratamiento de las muestras se utilizó un SPUTTER COATER SC500, y de este modo se generaron muestras conductoras mediante la deposición de una fina capa de oro sobre ellas.

3.2 Caracterización química.

La caracterización química de los recubrimientos obtenidos se lleva a cabo mediante dos técnicas extensamente utilizadas hoy en día, la Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear tanto del átomo de Silicio (^{29}Si -RMN) en estado sólido y en estado líquido como del átomo de Carbono (^{13}C -RMN), y la Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR).

3.2.1. Resonancia Magnética Nuclear del átomo de silicio (^{29}Si -RMN)

Los materiales obtenidos se caracterizan mediante la técnica de Resonancia Magnética Nuclear de ^{29}Si . Este método aporta información relevante sobre las primeras etapas de la reacción de hidrólisis-policondensación de los precursores así como de las especies formadas en estas etapas¹⁷ (RMN en estado líquido). Además se puede estudiar el estado de la red formada tras el curado y el grado de condensación de las especies predominantes mediante la técnica de RMN en estado sólido.

Los espectros en estado líquido se registraron en dos espectrómetros Bruker 500 DPX y Bruker 400 AVANCE equipados con una sonda BBO con gradientes en el eje Z. Todos los espectros se registraron a temperatura ambiente.

En los espectros, se empleó la secuencia cpmg, un filtro de T_2 de 5 ms, para poder eliminar las señales provenientes del tubo. La frecuencia empleada fueron

99,362 MHz o 79,495 MHz. Se registraron 71K puntos con una ventana espectral de 17857 Hz, tiempo de adquisición de 1 s y tiempo de espera de 2 s.

La mezcla de reacción se realizó en el propio tubo de RMN y la adquisición de los espectros tuvo lugar antes y después de añadir el catalizador, estudiando la cinética de reacción durante cada hora, hasta un tiempo total de 2 h. Con el fin de disminuir el tiempo de relajación de ^{29}Si , se empleó como disolvente en cada una de las muestras, una mezcla de acetilacetato de Cr, $\text{Cr}(\text{acac})_3$ (Sigma Aldrich), en metanol deuterado (d-MeOH, Sigma Aldrich). La concentración final del $\text{Cr}(\text{acac})_3$ fue de $2,5 \cdot 10^{-3}$, y su función es actuar como relajante de spin, lo que facilita la adquisición de los espectros de silicio en un periodo de tiempo inferior¹⁷.

En cuanto a la adquisición de los espectros en estado sólido, éstos fueron adquiridos en un espectrómetro Bruker Avance III de 9,4 T (400 MHz) equipado con una sonda de 4 mm MASDVT 400WB BL4 de tres canales. Se utilizaron rotores de zirconio y la velocidad de giro de las muestras fue de 10 KHz. Para la adquisición del espectro de ^{29}Si (79,5 MHz) se utilizó la secuencia de pulsos CPMAS (Cross Polarization Magic Angle Spining), y se utilizó también un pulso de r.f de 40 KHz, un tiempo de contacto de 2 ms y un tiempo entre pulsos de 5 s. La anchura espectral fue de 32 KHz.

Para el seguimiento de la reacción por ^{29}Si -RMN en estado líquido, se utilizó el método de anotación desarrollado por Lippmaa y col.¹⁸ Así, a cada átomo de silicio unido a tres grupos hidrolizables (alcoxi) se le denominará T por estar unido a tres átomos de oxígeno (caso del MTMOS y del GPTMS). En el caso del TEOS, por estar unido a 4 grupos alcoxi se le denominará Q. A estas especies se les añade un subíndice que indica el número de átomos de oxígeno que a su vez están unidos a otro átomo de silicio.

Cuanto mayor sea el subíndice de las especies formadas, mayor será la proporción de especies con un grado de condensación mayor, y por lo tanto mayor será también la formación o entrecruzamiento de la red final formada.

En la Figura 2.12 se muestran las posibles estructuras que pueden coexistir en este proceso de sol-gel.

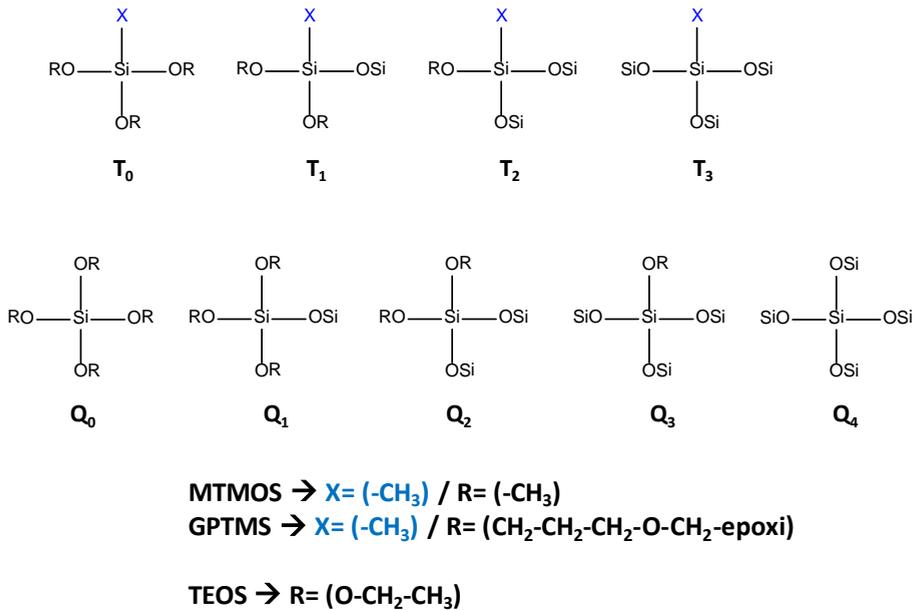


Figura 2.12: Estructuras coexistentes en un proceso de reticulación sol-gel según Lippma y col.¹⁸

3.2.2. Resonancia Magnética Nuclear del átomo de carbono (¹³C-RMN)

La espectroscopia de RMN del átomo de carbono se empleó para la caracterización química de la estructura híbrida de los recubrimientos¹⁹, para estudiar posibles uniones entre moléculas en la red, así como para estudiar los posibles productos residuales atrapados en la red tras el curado.

En el caso de la adquisición de los espectros en estado líquido, se adquirieron usando una secuencia estándar con desacoplamiento en protón, a una frecuencia de 125,75 MHz o 100,248 MHz. Se registraron 64 K puntos con una ventana espectral de 31400 Hz. El tiempo de adquisición fue de 1 s y el tiempo de espera entre adquisiciones fue de 2 s.

Los espectros en estado sólido se hicieron en un espectrómetro Bruker 400 WB PLUS (9,40 T), en una sonda de doble resonancia CP-MAS (Cross Polarization Magic Angle Spinning) en rotores 4 mm. Se utilizó un pulso de r.f 47 KHz para la adquisición del ¹³C con un tiempo de contacto de 1,5 ms y un tiempo entre pulsos de 5 s. La anchura espectral fue de 29 KHz.

3.2.3 Espectroscopia de infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR)

La técnica FT-IR es una de las técnicas más utilizadas en el análisis de materiales puesto que se trata de una técnica cuyo resultado está directamente relacionado con la estructura molecular y la composición del material a estudiar²⁰.

Para realizar el análisis por espectroscopia infrarroja se ha empleado un equipo Nicolet 6700 FTIR en un intervalo de longitudes de onda entre [4000-450 cm⁻¹]. Para ello se aplica la síntesis sobre moldes de teflón y tras el curado se obtiene el recubrimiento en forma de film libre. Tras esto, el film se tritura y se mezcla con KBr para la adquisición del espectro a partir de una pastilla del material. Los espectros obtenidos son una media de 10 barridos en modo Transmisión.

3.3. Determinación del grado de hidrofilia/hidrofobia

La capacidad de mojabilidad de un sólido por parte de un líquido se determina por medidas de ángulo de contacto que tienen la gota de este líquido y la superficie del sólido.

Teniendo en cuenta su aplicación final, una de las características más importantes de los recubrimientos es la hidrofilia de su superficie. Esta propiedad está directamente relacionada con la capacidad de adhesión de las células a la superficie del sustrato y su proliferación. También, teniendo en cuenta que los recubrimientos desarrollados estarán en contacto con el medio fisiológico (cuya mayor parte es agua) esta medida, nos dará una idea de la capacidad de adsorción de agua, que influirá en su posible degradación hidrolítica.

Estos estudios se realizan mediante el uso de un goniómetro, donde el ángulo de contacto indica la mojabilidad de una superficie y por lo tanto su hidrofilia o hidrofobia. Se considera una superficie hidrófoba aquella en la que el ángulo de contacto entre la gota y la superficie del sustrato es mayor de 90°, y se considera una superficie hidrófila la de ángulo de contacto menor a 90° (figura 2.13).

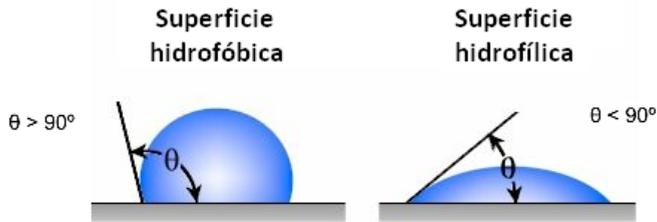


Figura 2.13: Ángulo de contacto entre una superficie y una gota de líquido.

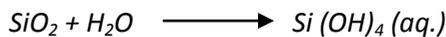
Los ensayos se realizaron con agua destilada a temperatura ambiente y un volumen de muestra constante (10 μL). El equipo utilizado fue un Goniómetro OCA20, que mide el ángulo formado por la tangente de la interfaz líquido-vapor en el punto de contacto entre las tres fases (líquido-vapor-sólido).

Cada valor del ángulo de contacto para cada sistema es la media de 10 medidas realizadas sobre la superficie del recubrimiento.

3.4. Ensayo de Degradación Hidrolítica

Una de las características más importantes de estos materiales es su biodegradabilidad en medio acuoso y posterior reabsorción en el organismo²⁰. Por eso, la capacidad y la velocidad de degradación de éstos en el medio fisiológico son muy importantes, puesto que esta velocidad de degradación influirá directamente en la liberación de los principios activos que contengan.

La degradación tiene lugar en medio acuoso mediante la reacción que se muestra a continuación:



Los estudios de degradación hidrolítica se llevaron a cabo en agua destilada, pesándose las muestras a determinados intervalos de tiempo y midiendo la pérdida de peso de los recubrimientos. Las muestras son introducidas en 50 ml de agua destilada y se guardan en estufa a 37°C (simulando la T fisiológica) durante 8 semanas aprox. Los recubrimientos se obtienen mediante la deposición del sol en porta-objetos de vidrio. En los periodos de tiempo previamente establecidos las muestras se secan a vacío y se pesan para determinar la pérdida de peso sufrida. Para calcular la pérdida de peso en porcentaje se utilizó la siguiente ecuación (Ec.

2.1), donde P_a es el peso de la muestra antes de su inmersión en agua destilada, y P_d el peso de la muestra tras su inmersión y posterior secado a vacío.

Cada valor obtenido es la media de tres medidas individuales para cada sistema.

$$\text{Pérdida de peso (\%)} = \frac{P_a - P_d}{P_a} \times 100 \quad (\text{Ec. 2.1})$$

3.5. Ensayo de liberación de Silicio

Se ha demostrado ampliamente que cuando este tipo recubrimientos se degrada hidrolíticamente mediante la reacción $\text{SiO}_2 + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{Si}(\text{OH})_4$ (aq.), el silicio desprendido en bajas concentraciones, Si (IV), no sólo no es tóxico sino que tiene propiedades osteoinductoras puesto que afecta positivamente a la proliferación celular^{21,22}.

Así, para determinar la cantidad de Si liberado, la técnica utilizada para este estudio fue la técnica de ICP-MS (Espectrometría de masas con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo- Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry), técnica que se basa en una fuente de iones a alta T, encargados de descomponer, atomizar e ionizar la muestra. El equipo empleado fue un Agilent 7700 series ICP-MS. En estos estudios de liberación, los recubrimientos han sido obtenidos en porta-objetos de vidrio e introducidos en 50 ml de agua ultrapura o Mili-Q.

Las muestras se almacenan durante 8 semanas aprox. (como en el caso de la degradación hidrolítica) y a determinados intervalos de tiempo, se toman alícuotas del medio y se determina la cantidad de Silicio liberada.

3.6. Estudios de liberación controlada del agente bactericida

Los ensayos de liberación del agente bactericida se realizan introduciendo los recubrimientos previamente depositados sobre porta objetos de vidrio en botes falcon que contienen 50 ml de agua destilada. Estos botes se almacenan a una T de 37°C. A intervalos de tiempo previamente determinados se efectúan tomas de muestra del medio de disolución. La cantidad de agente bactericida liberado se determina mediante la técnica de espectrometría UV-VIS, a partir del pico de absorbancia característico de la molécula activa.

3.7. Ensayos *in vitro*

Se han llevado a cabo diferentes ensayos *in vitro* con el objetivo de estudiar la citotoxicidad de los materiales, así como su viabilidad celular y por supuesto su capacidad bactericida. Con el fin de evaluar el comportamiento de los recubrimientos en contacto con células se realizaron diferentes ensayos. Estos ensayos son necesarios para determinar la idoneidad del recubrimiento para su uso como material biomédico. Los ensayos *in vitro* han sido realizados en el grupo de Biomateriales del Departamento de Nanomateriales y Biomateriales Poliméricos ICTP (CSIC), dirigido por Julio San Román, participante del proyecto INNFACTO en cuyo marco se ha desarrollado la presente tesis.

Todos los materiales deben ser esterilizados previamente al cultivo celular. Para ello, los materiales se disponen sobre una superficie estéril y se exponen a radiación UV durante 30 minutos por cada una de sus caras.

En todos los casos se ha utilizado como línea celular fibroblastos humanos (FBH, fibroblastos humanos de epidermis, INNOPROT) y en algunos casos se utilizó también la línea celular de osteosarcoma de ratón MG-63.

Los FBH son fibroblastos de epidermis sanos extraídos de epidermis humana y totalmente estabilizados. La línea celular MG63 es una línea estable de osteosarcoma, es decir, tumoral. Esta línea está también totalmente estabilizada y se trata de células cuyo homólogo sano sería el osteoblasto. Mediante la utilización de estos dos tipos de líneas celulares se estudiará la reacción a los materiales de una célula sana poco especializada, como es el FBH y una célula más específica de la aplicación que es el la MG63, cuyo uso está muy generalizado en los test *in vitro* de estudios biológicos relacionados con el tejido óseo.

3.7.1. Medida de la viabilidad celular utilizando el ensayo de MTT (ensayo indirecto).

El ensayo de citotoxicidad se ha realizado mediante la metodología escrita en la norma ISO 10993, 2000-2009 de viabilidad celular, concretamente la ISO 10993-5. Este método se usa para estudiar el efecto de las posibles sustancias citotóxicas que el biomaterial pueda liberar cuando está en contacto con medio de

cultivo celular fresco, por ejemplo, productos de degradación, monómero residual, etc. durante 1, 3, 7, 14 y 21 días.

El reactivo MTT [(3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difeniltetrazolium)], es transformado a azul formazán por la deshidrogenasa mitocondrial²³, tal y como se muestra en la figura 2.14. Esta enzima solamente está presente en células vivas, por tanto el color azul que aparece es proporcional al nº de células viables.

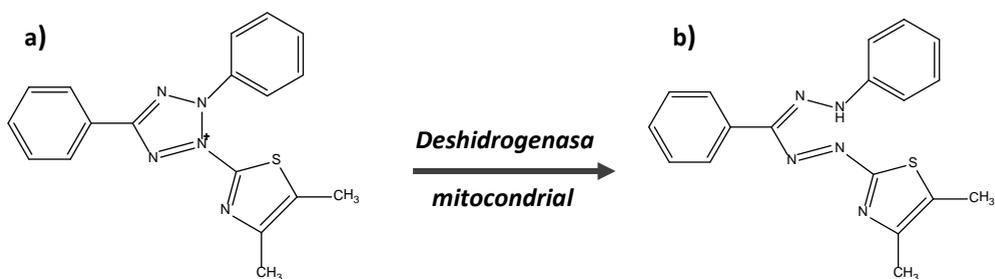


Figura 2.14: Reducción del reactivo MTT (a) a azul formazán (b) mediante la enzima deshidrogenasa mitocondrial.

Los discos de Titanio control y recubiertos (esterilizados) se colocan en una placa de 96 pocillos para la siembra de células y se deja la placa a 37°C en agitación. Tras esto se comienza con el protocolo del ensayo para finalmente leer la absorbancia a 570 nm, que como se ha comentado es proporcional al número de células viables en la superficie de los discos.

Una vez realizada la lectura, a los valores de absorbancia recogidos se les restan los valores obtenidos para el blanco y se relativizan con respecto a los medidos para el control negativo, TMX, a partir de la ecuación 2.2:

$$\%TMS = \frac{DO_S - DO_B}{DO_C} \times 100 \quad (\text{Ec. 2.2})$$

Donde, DO_S , DO_B y DO_C son las medidas de densidad óptica de la muestra, el blanco (MEM introducido en pocillos sin células) y el control, respectivamente. Posteriormente se realiza una serie de análisis de la varianza (ANOVA) con el fin de comparar los resultados obtenidos para las formulaciones problema con respecto a este control.

3.7.2. Medida de la adhesión y proliferación celular utilizando el ensayo de Alamar Blue.

Este método se usa para evaluar la capacidad de adhesión y proliferación celular sobre las superficies de interés mediante el empleo del reactivo Alamar Blue, indicador redox que cambia de color como consecuencia del metabolismo celular. Este reactivo puede ser retirado y reemplazado con medio fresco lo que permite monitorizar la proliferación celular a distintos tiempos: 1, 3, 7, 14 y 21 días.

En esta técnica, el ingrediente activo es la resazurina, un compuesto no tóxico, permeable a las células y de color azul. Al entrar en contacto con las células, resazurina se reduce a resorufina, que produce fluorescencia roja muy brillante. Sólo las células viables realizan esta reducción, pudiendo obtenerse, de este modo, una medida cuantitativa de la viabilidad celular (figura 2.15). Además, el ensayo de Alamar Blue no produce lisis celular, lo que permite seguir en el tiempo la cinética de crecimiento de una misma muestra de células.



Figura 2.15: Estudio de la adhesión y proliferación celular mediante la técnica de Alamar Blue.

En este caso, las células se sembraron a una densidad de 60.000 células/ml sobre el sustrato, en una placa de cultivo de 24 pocillos durante 24 h. Tras eso, 1 ml de colorante azul de Alamar Blue se añadió a cada muestra (solución al 10% de AB en rojo fenol libre DMEM). Después de 4 h de incubación, 100 µl de medio de cultivo de cada muestra de ensayo se transfirieron a una placa de 96 pocillos, y la emisión de fluorescencia se midió a en un Biotek Synergy HT, a una longitud de onda de 590 nm.

3.7.3. Determinación de la actividad antibacteriana de los materiales.

La determinación de la actividad antibacteriana de los distintos materiales se llevó a cabo mediante una metodología descrita en la norma ISO 22196:2007(E) frente a bacterias *Staphylococcus aureus* CECT 86.

1. Determinación del número viable de bacterias

El número viable de bacterias expresados como UCF/cm² (donde UCF se refiere a unidades formadoras de colonias), presente en cada muestra después de su incubación se obtiene según el procedimiento descrito en la norma ISO 22196:2007(E) mediante la ecuación 2.3:

$$N = \frac{(100 \times C \times D \times V)}{A} \quad (\text{Ec. 2.3})$$

Donde:

N es el número de UFC recuperadas por cm² y por muestra

C es el número de UFC contadas por placa

D es el factor de dilución de cada placa

V es el volumen, en mL, del inóculo añadido a cada muestra

A es el área, en mm², de la muestra.

2. Cálculo de la actividad antibacteriana

El valor de la actividad antibacteriana se calcula según el procedimiento descrito en la norma ISO 22196:2007(E) mediante la ecuación 2.4:

$$R = (U_t - U_0) - (A_t - U_0) = U_t - A_t \quad (\text{Ec. 2.4})$$

Donde:

R es la actividad antibacteriana

*U*₀ es el promedio del logaritmo del número de UFC (*N*) recuperadas de la muestra control a tiempo cero (*COh*).

*U*_t es el promedio del logaritmo del número de UFC (*N*) recuperadas de la muestra control tras 24 horas de incubación.

*A*_t es el promedio del logaritmo del número de UFC (*N*) recuperadas de la muestra a ensayar tras 24 horas de incubación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Desarrollo de recubrimientos híbridos bioactivos para implantes dentales. María Jesús Juan Díaz. Universidad del País Vasco.
2. Juan-Díaz, M. J., Martínez-Ibáñez, M., Lara-Sáez, I., da Silva, S., Izquierdo, R., Gurruchaga, M., & Suay, J. (2016). Development of hybrid sol-gel coatings for the improvement of metallic biomaterials performance. *Progress in Organic Coatings*.
3. Martínez-Ibáñez, M.; Development of osteoinductive Si-based coatings to improve dental implants' performance, Universidad del País Vasco, 2015.
4. Pham, G. D., Nguyen, X. P., Vu, D. H., Nguyen, N. T., Tran, V. H., Mai, T. T. T & Ba, T. C. (2011). Some biomedical applications of chitosan-based hybrid nanomaterials. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 2(4), 045004.
5. Goy, R. C., Britto, D. D., & Assis, O. B. (2009). A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros*, 19(3), 241-247.
6. Assadian, O. (2016). Octenidine dihydrochloride: chemical characteristics and antimicrobial properties. *Journal of wound care*, 25(Sup3), S3-S6.
7. Campoccia, D., Montanaro, L., & Arciola, C. R. (2013). A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces. *Biomaterials*, 34(34), 8533-8554.
8. Harke, H. P. (1989). [Octenidine dihydrochloride, properties of a new antimicrobial agent]. *Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin= International journal of hygiene and environmental medicine*, 188(1-2), 188-193.
9. Hübner, N. O., Siebert, J., & Kramer, A. (2010). Octenidine dihydrochloride, a modern antiseptic for skin, mucous membranes and wounds. *Skin pharmacology and physiology*, 23(5), 244-258.
10. Dettenkofer, M., Wilson, C., Gratwohl, A., Schmoor, C., Bertz, H., Frei, R., & Widmer, A. F. (2010). Skin disinfection with octenidine dihydrochloride for central

venous catheter site care: a double-blind, randomized, controlled trial. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(6), 600-606.

11. Obermeier, A., Schneider, J., Föhr, P., Wehner, S., Kühn, K. D., Stemberger, A., & Burgkart, R. (2015). In vitro evaluation of novel antimicrobial coatings for surgical sutures using octenidine. *BMC microbiology*, 15(1), 1.

12. McDonnell, G., & Russell, A. D. (2001). Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance. *Clinical microbiology reviews*, 14(1), 227.

13. Strydonck, D. A., Slot, D. E., Velden, U., & Weijden, F. (2012). Effect of a chlorhexidine mouthrinse on plaque, gingival inflammation and staining in gingivitis patients: a systematic review. *Journal of Clinical Periodontology*, 39(11), 1042-1055.

14. Supranoto, S. C., Slot, D. E., Addy, M., & Van der Weijden, G. A. (2015). The effect of chlorhexidine dentifrice or gel versus chlorhexidine mouthwash on plaque, gingivitis, bleeding and tooth discoloration: a systematic review. *International journal of dental hygiene*, 13(2), 83-92.

15. Jeon, H. J., Yi, S. C., & Oh, S. G. (2003). Preparation and antibacterial effects of Ag-SiO₂ thin films by sol-gel method. *Biomaterials*, 24(27), 4921-4928.

16. Stobie, N., Duffy, B., McCormack, D. E., Colreavy, J., Hidalgo, M., McHale, P., & Hinder, S. J. (2008). Prevention of Staphylococcus epidermidis biofilm formation using a low-temperature processed silver-doped phenyltriethoxysilane sol-gel coating. *Biomaterials*, 29(8), 963-969.

17. Jitianu, A., Britchi, A., Deleanu, C., Badescu, V., & Zaharescu, M. (2003). Comparative study of the sol-gel processes starting with different substituted Si-alkoxides. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 319(3), 263-279.

18. Lippmaa, E., Mägi, M., Samoson, A., Engelhardt, G., & Grimmer, A. R. (1980). Structural studies of silicates by solid-state high-resolution silicon-29 NMR. *Journal of the American Chemical Society*, 102(15), 4889-4893.

19. Wang, D., Romer, F., Connell, L., Walter, C., Saiz, E., Yue, S., Lee, P.D; McPhail, D.S; Hanna, J. V & Jones, J. R. (2015). Highly flexible silica/chitosan hybrid scaffolds with oriented pores for tissue regeneration. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(38), 7560-7576.
20. Ekgasit, S., Pattayakorn, N., Tongsakul, D., Thammacharoen, C., & Kongyou, T. (2007). A novel ATR FT-IR microspectroscopy technique for surface contamination analysis without interference of the substrate. *Analytical sciences*, 23(7), 863-868.
21. Shirosaki, Y., Tsuru, K., Hayakawa, S., Nakamura, Y., Gibson, I. R., & Osaka, A. (2011). Effects of Si (IV) Released from Chitosan-Silicate Hybrids on Proliferation and Differentiation of MG63 Osteoblast Cells. *Bioceram Dev Appl*,1, 1-4.
22. Reiner, T., Kababya, S., & Gotman, I. (2008). Protein incorporation within Ti scaffold for bone ingrowth using Sol-gel SiO₂ as a slow release carrier. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19(2), 583-589.
23. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1), 55-63.

Capítulo 3

Recubrimientos con incorporación de quitosano como agente antibacteriano

CAPÍTULO 3

RECUBRIMIENTOS CON INCORPORACIÓN DE QUITOSANO COMO AGENTE ANTIBACTERIANO.

1. Introducción.....	97
2. Síntesis de los recubrimientos quitosano-[MTMOS-GPTMS].....	99
3. Resultados 50M-50G + % quitosano.....	102
3.1. Ensayo de adherencia.....	102
3.2. Caracterización química.....	103
3.2.1. Resonancia Magnética Nuclear del átomo de Silicio (^{29}Si -RMN).....	104
3.2.2. Resonancia Magnética Nuclear del átomo de Carbono (^{13}C -RMN)....	110
3.2.3. Espectroscopia infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR).....	112
3.3. Determinación del grado de hidrofilia/hidrofobia.....	115
3.4. Ensayo de degradación hidrolítica.....	117
3.5. Ensayo de liberación de Si (ICP).....	118
3.6. Estudios <i>in vitro</i>	119
3.6.1. Medida de la viabilidad celular utilizando el ensayo de MTT.....	121
3.6.2. Medida de la adhesión y proliferación celular (ALAMAR BLUE).....	121
3.6.3. Determinación de la actividad antibacteriana de los materiales.....	127
4. Resultados 80M-20G + 5% de quitosano.....	128
4.1. Ensayo de adherencia.....	128
4.2. Caracterización química.....	129

4.2.1. Resonancia Magnética Nuclear del átomo de Silicio (^{29}Si -RMN).....	129
4.2.2. Espectroscopia infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR).....	132
4.3. Determinación del grado de hidrofilia/hidrofobia.....	133
4.4. Ensayo de degradación hidrolítica.....	134
4.5. Ensayo de liberación de Si (ICP).....	136
4.6. Estudios <i>in vitro</i>	137
4.6.1. Medida de la viabilidad celular utilizando el ensayo de MTT.....	137
4.6.2. Medida de la adhesión y proliferación celular (ALAMAR BLUE).....	138
4.6.3. Determinación de la actividad antibacteriana de los materiales.....	139
5. Síntesis de los recubrimientos quitosano-[MTMOS-GPTMS-TEOS].....	141
6. Resultados quitosano-[MTMOS-GPTMS-TEOS].....	142
6.1. Ensayo de adherencia.....	142
6.2. Caracterización química.....	143
6.2.1. Resonancia Magnética Nuclear del átomo de Silicio (^{29}Si -RMN).....	143
6.2.2. Espectroscopia infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR).....	150
6.3. Determinación del grado de hidrofilia/hidrofobia.....	151
6.4. Ensayo de degradación hidrolítica.....	152
6.5. Ensayo de liberación de Si (ICP).....	153
6.6. Ensayos <i>in vitro</i>	154
6.6.1. Medida de la viabilidad celular utilizando el ensayo de MTT.....	154
6.6.2. Medida de la adhesión y proliferación celular (ALAMAR BLUE).....	156
6.6.3. Determinación de la actividad antibacteriana de los materiales.....	157

7. Conclusiones.....158

Bibliografía.....159

1. INTRODUCCIÓN

Como se ha explicado anteriormente, el quitosano es un polímero policatiónico derivado de la desacetilación de la quitina, que posee una estructura y propiedades específicas, como son su alta biocompatibilidad, biodegradabilidad y carácter antibacteriano^{1,2}. La característica más atractiva para el presente trabajo, es su capacidad de inhibición del crecimiento de un amplio rango de bacterias sobre la superficie en la que se encuentre¹; de ahí el gran interés que ha despertado en estos últimos años para aplicaciones biomédicas. El mecanismo de actuación del quitosano se basa en su carácter policatiónico, que posibilitará su interacción con las membranas celulares de las bacterias, cargadas negativamente. Como resultado de esta interacción se alterará la permeabilidad de la membrana, o bien se alterará la integridad de la misma, causando en ambos casos la muerte bacteriana³.

La capacidad antibacteriana de este polímero se ha estudiado desde el punto de vista tanto de la acción bactericida como bacteriostática¹. La acción bactericida se define como la capacidad de erradicar bacterias de una superficie una vez formado el film, causando la muerte de las mismas mientras que la acción bacteriostática se define como la capacidad de evitar la colonización bacteriana sobre la superficie en cuestión.

La colonización bacteriana de una superficie, da lugar a un biofilm microbiano, y una vez formado, es muy difícil de erradicar debido a la matriz de polisacáridos que secretan las bacterias, y que las protege de la acción de los antibióticos^{4,5}. Por ello, uno de los mayores retos en el campo de la implantología, es impedir la adhesión de los microorganismos y evitar de este modo las infecciones bacterianas⁶ (figura 3.1).

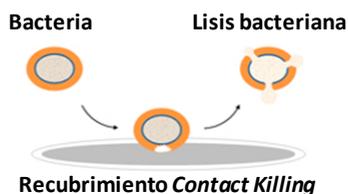


Figura 3.1: Mecanismo de actuación de una superficie que impide la adhesión bacteriana (Rensselaer/Ravindra C.Pangule).

Así, el objetivo de este capítulo es la obtención de recubrimientos capaces de impedir la reproducción de las bacterias sobre la superficie del implante. Para ello, se plantea el desarrollo de un recubrimiento que incorpore quitosano y que tenga un tiempo de degradación muy lento, y así actúe el mayor tiempo posible evitando la adhesión bacteriana que da lugar a la formación del biofilm.

Para conseguir este objetivo, se han propuesto y caracterizado dos tipos de formulaciones, partiendo del precursor MTMOS y del precursor GPTMS. El MTMOS aportará una alta biocompatibilidad y una baja biodegradabilidad y el GPTMS, la posibilidad de funcionalización que ofrece a través del grupo oxirano de su estructura, posibilitando tal y como se ha encontrado en estudios previos, la unión covalente con los grupos amino que contiene el quitosano en su estructura^{7, 8}. De esta forma, se favorecerá el anclaje de esta molécula a la red y se evitará su rápida salida al exterior. Así, se desarrollarán recubrimientos con diferentes proporciones tanto de los precursores MTMOS, GPTMS como de quitosano.

Tal y como se ha explicado anteriormente, el ácido ortosilícico que liberan estos recubrimientos tiene un efecto osteoinductor promoviendo la formación del tejido óseo⁹. Dado que uno de los objetivos de este trabajo también es promover la formación de hueso alrededor del implante, o al menos no alterar el proceso de osteointegración, se pretende mejorar el comportamiento de este recubrimiento en ese aspecto. Para este objetivo, se propone también desarrollar recubrimientos con una mayor velocidad de degradación. Una de las vías para conseguir que los recubrimientos aumenten su degradabilidad es incrementando su capacidad de absorción de agua, es decir, aumentando la hidrofilia de los mismos. Para ello, se incorporará un tercer precursor a la formulación, como es el TEOS¹⁰.

En la tabla 3.1 se resumen las formulaciones desarrolladas con quitosano junto con la nomenclatura que se utilizará de aquí en adelante.

Tabla 3.1. Proporciones de quitosano utilizadas y nomenclatura de las muestras.

NOMENCLATURA	%MTMOS	%GPTMS	%TEOS	%QUITOSANO
50M-50G				0%
50M-50G (1%Q)				1%
50M-50G (2%Q)	50	50	0	2%
50M-50G (5%Q)				5%
50M-50G (10%)				10%

80M-20G				0%
80M-20G (5%Q)	80	20	0	5%
35M-35G-30T				0%
35M-35G-30T (5%Q)	35	35	30	5%
45M-45G-10T				0%
45M-45G-10T (5%Q)	45	45	10	5%

Se fijarán los parámetros de síntesis mediante la técnica ^{29}Si -RMN en estado líquido y seguidamente se caracterizará la red formada tras el tratamiento térmico por ^{29}Si -RMN en estado sólido y FT-IR.

Para conocer el comportamiento de los recubrimientos en medio acuoso se determinará la hidrofilia de cada recubrimiento mediante medidas de ángulo de contacto y se realizarán ensayos de degradación hidrolítica y liberación de ácido ortosilícico.

Por último, para evaluar la adecuación de estos materiales a aplicaciones biomédicas se realizan estudios *in vitro* que incluyen ensayos de citotoxicidad, adhesión y proliferación, y ensayos bactericidas/bacteriostáticos para demostrar el efectivo poder antibacteriano de estos materiales.

2. SÍNTESIS DE LOS RECUBRIMIENTOS QITOSANO-[MTMOS-GPTMS]

En primer lugar, se ha sintetizado una familia de recubrimientos híbridos orgánico-inorgánicos, partiendo de los precursores MTMOS y GPTMS, en una relación molar 50MTMOS-50GPTMS (50M-50G). Se parte de este sistema para su estudio con diferentes porcentajes de quitosano y finalmente se elegirá un porcentaje de quitosano óptimo para desarrollar la serie de recubrimientos antibacterianos de larga permanencia.

La elección del sistema 50M-50G, se debe a que ya ha sido estudiado con anterioridad en este grupo de investigación^{11, 12}, obteniéndose buenos resultados en cuanto a caracterización química y morfológica, estudios de degradación y liberación de silicio, y en estudios *in vitro*. Este recubrimiento es capaz de inducir la actividad de las células madre mesenquimales (AMSCs), tanto en su proliferación como en su diferenciación, mediante la obtención de una topografía adecuada para este

comportamiento, mejorando además significativamente la proliferación de las AMSCs con el aumento de GPTMS (figura 3.2). Además, en el estudio de diferenciación de las AMSCs a osteoblastos se observó como la adición de GPTMS inducía la diferenciación, al producirse una mayor secreción de matriz extracelular mineralizada de las células dispuestas sobre los recubrimientos con contenido de GPTMS. Por este motivo, este sistema fue seleccionado para un estudio *in vivo* donde se demostró que es totalmente biocompatible.

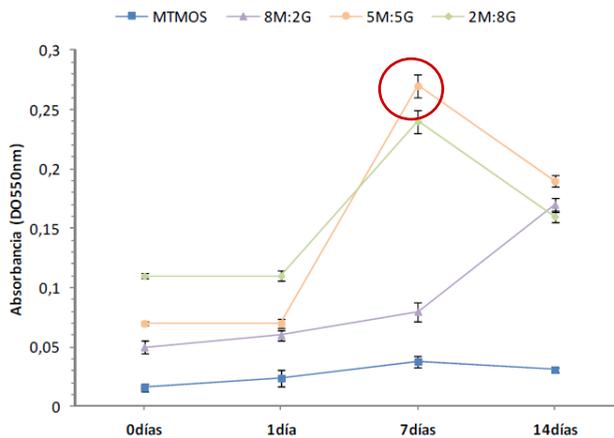


Figura 3.2: Proliferación de las AMSCs sobre recubrimientos con variación del grado de funcionalidad, introducido por el GPTMS^{11, 12}.

Por todos estos motivos se elige el 50MTMOS-50GPTMS como sistema base de partida para la incorporación de quitosano como agente antibacteriano y desarrollar así recubrimientos de larga permanencia.

Teniendo en cuenta que la larga permanencia de estos materiales sobre el implante es de gran importancia como prevención a la adhesión bacteriana, se decide disminuir el porcentaje de GPTMS de los recubrimientos para intentar disminuir de este modo, la cinética de degradación. Por este motivo, además del sistema 50M-50G, se va a estudiar también el sistema con una relación molar 80MTMOS-20GPTMS.

Para sintetizar estos recubrimientos, hubo que modificar algunos aspectos del proceso de síntesis descrito en el capítulo 2 (Materiales y Técnicas experimentales). En este caso, la síntesis de los sistemas base se realiza tal y como se

explica en dicho capítulo, pero la incorporación de quitosano, varió el método de síntesis seguido.

La incorporación de quitosano lleva consigo la adición de una etapa de prehidrólisis previa a la síntesis, entre el precursor GPTMS y el quitosano. De este modo se pretende favorecer la unión covalente mencionada con anterioridad.

Para ello se disuelve el quitosano en ácido acético, diluido al 2% en peso, durante 24 horas. A las 22 horas, se añade la cantidad correspondiente del precursor GPTMS, y la mezcla se deja agitando (500 rpm) durante dos horas más, con objeto de favorecer la unión covalente entre ambos. Cuando esta mezcla lleva una hora en agitación, se comienza la síntesis sol-gel del precursor MTMOS en un vial aparte, con agitación constante de 300 rpm, y tras la etapa de agitación correspondiente, se añade ésta sobre la mezcla GPTMS-quitosano y se deja agitar, a 500 rpm, durante 90 min más antes de la etapa de curado (Figura 3.3).

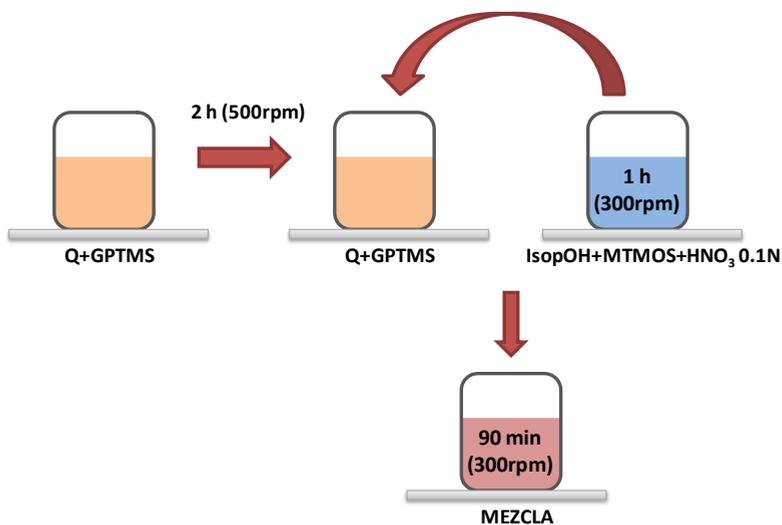


Figura 3.3: Representación esquemática de la síntesis de los sistemas con quitosano.

En todos los casos, tanto en los sistemas sin quitosano, como en aquellos que lo incorporan, tras finalizar las etapas de la síntesis sol-gel, el sol se deposita sobre el sustrato mediante la técnica de deposición elegida en cada caso y se le somete al material a un tratamiento térmico de curado donde ocurren las reacciones de condensación de los grupos silanol, y la evaporación del isopropanol residual, así como la de los posibles productos de reacción, dando lugar a una red

entrecruzada y obteniéndose una película densa y seca. El tratamiento de curado es el mismo tanto para la formulación base como para las formulaciones que incorporan quitosano, y consiste en una isoterma a 100°C durante dos horas.

Los porcentajes de quitosano elegidos para el estudio del sistema 50M-50G varían en un amplio rango y son 1%, 2%, 5% y 10% de quitosano en peso respecto a los precursores. La formulación 80M-20G sólo se estudió con un 5% de quitosano tal y como se explicará más adelante.

En los apartados siguientes se relatan los resultados obtenidos para las formulaciones 50M-50G y 80M-20G, en cuanto a la caracterización morfológica y ensayos de adhesión, caracterización químico-física y estudios *in vitro*.

3. RESULTADOS 50M-50G + % quitosano

3.1. Ensayo de adherencia

Los recubrimientos obtenidos presentan buenas propiedades superficiales, en cuanto a homogeneidad, ausencia de grietas y alta transparencia, lo que indica que no hay separación de fases tras el método de síntesis seguido. En la figura 3.4 se observa el acabado brillante y uniforme de los recubrimientos.

Puesto que visualmente no se observaron diferencias entre ellos, solamente se muestran las imágenes del recubrimiento 50M-50G base y el 50M-50G con un 5% de quitosano.



Figura 3.4: Placas de acero recubierta con el sistema 50M-50G base y con quitosano.

Para evaluar la adhesión de los recubrimientos sobre el sustrato, se utilizó el ensayo típico de adhesión de corte por enrejado. Para ello, se recubren mediante la técnica *flow-coating*, placas de acero 316L previamente lijadas en las cuatro direcciones (para favorecer la adhesión del recubrimiento).

Tras la realización del ensayo, las placas metálicas se observan en el microscopio óptico, tal y como se aprecia en la figura 3.5. En todos los casos, el desprendimiento del material es 0, es decir, en ningún caso se observa desprendimiento de los recubrimientos, por lo que se puede decir que se obtiene una buena adhesión sobre sustrato metálico (figura 3.5).

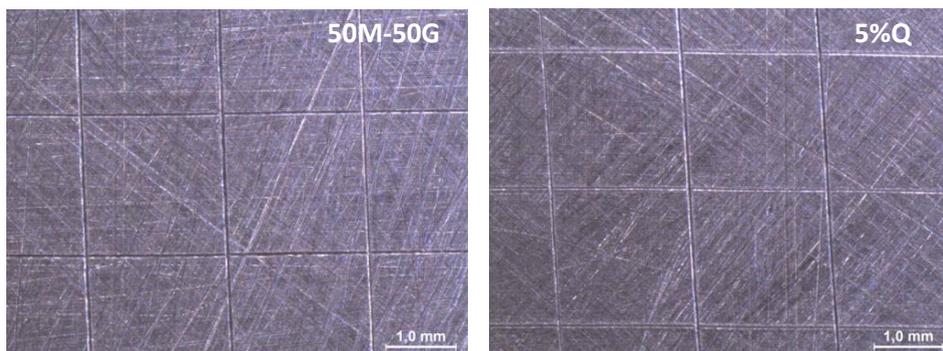


Figura 3.5: Ensayo de corte por enrejado para el sistema 50M-50G base y con un 5% de quitosano a un aumento de x2.0.

3.2. Caracterización química

La caracterización química de los materiales obtenidos se lleva a cabo mediante varias técnicas diferentes, cada una de las cuales aporta información de las diferentes etapas por las que transcurre la obtención del material.

Las técnicas utilizadas son la Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR) y la Resonancia Magnética Nuclear del átomo de silicio (^{29}Si RMN), en estado líquido y sólido, así como del átomo de carbono (^{13}C RMN), únicamente en estado sólido.

3.2.1. Resonancia Magnética Nuclear del átomo de Silicio (^{29}Si -RMN)

El estudio de los diferentes sistemas híbridos mediante RMN, comienza por la obtención del espectro correspondiente a la mezcla de los dos precursores en el disolvente.

En el caso del sistema base, tras la adquisición de este espectro, se añade al tubo el agua ácida (denominando a este espectro tiempo cero) para que comience la hidrólisis y condensación de los precursores y se van obteniendo los espectros a cada hora de reacción, hasta las 2 h (tras lo cual se procede a la etapa de curado). A continuación, en la figura 3.6, se muestran los espectros correspondientes al sistema 50M-50G base.

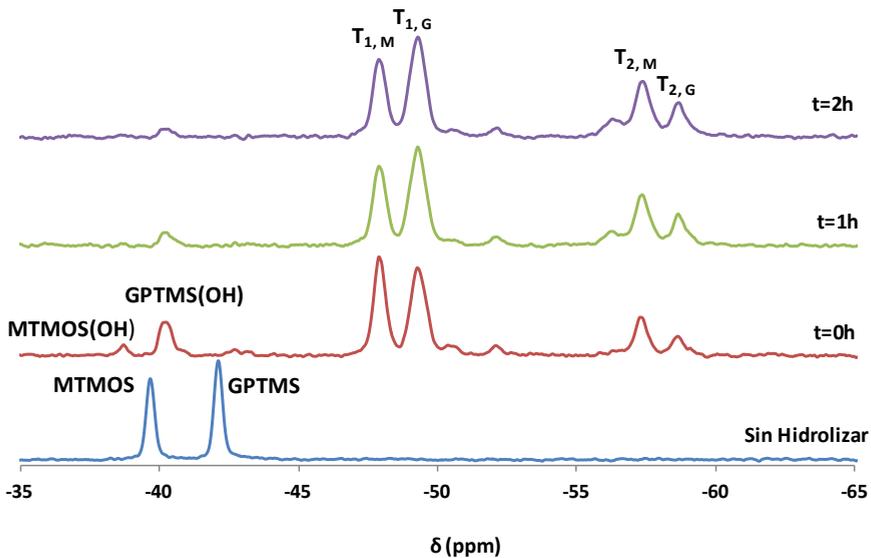


Figura 3.6: Espectro obtenido mediante ^{29}Si -RMN de líquidos para el sistema 50M-50G base.

En el espectro de la mezcla sin hidrolizar de los precursores MTMOS y GPTMS aparecen las dos señales correspondientes a la posición base de los mismos: a -40 ppm la del MTMOS y a -42 ppm la del GPTMS. Tras la adición del agua ácida, se adquiere el espectro a t=0h y se observa que aparecen señales asociadas a la hidrólisis y condensación de los precursores, que en el caso del MTMOS son las especies condensadas T_1 y T_2 . Además, a t=0h se encuentra también la señal de la especie hidrolizada MTMOS (OH).

A partir de la primera hora de reacción, se observa como ésta desaparece, y la de las especies T_1 disminuye a la vez que aumenta la correspondiente a las especies T_2 . La variación de las señales a $t=1h$ a $t=2h$ es muy pequeña lo que indica que en una hora desde la adición del agua ácida se dan la mayoría de las reacciones de condensación de este precursor obteniéndose las especies condensadas T_1 , T_2 (la más abundante) para el MTMOS.

En el caso del GPTMS, tras la adición del agua ácida desaparece la señal correspondiente al precursor, y aparecen la señal de la especie hidrolizada GPTMS(OH) y las asociadas a las especies condensadas T_1 y T_2 , que van cambiando en intensidad según avanza la reacción. A $t=1h$ se observa que la intensidad de la señal correspondiente a las especies hidrolizadas disminuye considerablemente hasta $t=2h$, mientras que las señales de las especies condensadas aumentan.

El hecho de que tras dos horas desde la adición del agua ácida se sigan observando las señales correspondientes a las especies hidrolizadas del GPTMS indica que las reacciones de condensación están de algún modo impedidas, posiblemente debido al impedimento estérico creado por el gran tamaño de su grupo no hidrolizable, glicidoxipropilo.

En el caso del sistema 50M-50G con diferentes porcentajes de quitosano, se han obtenido espectros en las diferentes etapas de las que se compone la síntesis. Por un lado, la etapa de prehidrólisis del quitosano y el GPTMS que tiene lugar durante dos horas (figura 3.7), por otro lado, la síntesis sol-gel con el precursor MTMOS que se deja una hora en agitación (figura 3.8), y por último la mezcla final (quitosano + GPTMS + sol gel) que se mantiene 90 minutos en agitación constante antes de procederse a la deposición sobre el sustrato elegido (figura 3.9). Se obtendrán así tres espectros, cada uno de ellos correspondiente a las diferentes etapas de la síntesis.

Debido a la alta viscosidad del quitosano, y al pequeño diámetro del tubo de RMN en el que se debería de realizar la síntesis, todas las etapas se llevan a cabo en viales separados, excepto la síntesis sol-gel con el MTMOS que sí se realiza en el tubo de RMN.

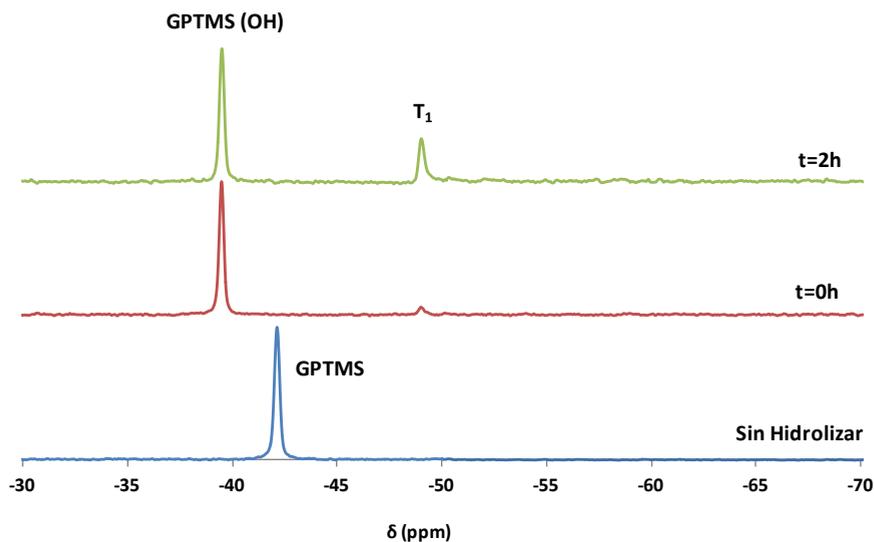


Figura 3.7: Espectro obtenido mediante ^{29}Si -RMN de líquidos para el precursor GPTMS en ácido acético con un 5% de quitosano.

En esta figura (figura 3.7) se observan los espectros obtenidos tanto para el precursor GPTMS antes de añadirlo a la disolución de quitosano como tras su adición, para comprobar que el ácido acético en el que está disuelto el quitosano es suficiente para comenzar a hidrolizar este precursor.

En el espectro del GPTMS sin hidrolizar, aparece solamente una señal a -42 ppm (posición base del precursor). Tras añadir la cantidad correspondiente de GPTMS sobre la disolución de quitosano ($t=0\text{h}$) se observan dos señales. La señal a -39 ppm que se asocia a la especie hidrolizada GPTMS(OH), y una pequeña señal a -49 ppm que se corresponde con la especie condensada T_1 que aumenta significativamente en la segunda hora de reacción, momento en el que se le añade a esta mezcla la síntesis sol-gel del precursor MTMOS.

Durante las dos horas de reacción la señal de las especies hidrolizadas no desaparece e incluso, no disminuye en intensidad, lo que se atribuye a que el quitosano es una molécula muy voluminosa que dificulta, debido al impedimento estérico que supone, que los grupos silanoles puedan unirse entre ellos y condensar para dar lugar a especies con mayor grado de condensación. Sin embargo y en cualquier caso, se puede deducir que el ácido acético no sólo ha servido para facilitar

la hidrólisis del GPTMS sino que debido a ésta hidrólisis, también podría servir para favorecer la unión covalente entre el quitosano y el GPTMS.

Tras esto, se procede a la adquisición del espectro del MTMOS (síntesis llevada a cabo en el propio tubo de RMN), que se muestra en la figura 3.8. Se registra en primer lugar el espectro del MTMOS sin hidrolizar para a continuación añadir el catalizador y proceder a la adquisición del espectro en ese mismo momento ($t=0h$). Por último se registra el espectro a la hora de reacción, momento en el que esta disolución se añade sobre la mezcla Q+GPTMS.

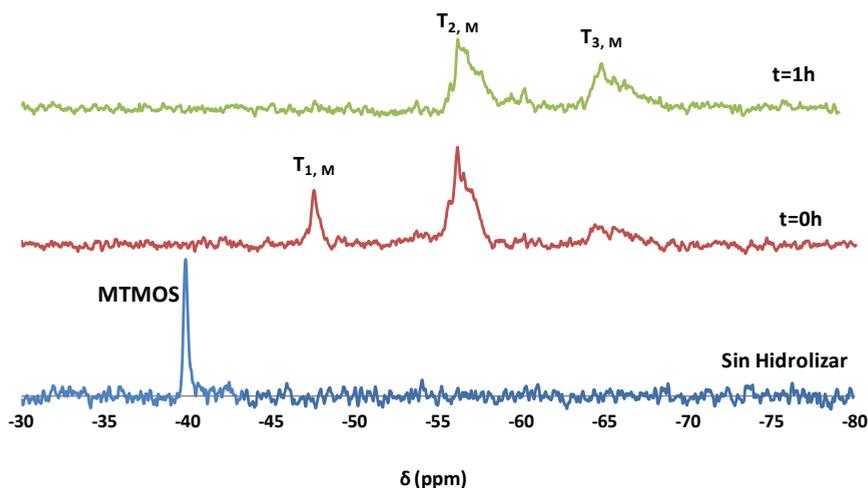


Figura 3.8: Espectro obtenido mediante ^{29}Si -RMN de líquidos para el precursor MTMOS en medio ácido.

Como se observa en la figura 3.8, en el primer espectro aparece la señal del precursor MTMOS (-40 ppm) antes de añadir el catalizador y tras su adición se observa en los siguientes espectros la aparición de las bandas correspondientes a las especies condensadas T_1 y T_2 a -47 ppm y -57 ppm, respectivamente, llegando incluso a la aparición de bandas correspondientes a las especies de mayor grado de condensación T_3 que aumentan en intensidad en el espectro correspondiente a una hora de reacción. Esto indica que la reacción se da sin impedimentos, y que ya durante la primera hora de reacción se va formando la red, desapareciendo la señal del precursor y apareciendo las correspondientes a las especies condensadas. La señal T_3 del MTMOS no se observaba en el espectro del sistema 50M-50G base debido al gran impedimento estérico que ejerce el grupo glicidoxipropilo del GPTMS.

Por último se realiza el espectro de RMN de la mezcla final después de 90 min (figura 3.9), es decir la que lleva todos los componentes Q+GPTMS+MTMOS. En este espectro se comprueba que al mezclar ambos componentes se produce la reacción de formación de la red polisiloxánica.

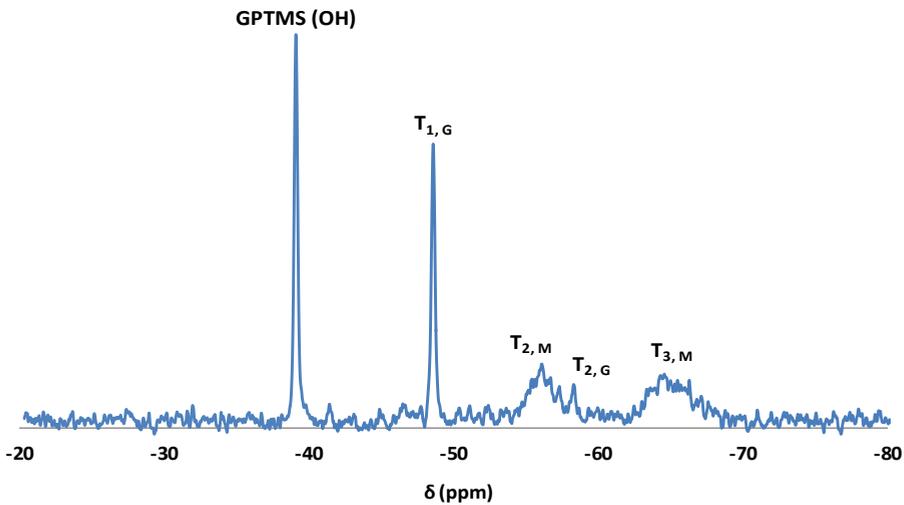


Figura 3.9: Espectro obtenido mediante ^{29}Si -RMN de líquidos para la reacción sol-gel final tras 90 minutos de agitación.

Como se puede observar en la figura 3.9, tras 90 minutos de agitación (antes de la etapa de curado), la reacción sigue adelante sin impedimentos, obteniéndose una mayor cantidad de especies condensadas T_1 para el GPTMS. A pesar de que siguen coexistiendo en la red grupos hidrolizados del precursor GPTMS, y una gran cantidad de especies $T_{1,G}$, y a pesar del ruido del espectro, se observa una pequeña señal a -58 ppm que podría deberse a la señal T_2 de este mismo precursor, indicando que la reacción ha avanzado durante esos 90 minutos.

De nuevo, tal y como se ha comentado anteriormente, el hecho de que las especies hidrolizadas no desaparezcan y de que la cinética de reacción sea más lenta, se debe al tamaño de la molécula de quitosano que ejerce un importante impedimento estérico, y hace que los grupos silanoles del precursor GPTMS necesiten más tiempo para unirse entre ellos y condensar formando la red.

En cuanto al precursor MTMOS se observa que permanecen las señales de las especies más condensadas T_2 y T_3 , que ya se apreciaban en el espectro de su

síntesis a una hora de reacción. En cualquier caso se observa un avance de la condensación.

Para el estudio de la red formada tras la etapa de curado se utiliza la técnica de ^{29}Si -RMN en estado sólido. En la figura 3.10 se pueden observar los espectros correspondientes a los diferentes recubrimientos híbridos una vez curados, con diferentes contenidos de quitosano.

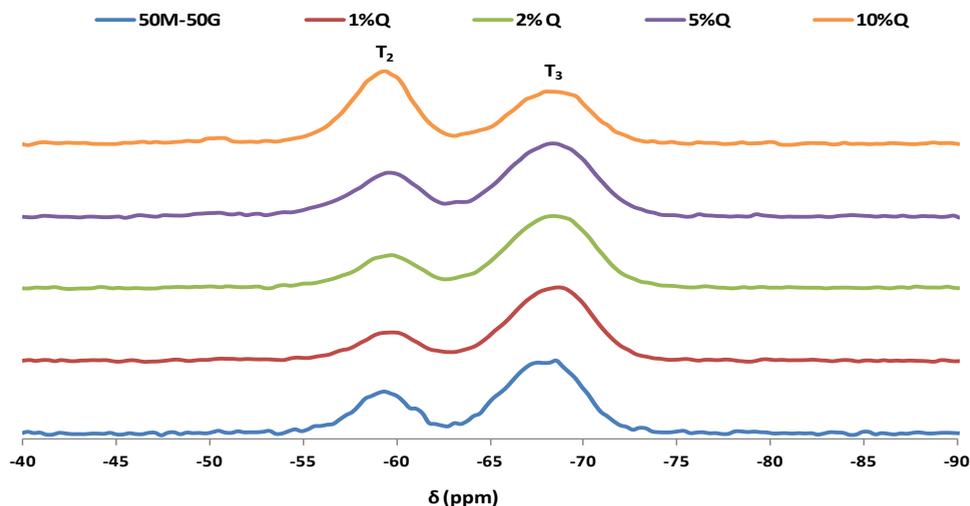


Figura 3.10: Espectro obtenido mediante ^{29}Si -RMN de sólidos para el sistema 50M-50G base y con diferentes porcentajes de quitosano.

La resolución de los picos en los espectros de RMN de sólidos es menor que en RMN en estado líquido y por ello aparecen solapadas las señales correspondientes al GPTMS y al MTMOS. Debido a esto, sólo se puede distinguir entre especies T_2 y T_3 .

Como se observa en el espectro, las especies predominantes tras el curado son las más condensadas, es decir, encontramos a -59 ppm la señal T_2 , y a un valor de -68 ppm la señal correspondiente a la especie T_3 que se corresponde con la especie más condensada, lo que sugiere una alta reticulación de la red polisiloxánica tras el curado puesto que T_3 significa que el átomo de Si está unido a otros tres átomos de Si por medio de puentes de oxígeno (formación de la red $-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-$).

El quitosano no afecta de una forma clara al grado de condensación de la red final obtenida, al menos hasta un porcentaje de un 5% de quitosano. Así, la señal T_3

es la más intensa del espectro en todos los casos excepto en el que tiene el mayor porcentaje de quitosano (10%), donde la intensidad de las señales está invertida.

3.2.2. Resonancia Magnética Nuclear del átomo de Carbono (^{13}C -RMN)

Por último, se procedió al estudio de la red final formada tras el tratamiento térmico por RMN de ^{13}C (figura 3.11) para intentar comprobar la posible unión covalente entre el quitosano y el precursor GPTMS (mediante la apertura del anillo epoxi de éste). Este estudio se realizó para todas las formulaciones de este capítulo, pero al obtenerse resultados muy similares se muestra únicamente el sistema 50M-50G con un porcentaje del 5% de quitosano, y además el espectro del recubrimiento base con fines comparativos.

En la figura 3.11 las señales que aparecen en los espectros están numeradas en función de la numeración de los carbonos de los precursores y se observan con claridad los picos correspondientes a todos ellos.

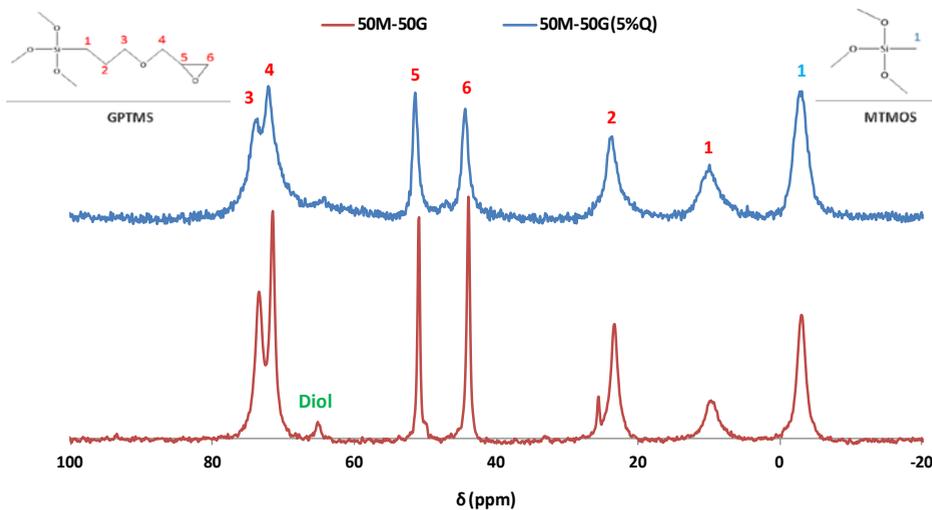


Figura 3.11: Espectro obtenido mediante ^{13}C -RMN de sólidos para el sistema 50M-50G base (rojo) y con 5% de quitosano (azul).

Al comparar ambos espectros, el 50M-50G base y el que contiene un 5% de quitosano, se observa en ambos la aparición de la señal del grupo metilo no hidrolizable del precursor MTMOS a -3 ppm. La señales 5 y 6, que aparecen a 51 y 44 ppm respectivamente, se corresponden con los carbonos que forman el anillo epoxi del GPTMS. Estas señales disminuyen en intensidad de manera significativa en

comparación con la señal 1, cuando se introduce quitosano en el recubrimiento lo que podría indicar la unión covalente entre el grupo epoxi de este precursor y el grupo amino de la molécula de quitosano¹³.

Además, alrededor de los 65 ppm se observa una banda de baja intensidad atribuida a los carbonos de un grupo diol. Este se forma como consecuencia de la apertura del anillo epoxi tras la hidrólisis del GPTMS¹⁴ según el mecanismo esquematizado en la figura 3.12. Sin embargo, en el espectro que incorpora quitosano (figura 3.11), esta señal disminuye, lo que se atribuye a que el quitosano se une al GPTMS mediante los carbonos de su grupo oxirano, provocando una menor apertura de éste para formar menor cantidad de grupos diol.

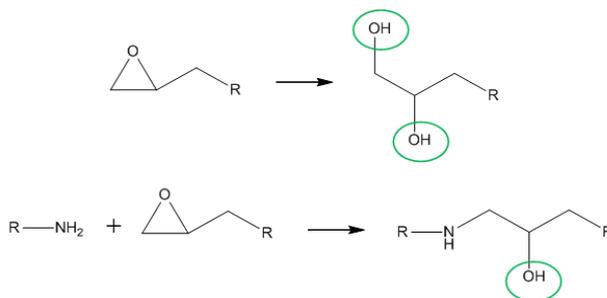


Figura 3.12: Apertura del anillo epoxi del precursor GPTMS, y posible unión con el grupo amino de la molécula de quitosano.

Las señales 3 y 4 también se ven modificadas. La anchura de las mismas aumenta, su intensidad decrece y están menos definidas que en el caso del material base. Esto, de nuevo, puede ser un indicativo de la unión entre los grupos amino del quitosano y el anillo epoxi del GPTMS.

Además, en el espectro del sistema híbrido con quitosano (azul), se observa una pequeña señal a 47 ppm (marcada en naranja) que no se observa en el material base. En la bibliografía, se atribuye esta señal a la apertura de los grupos del anillo epoxi del GPTMS mediante ataque nucleofílico del grupo amino del quitosano². En cuanto a las señales propias del quitosano, dado el bajo % en el que se ha añadido no se observan en el espectro.

Por último, hay que añadir que no se observan señales a 49 ppm, que serían debidas a los grupos metoxi del GPTMS y MTMOS⁶. Esto que confirma la hidrólisis de todos los grupos tras el curado, tanto del GPTMS como del MTMOS.

3.2.3. Espectroscopia infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

Los materiales obtenidos tras el tratamiento térmico son caracterizados también mediante espectroscopia infrarroja. Se estudió la composición química de la serie de materiales MTMOS-GPTMS en función de los distintos % de quitosano adicionados. Las muestras para realizar este ensayo se obtuvieron en film libre después de aplicarles el tratamiento térmico descrito anteriormente. Posteriormente, se registraron los espectros mediante la técnica de transmisión y se realizaron medidas en el intervalo de $4000-500\text{ cm}^{-1}$.

Previamente a la caracterización de los diferentes recubrimientos, se estudió la estructura química del quitosano utilizado, con el fin de determinar sus principales señales de vibración, e identificarlos posteriormente en los espectros de los nuevos recubrimientos. El espectro se puede observar en la figura 3.13.

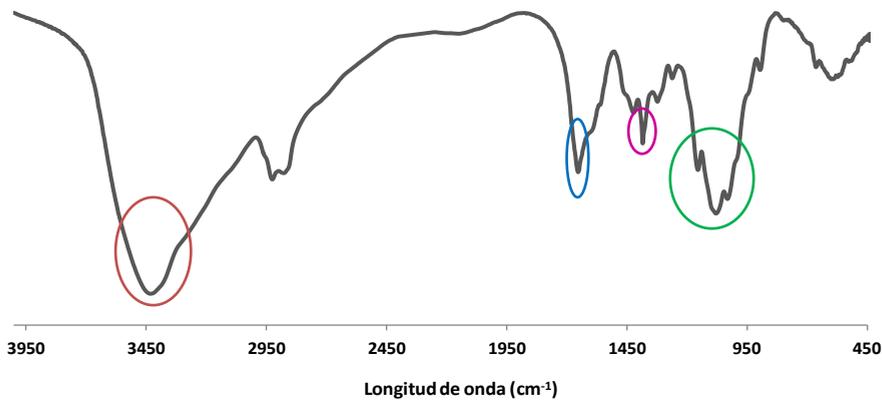


Figura 3.13: Espectro IR de la molécula de quitosano (Sigma Aldrich).

El espectro del quitosano se caracteriza por una ancha banda, marcada en color rojo, correspondiente al solapamiento de la banda de los grupos hidroxilo (-OH) con la banda de los grupos amino (-NH₂), a una longitud de onda de 3400 cm^{-1} . Esta banda es muy ancha e intensa debido a la gran cantidad de grupos (-OH) y (-NH₂), de la estructura del quitosano (figura 3.14)¹⁵.

Otra banda característica del espectro del quitosano es la banda a 1648 cm^{-1} , conocida también como banda de amida I (marcada en azul en la figura 3.13 y 3.14), que se debe a la vibración de tensión del grupo carbonilo de los grupos acetilo del quitosano. La intensidad de esta banda por lo tanto, será función del grado de

desacetilación que haya sufrido el quitosano (figura 3.14). El quitosano es una molécula obtenida a partir de la quitina, a través de la reacción de desacetilación de los grupos aceto de la misma, dando lugar a los grupos amino. En función del grado de desacetilación que sufra la molécula del quitosano, habrá una mayor o menor cantidad de grupos aceto en su estructura y por lo tanto, esta banda será más o menos intensa. El grado de desacetilación del quitosano utilizado en este trabajo es del 75%-85%, por lo que en su estructura habrá, tanto grupos amino propios del quitosano, como grupos aceto propios de la quitina.

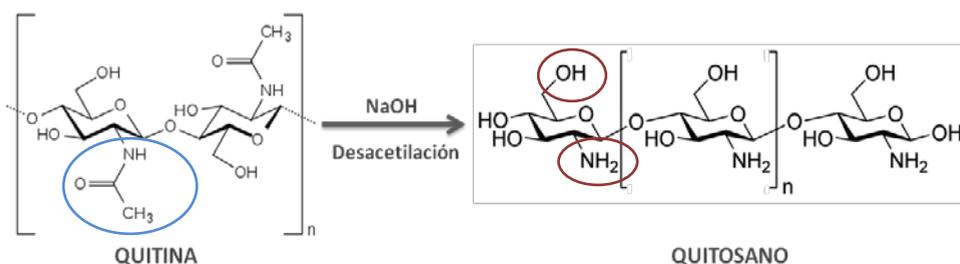


Figura 3.14: Obtención del quitosano a partir de la desacetilación de la quitina.

El pequeño hombro, que se observa a aproximadamente 1550 cm^{-1} , se corresponde con la vibración de tensión del grupo amino ($-\text{NH}_2$) de la estructura del quitosano. Adicionalmente, las bandas a 2920 cm^{-1} y 2875 cm^{-1} , corresponden a las vibraciones de tensión de los enlaces $-\text{CH}$ de los grupos $-(\text{CH}_2)$ y $-(\text{CH}_3)$ del polímero, respectivamente. Además, a 1314 cm^{-1} se aprecia la banda de amida III marcada en rosa en el espectro.

Finalmente, en el rango que va desde 1160 cm^{-1} a 1000 cm^{-1} (marcado en el verde), se pueden observar las bandas características de las vibraciones del enlace C-O-C, siendo la tensión asimétrica de dicho enlace la banda a 1160 cm^{-1} , y las localizadas a 1080 y 1030 cm^{-1} , las de mayor intensidad, correspondientes a las vibraciones de tensión del esqueleto C-O, características de la estructura de los polisacáridos¹⁶.

A continuación se muestran los espectros FTIR de los materiales híbridos obtenidos.

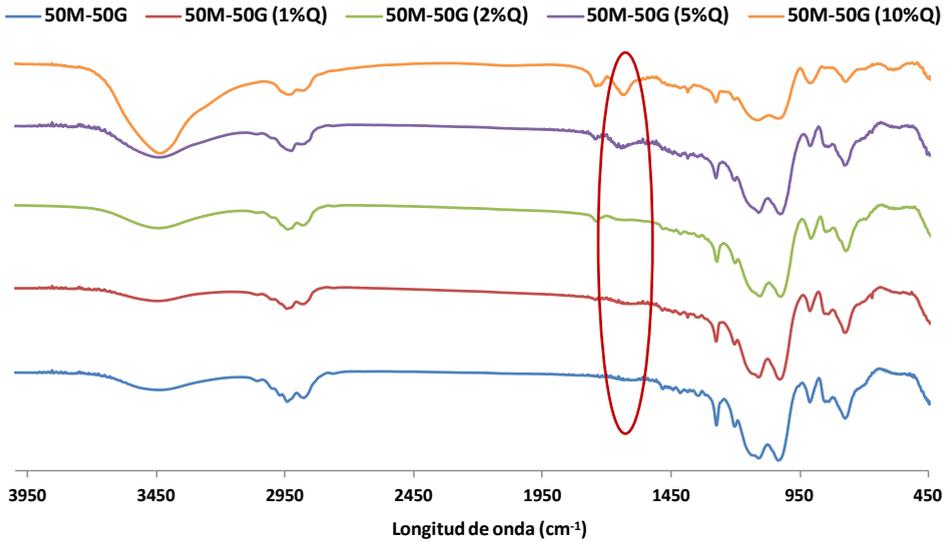


Figura 3.15: Espectro infrarrojo del sistema 50M-50G base y con diferentes porcentajes de quitosano.

En la figura 3.15 se pueden ver los espectros del sistema 50M-50G con diferentes porcentajes de quitosano. En todos los casos se observa la formación de la red polisiloxánica, con la presencia de las bandas correspondientes a las vibraciones asociadas al enlace siloxano (-Si-O-Si-) a 1075 cm^{-1} , 1105 cm^{-1} y 760 cm^{-1} . De estas bandas, la más intensa del espectro es la que está localizada a 1075 cm^{-1} , que corresponde a la vibración de tensión asimétrica del enlace siloxano. La banda que se encuentra a 760 cm^{-1} es la correspondiente a la vibración de tensión simétrica debida a este enlace. La presencia de estas tres bandas confirma la formación de la red de sílice.

Por otro lado, se pueden observar las bandas correspondientes a la parte orgánica del precursor MTMOS. Este precursor tiene un grupo metilo (-CH₃) no hidrolizable que queda presente tras la condensación y formación de la red. Las bandas correspondientes a este grupo son la vibración de tensión asimétrica del grupo metilo (-CH₃) a 2975 cm^{-1} , y la vibración de deformación del enlace Si-CH₃ a 1275 cm^{-1} . Estas bandas confirman la presencia de parte orgánica en el recubrimiento obtenido.

Por último, también se pueden observar las bandas correspondientes al precursor GPTMS, que son las del grupo epoxi, que aparecen aproximadamente a

3050 cm^{-1} y 910 cm^{-1} . La banda a 910 cm^{-1} corresponde al enlace C-O del grupo epoxi, y aparece entre las dos bandas principales de "muela" del enlace Si-O-Si. Además, se observa la banda correspondiente a la parte del grupo no hidrolizable (glicidoxilopropilo) del GPTMS. Esta banda aparece a un valor de 2870 cm^{-1} , debida a la vibración de tensión simétrica de los grupos metileno ($-\text{CH}_2$).

En el caso del sistema con un 10% de quitosano se aprecia una banda muy intensa alrededor de 3400 cm^{-1} . Esto se debe a que el quitosano tiene grupos hidroxilos propios en su estructura. Además, hay que tener en cuenta sus grupos amino ($-\text{NH}_2$), concretamente los grupos de amina primaria cuya vibración de tensión de enlace aparece en esa misma región, solapada por la banda de los grupos hidroxilo. Además, a mayores porcentajes de quitosano en los recubrimientos, se observa la aparición de una banda ancha, alrededor de 1631 cm^{-1} (marcada en rojo). Esta señal es la correspondiente a los grupos acetilo de la quitina (banda de amida I), y se intensifica notablemente en los materiales híbridos con el aumento del contenido en quitosano, por lo que se puede afirmar que se ha formado un recubrimiento híbrido con la correcta incorporación de la molécula de quitosano en la red.

3.3. Determinación del grado de hidrofilia/hidrofobia.

Una propiedad importante de los materiales para aplicaciones biomédicas es el carácter hidrófilo/hidrófobo de su superficie ya que esta propiedad, influye en gran manera en la adhesión celular. Por otro lado, la medida de la hidrofilia determina la capacidad de adsorción de agua de los recubrimientos que también puede influir en la degradación del material.

Para determinar el grado de hidrofilia e hidrofobia de estos materiales, se mide el ángulo de contacto que se forma entre una gota de agua y la superficie del recubrimiento. La realización de este estudio se lleva a cabo empleando agua destilada como medio y obteniendo el valor del ángulo de contacto de cada material como una media de 10 gotas por placa, y tres placas por sistema. El objetivo es observar el efecto del quitosano en esta propiedad, que como se ha comentado anteriormente, podrá condicionar la cascada de interacciones biológicas con las proteínas y células después de su implantación.

Tabla 3.2: Valores del ángulo de contacto para los recubrimientos con diferentes porcentajes de quitosano.

SISTEMA	ANGULO DE CONTACTO (°)
50M-50G	53.0±1.6
50G-50G (1%Q)	61.3±0.3
50M-5G (2%Q)	63.1±0.4
50M-50G (5%Q)	66.9±0.3
50M-50G (10%Q)	71.3±2.7

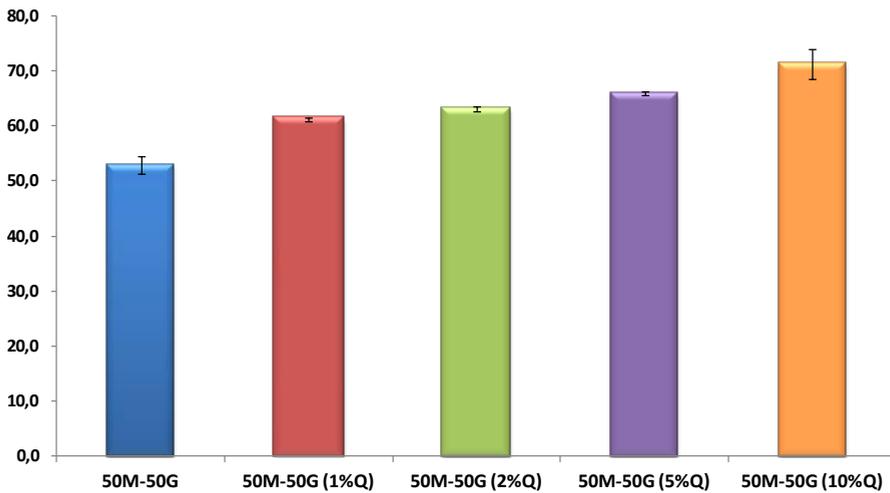


Figura 3.16: Representación de los valores del ángulo de contacto obtenido para los recubrimientos con diferentes porcentajes de quitosano.

En la tabla 3.2 y en figura 3.16 se puede observar el ángulo de contacto correspondiente a los diferentes sistemas híbridos MTMOS-GPTMS-quitosano. En contra de lo que se podría esperar debido a la cantidad de grupos polares que tiene el quitosano en su estructura, los resultados muestran que el ángulo de contacto de los recubrimientos modificados con quitosano aumenta con la incorporación del mismo. La razón de este comportamiento puede ser la conformación adoptada por el quitosano en la superficie con sus grupos hidrófobos orientados hacia la superficie del recubrimiento, debido a las interacciones entre los grupos polares en el interior del film. De este modo, y al ser la medida del ángulo de contacto una medida superficial, una mayor proporción de quitosano implica un aumento de la hidrofobia.

En cualquier caso, el valor del ángulo de contacto óptimo para la adhesión celular¹⁷ en este tipo de recubrimientos, varía en un rango de entre 69.9° y 72.9°, siendo 70° el valor descrito en bibliografía como óptimo para las interacciones adecuadas en el medio biológico^{18, 17}.

A pesar de los diferentes valores obtenidos para estos materiales, los sistemas que más se ajustan a estos valores son los sistemas 50M-50G con un 5% y un 10% de quitosano.

3.4. Ensayo de degradación hidrolítica

Tal y como se ha explicado en el capítulo 2, se estudió la degradación de los recubrimientos sumergiéndolos en medio acuoso a 37°C, simulando la temperatura fisiológica, durante un tiempo de aprox. de dos meses. Para la realización de este ensayo, se prepararon portas de vidrio (previamente sometidos a un tratamiento de limpieza por ultrasonidos) recubiertos con los materiales por el método de deposición flow-coating, siguiendo el protocolo descrito anteriormente.

Los resultados de la pérdida de peso en el tiempo para los diferentes recubrimientos se observan en la figura 3.17.

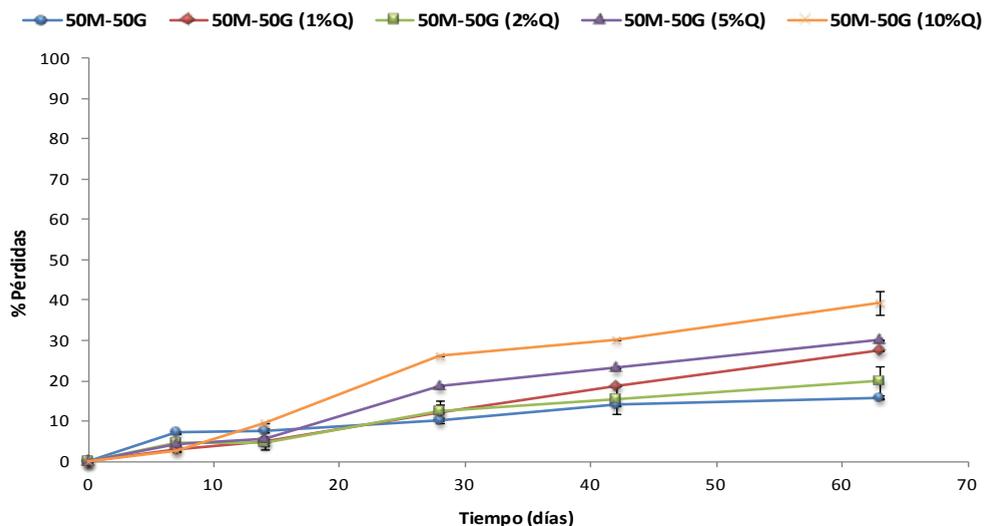


Figura 3.17: Degradación hidrolítica de los recubrimientos 50M-50G base y con diferentes porcentajes de quitosano.

Tal y como se puede observar, a medida que se aumenta el porcentaje de quitosano en el sistema, aumenta también el porcentaje de pérdidas sufridas por el material hasta llegar a pérdidas de material del 40% en el caso del sistema 50M-50G (10%Q). Este comportamiento se debe a que el quitosano es una molécula muy voluminosa que impide el correcto empaquetamiento de la red, dejando grandes canales que permiten la entrada de agua al interior, y favorecen las reacciones que dan lugar a la degradación hidrolítica.

Como se mostraba en los espectros de RMN de ^{29}Si en estado sólido al introducir un 10% de quitosano, la red queda considerablemente más abierta. Se apreciaba una mayor cantidad de especies de menor grado de condensación T_2 que de especies T_3 , lo que indica una estructura con menor grado de entrecruzamiento, y por ello está favorecida la entrada de agua.

Además, las pérdidas de peso mayores en el caso de la introducción de quitosano se deben también a que a medida que el material va degradando y la red se va rompiendo, se elimina quitosano del recubrimiento, haciendo que estas pérdidas gravimétricas aumenten.

En cualquier caso, las pérdidas son inferiores al 50% en los dos meses de estudio en todos los materiales, y con una evolución bastante lenta a partir de los 30 días de estudio.

3.5. Ensayo de liberación de Silicio

El silicio que se libera en los procesos hidrolíticos de degradación (capítulo 2, apartado 4.5) tiene una gran capacidad osteoinductora y promueve la creación de tejido óseo alrededor del implante. La cinética de liberación está condicionada por el grado de entrecruzamiento de la red formada y por la velocidad de degradación que sufre el material, de ahí la importancia de su determinación.

En la figura 3.18 se muestran los resultados obtenidos para el sistema 50M-50G base y con diferentes porcentajes de quitosano.

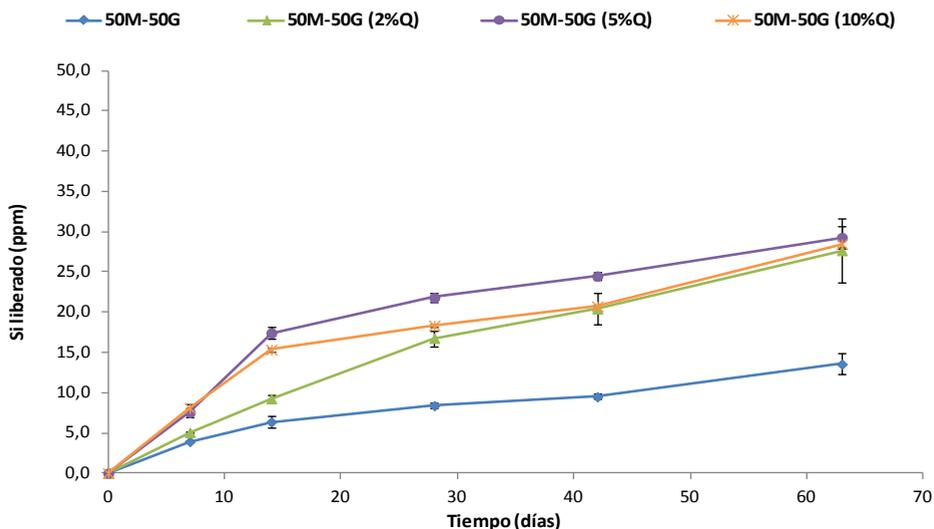


Figura 3.18: Liberación de Silicio (ppm) de los recubrimientos 50M-50G base y con diferentes porcentajes de quitosano.

Como se puede observar en la figura superior, los sistemas que incorporan quitosano son los que más silicio liberan. Esto, al igual que en el caso de la degradación hidrolítica, se debe a que una mayor cantidad de quitosano implica una mayor porosidad de la red formada, que facilita tanto la hidrólisis del material como la salida del silicio liberado al exterior. A los dos meses de estudio se observa que todos los sistemas con quitosano tienen una liberación de silicio del orden del doble que el material base.

En todos los casos, se observa una liberación de silicio gradual, que aumenta hasta la segunda semana de ensayo, para ir estabilizándose después. Además, el comportamiento de los materiales es muy similar al que tiene lugar en la degradación hidrolítica, donde a mayores cantidades de quitosano, mayores eran también las pérdidas obtenidas.

3.6. Estudios *in vitro*

La evaluación del comportamiento *in vitro* de estos materiales es de gran importancia para continuar con su estudio, puesto que están destinados a interactuar con el organismo.

Se han realizado tres tipos de ensayos *in vitro*, tanto al material base como a los que incorporan quitosano. Los ensayos llevados a cabo determinan, tanto la citotoxicidad de estos materiales mediante el ensayo MTT, la medida de la adhesión y proliferación celular sobre su superficie utilizando el ensayo de Alamar Blue, y su poder bactericida/bacteriostático mediante la determinación antibacteriana de las superficies recubiertas.

El ensayo de viabilidad celular mediante MTT se utiliza para estudiar el efecto de las posibles sustancias citotóxicas que el biomaterial pueda liberar cuando está en contacto con medio de cultivo celular fresco (productos de degradación, monómero residual, etc.), considerándose un porcentaje superior al 70% de viabilidad, señal de que los materiales no son tóxicos, según la norma ISO 10993-5.

Mediante el ensayo de Alamar Blue se evalúa la capacidad de adhesión y proliferación celular sobre las superficies de interés. La medida de la capacidad de adhesión y proliferación celular se obtiene mediante fluorescencia, y por lo tanto, a mayores valores de fluorescencia obtenidos mayor será dicha capacidad. A su vez, este ensayo da una idea también de la toxicidad de los materiales.

Por último, los ensayos antibacterianos consisten en la determinación de la actividad bactericida y/o bacteriostática de los recubrimientos frente a bacterias del tipo *Staphylococcus aureus*^{19, 20, 21}. Esta es una de las bacterias que participa en las infecciones bacterianas postimplantación y tiene capacidad para adherirse a componentes de la matriz extracelular y las proteínas plasmáticas que se depositan sobre las superficies de los biomateriales formando biofilms bacterianos.

Para la realización de los ensayos *in vitro*, se recubren discos de titanio granallado mediante la técnica de *Dip-coating*, que consiste en sumergir el sustrato en una disolución sol-gel del recubrimiento que se quiere obtener durante un tiempo determinado, y a una velocidad determinada. En este caso concreto los parámetros elegidos para la deposición del recubrimiento sobre el sustrato son velocidad de bajada 50.01 mm/min, un minuto en inmersión y velocidad de subida 100.03 mm/min. Posteriormente, estos discos son sometidos al tratamiento térmico previamente fijado, y antes de analizarlos son sometidos a una esterilización con luz UV.

Los resultados obtenidos para los ensayos *in vitro* realizados se muestran a continuación.

3.6.1. Medida de la viabilidad celular utilizando el ensayo de MTT.

Este ensayo se ha realizado con la línea celular de FBH (Fibroblastos Humanos), según la norma ISO 10993, 2000-2009 de viabilidad celular, y la citotoxicidad de los materiales se da en términos de porcentaje de viabilidad celular respecto a un control.

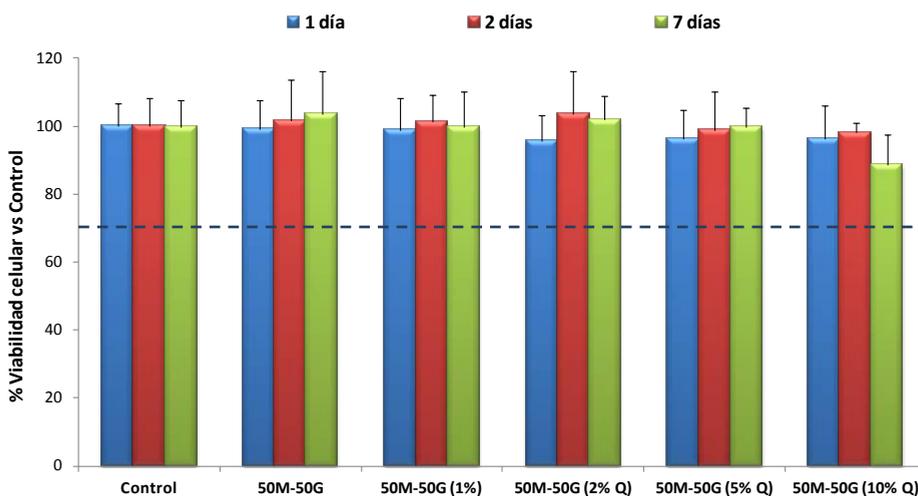


Figura 3.20: Estudios de la medida de la viabilidad celular para el sistema 50M-50G base y con diferentes porcentajes de quitosano.

En los resultados obtenidos (figura 3.20) se observa que todos los sistemas estudiados muestran una viabilidad superior al 70%, considerándose por lo tanto no citotóxicos para la línea celular ensayada.

3.6.2. Medida de la adhesión y proliferación celular (ALAMAR BLUE).

En cuanto al estudio de la adhesión y proliferación celular, se realiza mediante el empleo del reactivo Alamar Blue. En este ensayo se estudia la cantidad de células adheridas a la superficie del sustrato con el tiempo, utilizando para ello una técnica de fluorescencia. Además, mediante este ensayo se obtiene también una medida indirecta de la toxicidad de los recubrimientos, ya que de ser citotóxicos, cada vez menor cantidad de células se adherirían a estas superficies.

El ensayo se ha llevado a cabo con línea celular de Fibroblastos Humanos (FBH).

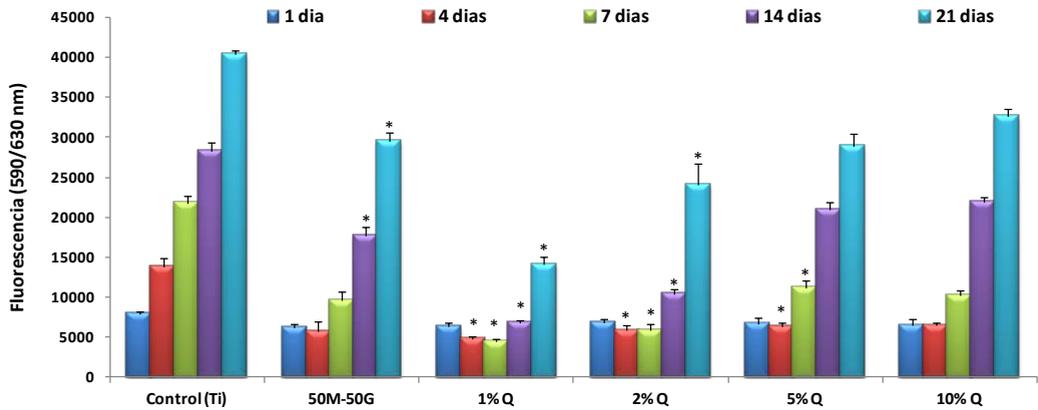


Figura 3.21: Estudios de la medida de la adhesión y proliferación celular para el sistema 50M-50G base y con diferentes porcentajes de quitosano.

La figura 3.21 muestra como todos los materiales tienen una buena proliferación con el paso del tiempo. Así, aunque en la figura 3.20 a 21 días se observa una disminución de la viabilidad celular en las muestras con mayor cantidad de quitosano, ésta no es significativa tal y como se demuestra en este estudio, lo que corrobora la baja toxicidad de los recubrimientos.

En esta figura además, se pueden apreciar diferentes comportamientos entre los sistemas. Estas diferencias podrían deberse a la topografía final de los discos tras la deposición de los recubrimientos²², tal y como se ha observado en estudios anteriores^{11, 12}. Por este motivo, se decide realizar un estudio de la topografía superficial de los recubrimientos obtenidos en discos de titanio mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

Al comparar todos los sistemas con el Titanio control, se observa una menor adhesión durante los 21 días de ensayo. Este comportamiento se atribuye a la rugosidad propia del disco de titanio granallado que queda enmascarada (parcial o totalmente) por el recubrimiento. Esto se observa perfectamente mediante el Microscopio Electrónico de Barrido (SEM), donde se aprecia esta clara disminución del carácter rugoso de la superficie recubierta.

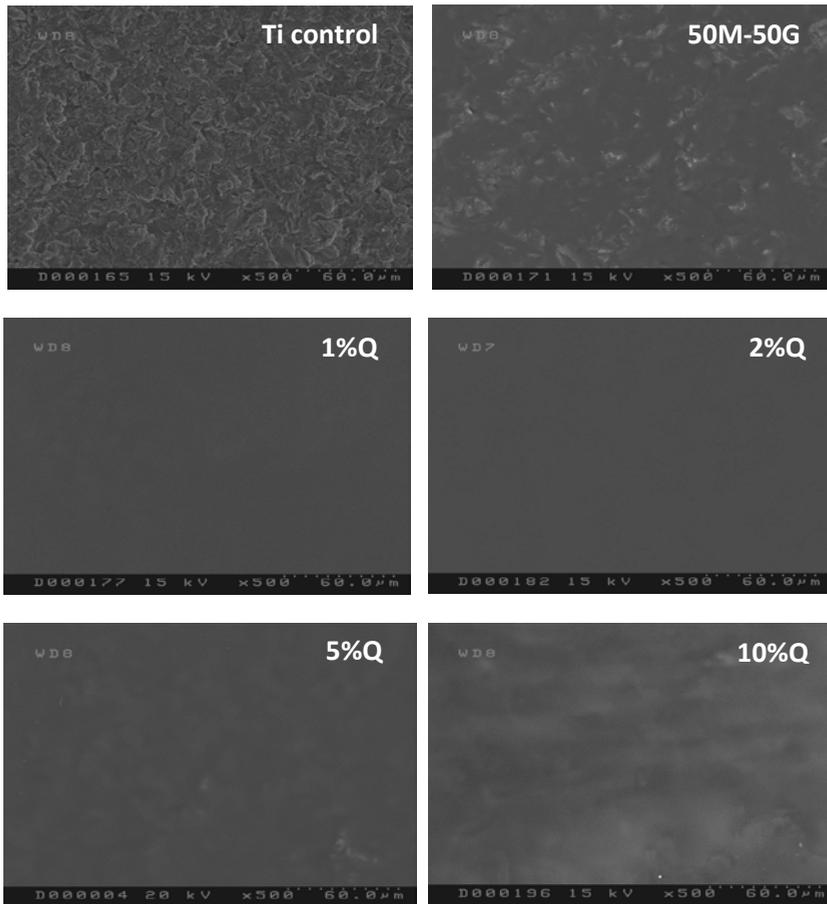


Figura 3.22: Estudio de la rugosidad superficial por SEM de los discos de titanio control y recubiertos con los sistemas 50M-50G base y con quitosano.

En primer lugar, la rugosidad del disco de titanio queda parcialmente cubierta por el recubrimiento base 50M-50G, aunque sigue observándose cierta rugosidad, de ahí que la adhesión celular disminuya pero no sea una diferencia tan marcada como en los siguientes casos. Sin embargo, al introducir quitosano, concretamente un 1% y un 2% de quitosano, la superficie se vuelve totalmente lisa, es decir, la rugosidad queda totalmente tapada por el recubrimiento. Una superficie lisa no es favorable para la adhesión celular y por ello estos dos sistemas muestran una disminución significativa de la misma. Al aumentar el contenido en quitosano, la superficie de los discos vuelve a tener cierta rugosidad, debida a la formación de un recubrimiento más heterogéneo por la baja solubilidad y alta viscosidad del

quitosano en las formulaciones. Esto queda patente en el aumento de la adhesión celular a partir de un 5% de quitosano, y más aún al incorporar un 10% de quitosano. Además, tal y como se observaba en las medidas del ángulo de contacto, estos dos sistemas, son también los que daban ángulos de contacto más cercanos al óptimo, según la bibliografía.

En la figura 3.23 se observan micrografías obtenidas mediante el Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) del sistema 50M-50G con diferentes porcentajes de quitosano, a diferentes tiempos de postsiembra directa de las células.

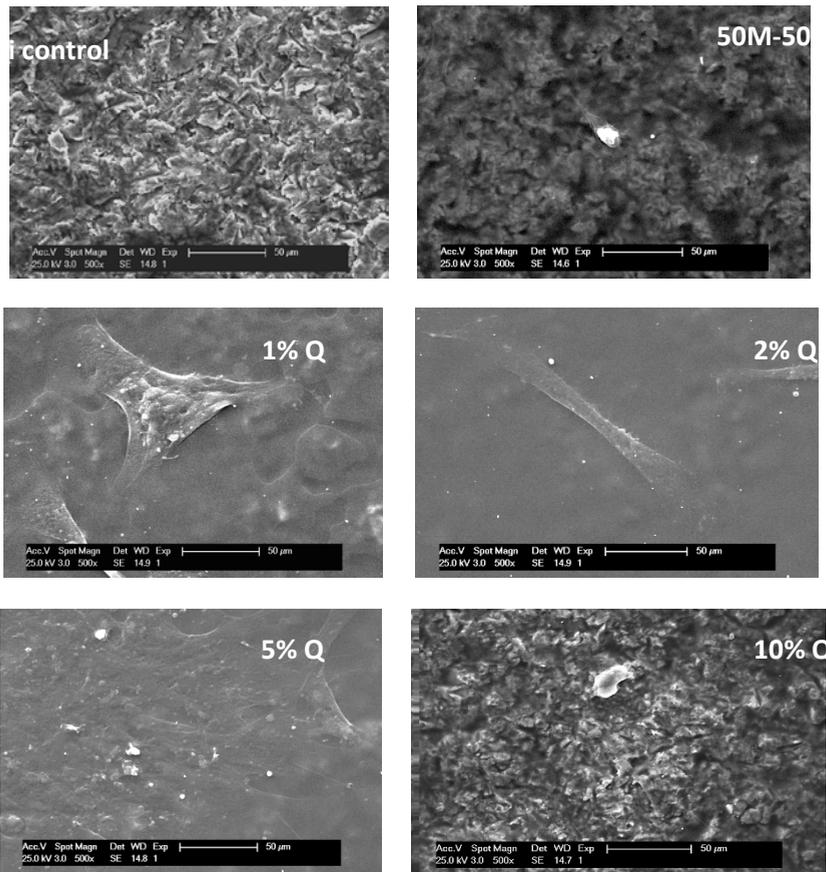


Figura 3.23: Micrografías obtenidas por SEM tras 48 horas postsiembra directa de células sobre la superficie de los recubrimientos.

A 48 horas de postsiembra directa, el número de células adheridas en la superficie de los materiales es baja, incluso para el control y para la formulación base. En todos los materiales con quitosano se observan células aisladas con buena morfología que comienzan a extenderse para proliferar. Se puede decir que en la formulación con un 5% de quitosano el número de células adheridas es algo mayor que en el resto de los materiales.

En la figura 3.24 se presentan las micrografías tomadas a 14 días tras la siembra.

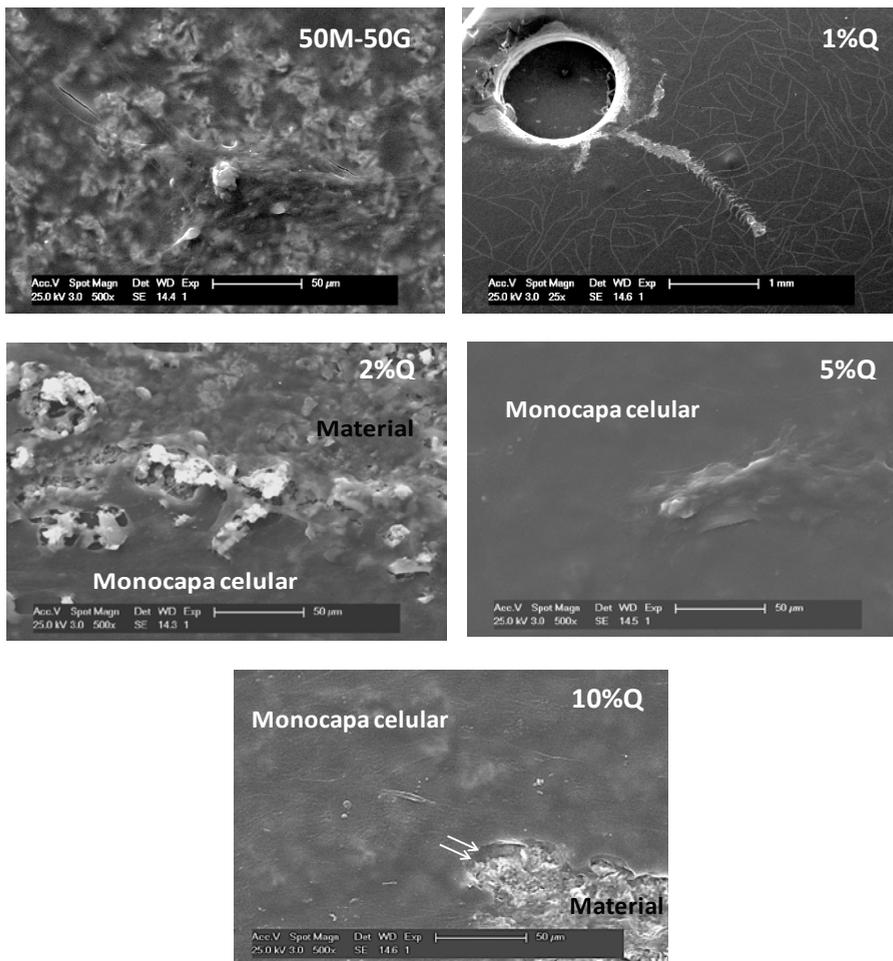


Figura 3.24: Micrografías obtenidas por SEM tras 14 días postsiembra directa de células sobre la superficie de los recubrimientos.

A 14 días de estudio, se comienzan a ver varias células juntas sobre las superficies estudiadas, como, por ejemplo, en la formulación base. Además se da la formación de una monocapa celular en las formulaciones que contienen 2%, 5% y 10% de quitosano, siempre y cuando no exista rotura del recubrimiento. Este es el caso de la muestra con un 1% de quitosano. En este material se aprecia una fragmentación del recubrimiento con pérdida del mismo y por lo tanto, ausencia de células en su superficie.

Por último, se encuentran las micrografías de los materiales a 21 días, siendo este el mayor tiempo de ensayo (figura 3.25).

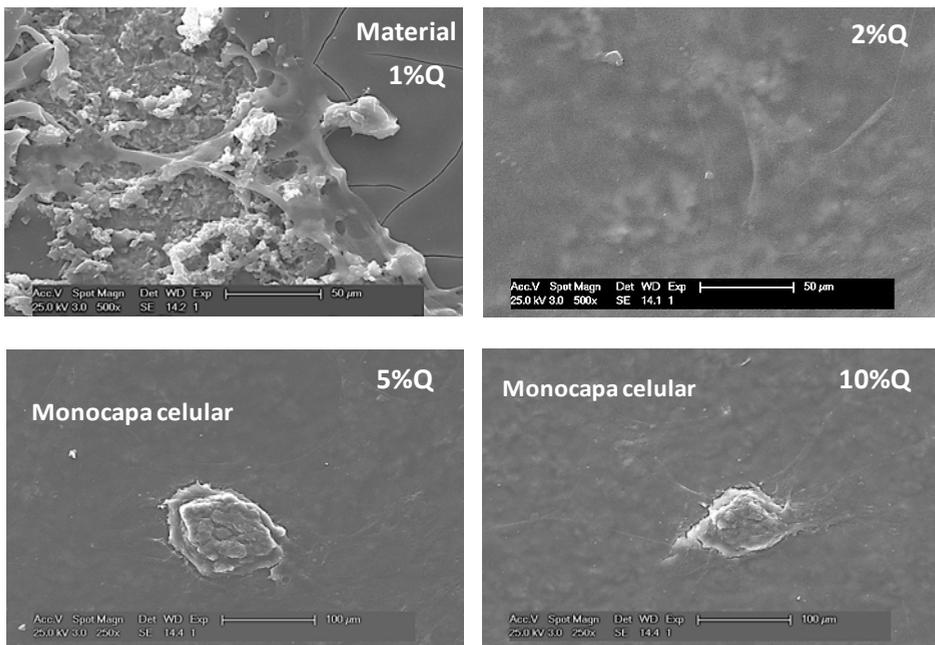


Figura 3.25: Micrografías obtenidas por SEM tras 21 días postsiembra directa de células sobre la superficie de los recubrimientos.

En la figura 3.25 se observa que a los 21 días tras la siembra de células la formulación base ha perdido el recubrimiento y por ello no hay fotos de esta muestra. Para la formulación con 1% de quitosano se observa la presencia de células que comienzan a unirse entre ellas, pero sin formar todavía la monocapa celular.

Para el resto de formulaciones con quitosano, la monocapa celular formada sobre el material es muy extensa, observándose incluso aglomerados celulares sobre

esta monocapa ya formada, como podemos ver en la muestra del 5% de quitosano. Estos resultados corroboran nuevamente los obtenidos en el ensayo de Alamar Blue (figura 3.21). El mayor número de células observadas, se corresponde con las formulaciones que incorporan una mayor cantidad de quitosano (5% y 10%), y a tiempos de ensayo largos, 14 y 21 días.

3.6.3. Determinación de la actividad antibacteriana de los materiales.

Por último, se realiza la determinación de la actividad bactericida de esta serie de recubrimientos.

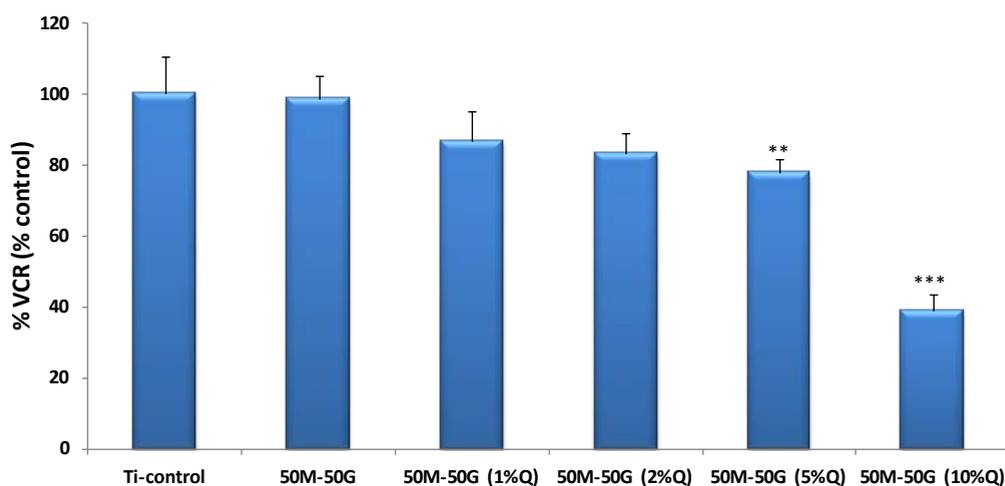


Figura 3.26: Determinación de la actividad bactericida para la familia de recubrimientos 50M-50G base y con diferentes porcentajes de quitosano.

Tal y como se observa en la figura 3.26, cuanto mayor es el porcentaje de quitosano en los materiales, mayor es también la actividad bactericida de los mismos. A pesar de que el sistema con un 10% de quitosano es el que posee un mayor efecto antibacteriano, la alta viscosidad de los sistemas para las formulaciones que incorporan más de un 5% de quitosano dificulta el manejo de las mismas.

Además, y dado que la formulación con un 5% de quitosano presenta unos buenos resultados en el estudio de adhesión y proliferación celular, hace que se considere dicho porcentaje como el más adecuado para continuar con este trabajo.

4. RESULTADOS 80M-20G CON 5% QUITOSANO

En el apartado anterior, se han desarrollado una serie de recubrimientos híbridos con matriz 50MTMOS-50GPTMS y con la incorporación de diferentes porcentajes de quitosano como agente antibacteriano.

Tal y como se ha explicado anteriormente, debido a la necesidad de que los recubrimientos formulados sean de larga permanencia, sin perder su potencial antibacteriano, se decide continuar con este estudio variando la composición de la matriz, haciendo al nuevo material menos hidrófilo, utilizando un menor porcentaje de GPTMS.

En este caso, se introduce un solo porcentaje de quitosano como porcentaje óptimo, el 5%, debido a los buenos resultados que se han obtenido en el apartado anterior, tanto a nivel de caracterización morfológica y química, como en los estudios *in vitro* realizados. Por tanto, se estudiarán 2 formulaciones, la formulación base 80M-20G y la misma formulación con un 5% de quitosano.

Para estas familias de recubrimientos, el proceso de síntesis seguido es el mismo que en caso anterior, es decir, los sistemas base se sintetizan siguiendo el procedimiento descrito en el capítulo 2 (Materiales y Técnicas experimentales), mientras que los sistemas que incorporan quitosano siguen el método de síntesis descrito en la figura 3.3.

4.1. Ensayo de adherencia

En los dos casos, se han obtenido materiales homogéneos, con una alta transparencia y con una gran adhesión al sustrato elegido. Para comprobar la calidad de esta adhesión se les va a realizar el ensayo de corte por enrejado mediante el cual se puede cuantificar la cantidad de material desprendido y por lo tanto su adherencia. Para ello, se recubren placas metálicas de acero (316L), mediante la técnica de *flow-coating*, y son sometidas a un tratamiento térmico de curado para dar lugar al recubrimiento sólido.

Antes de ser recubiertas todas las placas de acero han sido lijadas en las 4 direcciones para favorecer la adhesión.

Los ensayos de corte por enrejado realizados, muestran una perfecta adhesión de los mismos al sustrato (figura 3.27), siendo 0 el desprendimiento final del material.

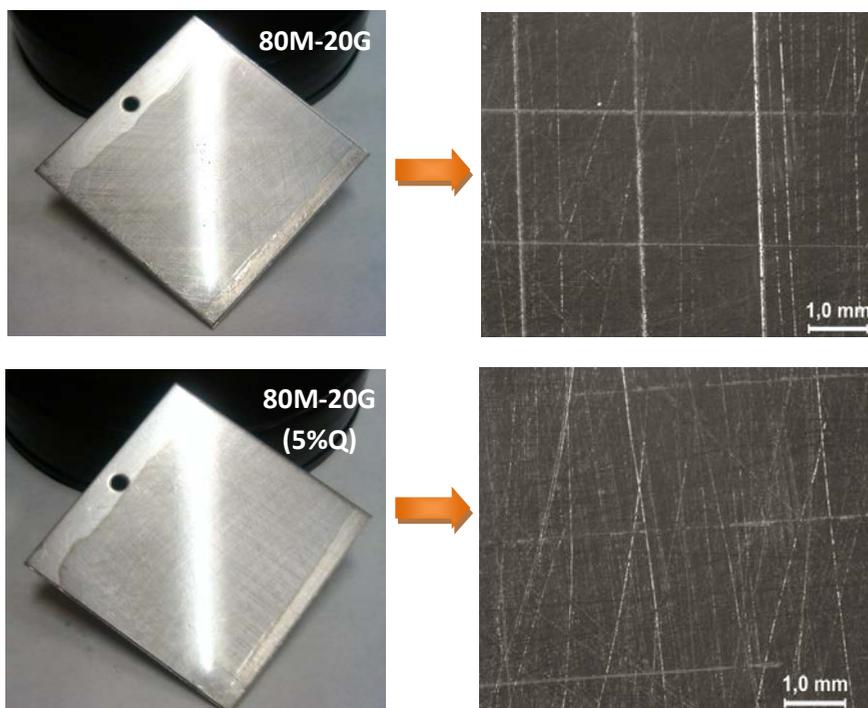


Figura 3.27: Caracterización morfológica del sistema 80M-20G base y con 5% de quitosano.

4.2. Caracterización química

4.2.1. Resonancia Magnética Nuclear del átomo de Silicio (^{29}Si -RMN)

En primer lugar, para el estudio de las etapas de hidrólisis y condensación que tienen lugar durante la reacción, se emplea la técnica de RMN de ^{29}Si en estado líquido.

En las figuras 3.28 y 3.29 se representan los resultados obtenidos para el sistema 80M-20G base y con un 5% de quitosano, respectivamente.

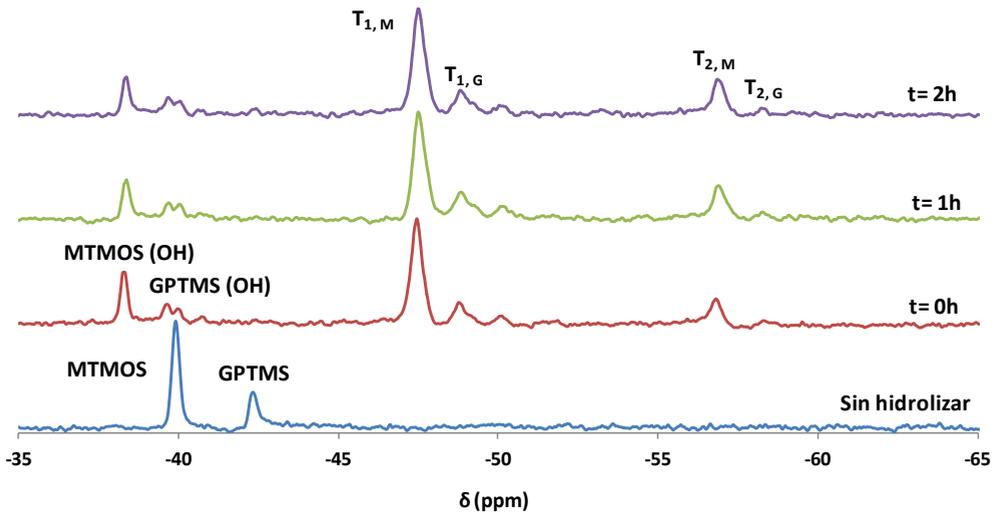


Figura 3.28: Espectro obtenido mediante ^{29}Si -RMN de líquidos para el sistema 80M-20G base.

Al igual que en la formulación anterior, en el espectro (figura 3.28) se observan las señales de los precursores MTMOS y GPTMS sin hidrolizar (-40 ppm la señal del MTMOS y -42 ppm la señal del GPTMS), cada una con su intensidad relativa en función de la proporción de los mismos en la formulación.

Tras la adición del agua ácida y la adquisición de este espectro ($t=0\text{h}$), se observan las señales asociadas a la hidrólisis y condensación de los precursores, las especies condensadas T_1 y T_2 del MTMOS a -47 y -57 ppm respectivamente, y de menor intensidad las señales del mismo grado de condensación para el precursor GPTMS (T_1 a -49 ppm y T_2 a -58 ppm).

Además, se observan las señales de la especie hidrolizadas MTMOS (OH) y GPTMS (OH), que no desaparecen incluso en las dos horas de reacción, lo que indica que las reacciones de condensación están de algún modo impedidas, debido probablemente, como se ha dicho anteriormente, al impedimento estérico creado por el gran tamaño del grupo glicidoxipropilo del GPTMS. A pesar de ello, la aparición de las señales correspondientes a las especies T_1 y T_2 de los dos precursores indica que la reacción avanza favorablemente.

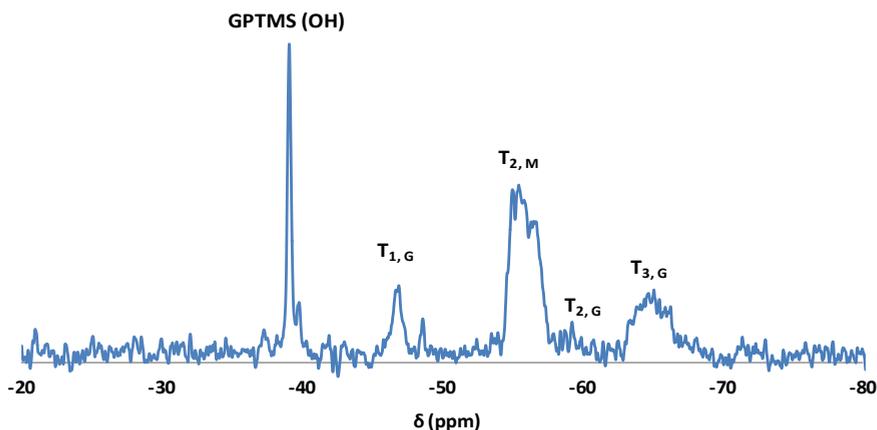


Figura 3.29: Espectro obtenido mediante ^{29}Si -RMN de líquidos para la mezcla final 80M-20G con 5% de quitosano.

En la figura 3.29 se ve que, tras la reacción global ocurre algo similar a lo que ocurría con la formulación 50M-50G con un 5% de quitosano. Al añadir quitosano, se obtienen las especies de mayor grado de condensación (T_2 y T_3), a pesar de que queda un gran número de especies hidrolizadas GPTMS (OH), por lo que se puede concluir que tras la síntesis global del sistema se observa un avance de la condensación.

Para ver el grado de entrecruzamiento de la red formada, se utilizó la técnica de RMN de ^{29}Si en estado sólido mediante la obtención de film libre y posterior molido. Los espectros obtenidos para ambos sistemas se muestran en la figura 3.30.

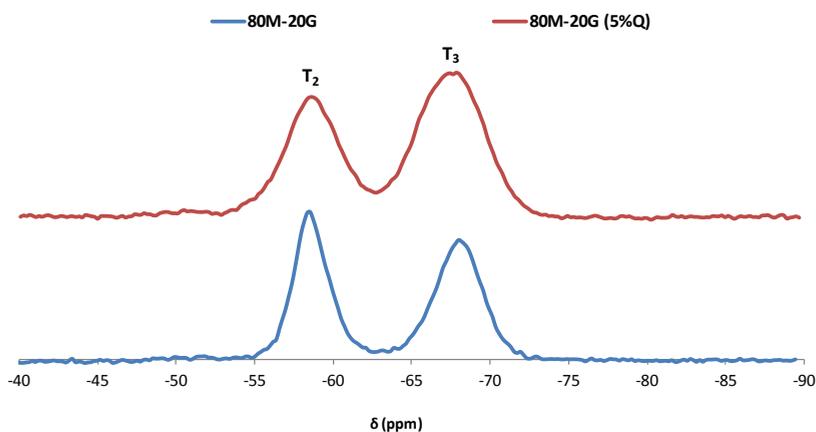


Figura 3.30: Espectro de ^{29}Si -RMN de sólidos el sistema 80M-20G base y con 5% de quitosano.

En ambos espectros se obtiene una red altamente entrecruzada con una mayor proporción de especies T_3 (especie más condensada que da lugar a la red polisiloxánica). Sin embargo, el sistema 80M-20G base, muestra una red final más abierta que el que incorpora quitosano, ayudando la introducción de este al mejor empaquetamiento de la red, comportamiento opuesto al sistema 50M-50G.

Esto se podría atribuir a una posible interacción entre los grupos hidroxilo del quitosano y los grupos silanol de la red. De este modo, las reacciones de condensación y entrecruzamiento de la red se verían favorecidas durante el tratamiento térmico tal favoreciendo en mayor entrecruzamiento de la misma. Además, al haber una menor proporción de GPTMS en los materiales, hay también un menor impedimento estérico para el empaquetamiento de la red.

4.2.2. Espectroscopia infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

Mediante la técnica de la espectroscopia infrarroja se puede obtener una idea del carácter híbrido de estos materiales puesto que se asocian las señales en el espectro con las características, no sólo de la red formada, sino también de los grupos no hidrolizables de ambos precursores. Como se ha comentado, para la adquisición de los espectros FTIR se obtienen films de los materiales mediante su deposición en moldes de teflón, y se trituran con un mortero hasta obtener un material en forma de polvo. Adicionalmente, se obtienen pastillas del material mezclándolo con KBr, y de este modo adquiriendo los espectros.

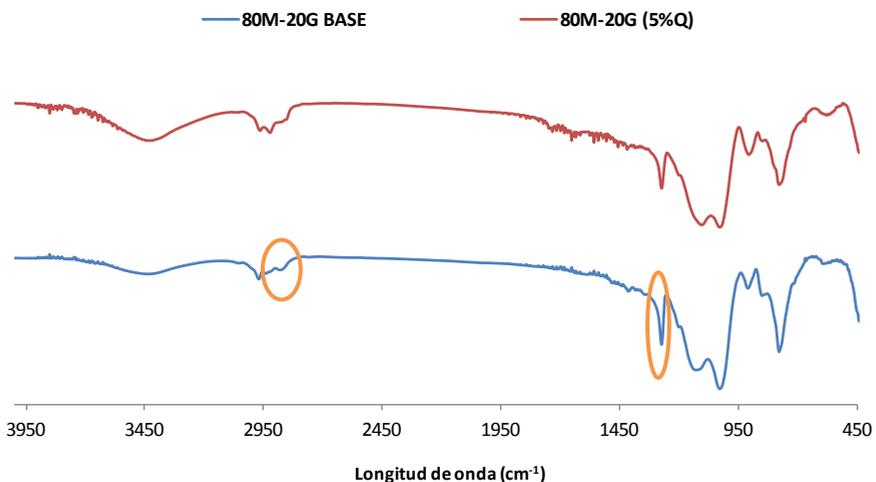


Figura 3.31: Espectro infrarrojo del sistema 80M-20G base y con un 5% de quitosano.

En la figura 3.31 se observan los espectros correspondientes a los diferentes recubrimientos sintetizados. En estos espectros aparecen las bandas debidas a la formación de la red polisiloxánica (-Si-O-Si-) a valores de 1075 cm^{-1} , 1105 cm^{-1} y 760 cm^{-1} . Además, se observan las bandas debidas a los grupos no hidrolizables de los precursores; por un lado está el grupo metilo (-CH₃) del MTMOS cuyas vibraciones de enlace características son la vibración de tensión asimétrica del grupo metilo (-CH₃) a 2975 cm^{-1} y la vibración de deformación del enlace Si-CH₃ a 1275 cm^{-1} (ambas marcadas en la figura en color naranja) y por otro lado, las bandas asociadas al precursor GPTMS. Una de las señales más características de este precursor es la que aparece a 910 cm^{-1} y que corresponde a la vibración del enlace C-O del anillo epoxi de su cadena no hidrolizable. Se encuentra también la señal de la cadena lineal del grupo no hidrolizable del GPTMS, que aparece a un valor aproximado de 2870 cm^{-1} , y que se debe a la vibración de tensión simétrica de los grupos metilenos (-CH₂). Por último, se observa una señal no muy intensa a 1200 cm^{-1} típica también de este grupo glicidoxipropilo.

La aparición de todas estas señales en el espectro significa que se ha conseguido sintetizar un recubrimiento con carácter híbrido sin afectar a la formación de la red polisiloxánica.

4.3. Determinación del grado de hidrofilia/hidrofobia

Como en los casos anteriores, se recubren las placas metálicas mediante la técnica de deposición *flow-coating* y se someten al tratamiento de curado adecuado. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 3.32. Dada la importancia de la capacidad hidrofílica en el comportamiento *in vivo* y en la degradación de estos materiales, y con el fin de comparar la variación del precursor GPTMS en el recubrimiento 80M-20G respecto al recubrimiento 50M-50G, tanto en la figura 3.32 como en la tabla 3.3, se muestran los valores del ángulo de contacto obtenidos para ambos sistemas.

Tabla 3.3: Valores del ángulo de contacto para los sistemas con un 5% de quitosano.

SISTEMA	ANGULO DE CONTACTO (°)
50M-50G	53.0±1.6
50M-50G (5%Q)	67.8±0.1
80M-20G	65.9±0.3
80M-20G (5%Q)	73.1±0.4

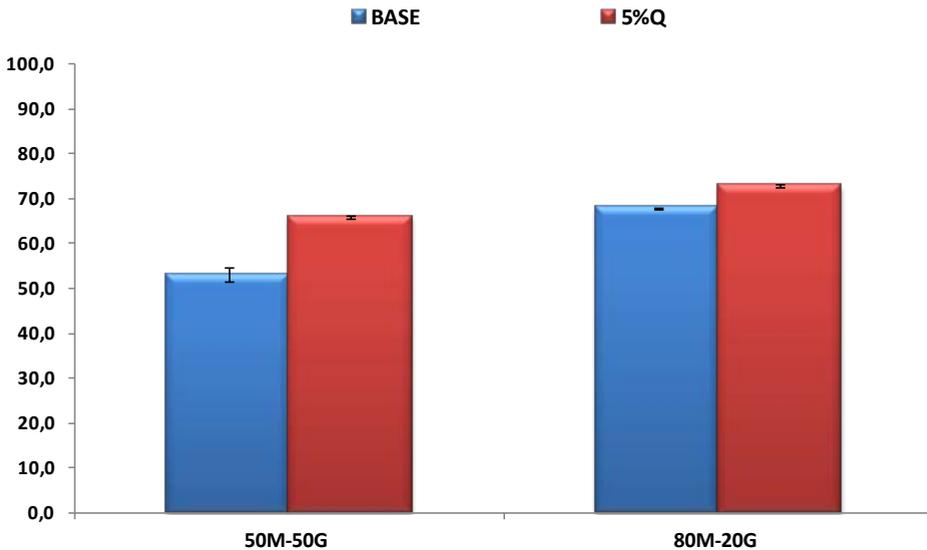


Figura 3.32: Ángulos de contacto para los sistemas 50M-50G y 80M-20G base y con 5% de quitosano.

En esta figura se observa de nuevo que al incorporar quitosano en los materiales aumenta el grado de hidrofobia de los mismos. Como se ha explicado anteriormente, el quitosano podría adoptar una conformación en la que sus grupos hidrófobos queden orientados hacia la superficie y así, obtenerse valores de mayor ángulo de contacto para los sistemas que lo incorporan.

Por otra parte, como se observa en la tabla, la variación del precursor GPTMS influye en el carácter hidrófilo de los materiales, de manera que el ángulo de contacto aumenta al disminuir la proporción de GPTMS, como era de esperar, debido al mayor carácter hidrófilo de este precursor.

4.4. Ensayo de degradación hidrolítica

Para estudiar la cinética de la degradación hidrolítica se recubren porta-objetos de vidrio mediante la técnica de deposición *flow-coating*, y se introducen en agua destilada durante un periodo de tiempo de 63 días. Cada cierto tiempo (previamente determinado) se recupera la muestra, se seca en estufa de vacío y se procede a calcular el porcentaje de pérdidas de peso que sufre el material. Este ensayo nos permitirá conocer la influencia del contenido del precursor GPTMS en la degradabilidad del material final.

En la figura 3.33, se representan los valores de las pérdidas de peso de los cuatro materiales.

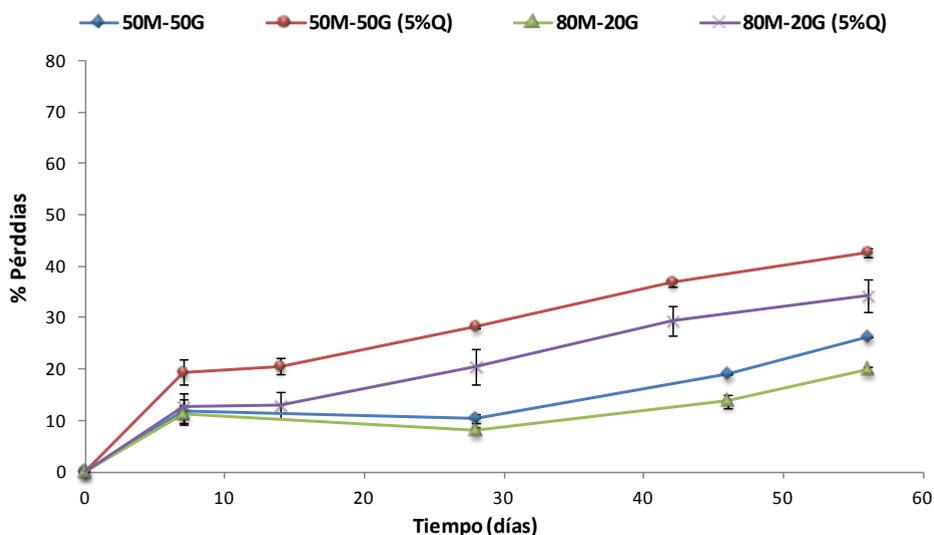


Figura 3.33: Degradación hidrolítica de los recubrimientos 50M-50G base y 80M-20G base y con 5% de quitosano.

Ta y como ocurría con el sistema 50M-50G, la incorporación de quitosano al recubrimiento incrementa las pérdidas de peso sufridas por los materiales (en comparación con los sistemas base). Este comportamiento se ha comentado anteriormente y podría deberse a que al ser el quitosano una molécula voluminosa, podría favorecer la aparición de canales en la estructura que facilitarían la entrada de agua al interior de la red, y por consiguiente su degradación. De nuevo hay que recordar que en este estudio gravimétrico además, se tienen en cuenta también la pérdida de peso del quitosano a medida que el material va degradando.

En cuanto a la influencia del precursor GPTMS en la degradabilidad de los recubrimientos, se observa que una disminución de éste en la formulación disminuye del mismo modo, la degradación sufrida por los materiales.

Tanto en los sistemas base como en los que incorporan quitosano, la formulación 80M-20G tiene una tasa de pérdidas menores que la formulación 50M-50G, comportamiento esperado debido a la alta hidrofilia del precursor.

Por último, se observa que los cuatro materiales siguen una cinética de degradación similar, con unas pérdidas de peso máximas de un 42% en los 2 meses de estudio.

4.5. Ensayo de liberación de silicio

Como se ha comentado anteriormente, una de las propiedades más importantes de estos recubrimientos, es su capacidad de liberar Si, que son a su vez capaces de promover la osteoinducción y la osteointegración, mediante la creación de tejido óseo alrededor del implante.

Esta liberación de silicio está directamente relacionada con la degradación hidrolítica sufrida mediante la reacción que se muestra a continuación:



Por lo tanto, cabe esperar que los recubrimientos con una mayor degradación sean también los que mayor cantidad de silicio liberen al medio.

La medida de la cantidad de silicio liberado se ha realizado mediante la técnica de ICP-MS, y la cantidad liberada se expresa en ppm (partes por millón, o lo que es lo mismo, mg/L). En la figura 3.34 se muestran los resultados obtenidos.

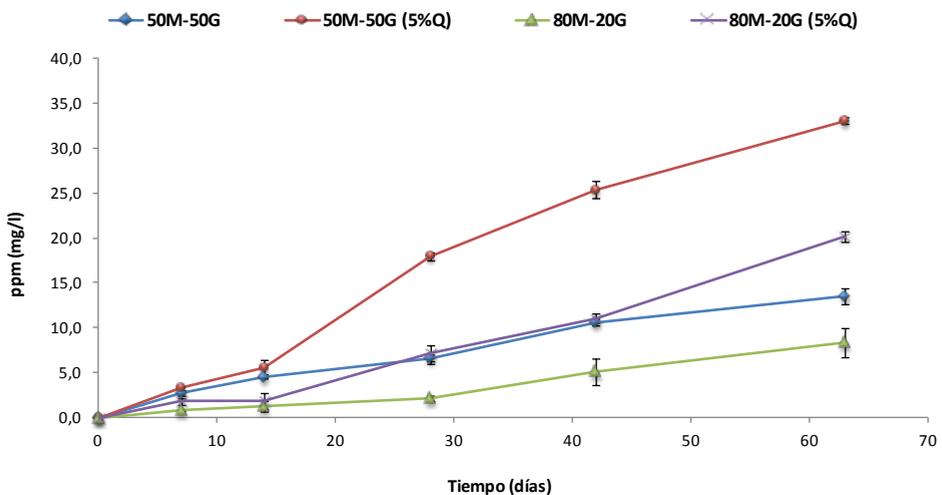


Figura 3.34: Estudio de liberación de Silicio de los sistemas 50M-50G y 80M-20G base y con 5% quitosano.

En este caso, se aprecia en mayor medida como la introducción de quitosano afecta a la degradación hidrolítica sufrida y por lo tanto a la liberación de silicio. El sistema 50M-50G con un 5% de quitosano muestra una liberación de silicio muy superior al resto de los sistemas, lo que podría deberse a un efecto sinérgico de la introducción de quitosano y una mayor proporción del precursor GPTMS. De este modo, el quitosano podría favorecer la aparición de canales o una mayor porosidad que favorecería la entrada de agua, y además, el precursor GPTMS aportaría una mayor hidrofilia al material.

El perfil de liberación de silicio es el mismo que el que tiene lugar en el estudio de degradación hidrolítica. La incorporación de quitosano aumenta notablemente la liberación de silicio en ambos casos, tanto en el sistema 50M-50G como en el 80M-20G, comparándolos con sus materiales base. Gracias a los canales formados en la red con la introducción del quitosano, se facilita también la liberación de una mayor cantidad de silicio al exterior.

Adicionalmente, en este estudio se aprecian mejor los diferentes comportamientos en estado acuoso de los recubrimientos atendiendo a la variación de la cantidad de GPTMS. Como cabía esperar, tanto en los sistemas base, como en aquellos que incorporan quitosano, un aumento del GPTMS en red implica un aumento en la liberación de silicio, tal y como ocurría en el caso de la degradación hidrolítica, siguiendo el mismo comportamiento.

4.6. Estudios *in vitro*

Los resultados *in vitro* que se muestran a continuación son los debidos al sistema 80M-20G base y con un 5% de quitosano, en comparación con los obtenidos para el sistema 50M-50G. De nuevo, la línea celular empleada es la línea celular de FBH (fibroblastos humanos de epidermis), según la norma ISO 10993, 2000-2009 de viabilidad celular.

En primer lugar se estudia la citotoxicidad de estos recubrimientos.

4.6.1. Medida de la viabilidad celular utilizando el ensayo de MTT.

Este ensayo se realiza para estudiar el efecto de las posibles sustancias citotóxicas que el biomaterial pueda liberar cuando está en contacto con medio de cultivo celular fresco (productos de degradación, monómero residual, etc.).

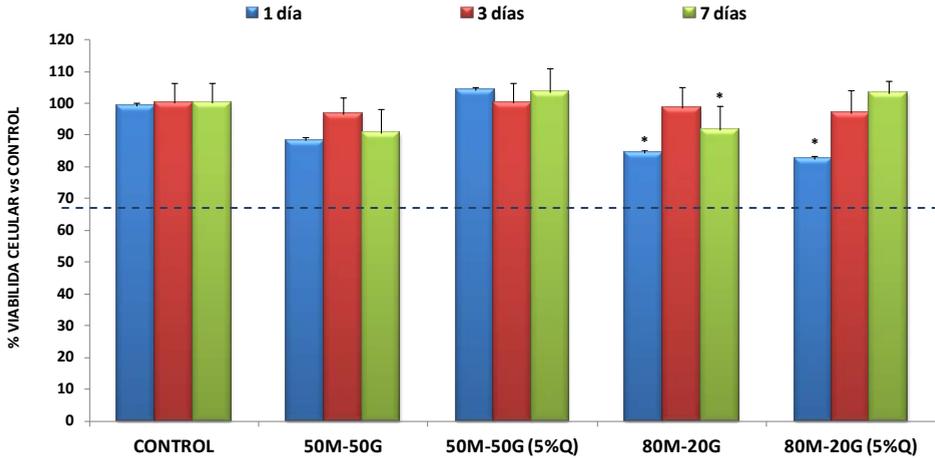


Figura 3.35: Estudio de la medida de la viabilidad celular de los sistemas 50M-50G y 80M-20G base y con 5% quitosano.

Los resultados que se pueden observa en la figura 3.35 nos permiten asegurar que todos los sistemas analizados muestran una viabilidad celular superior al 70% respecto al control, siendo por lo tanto no citotóxicos.

4.6.2. Medida de la adhesión y proliferación celular (ALAMAR BLUE).

Este ensayo se utiliza para evaluar la capacidad de adhesión y proliferación celular sobre las superficies de interés mediante el empleo del reactivo Alamar Blue.

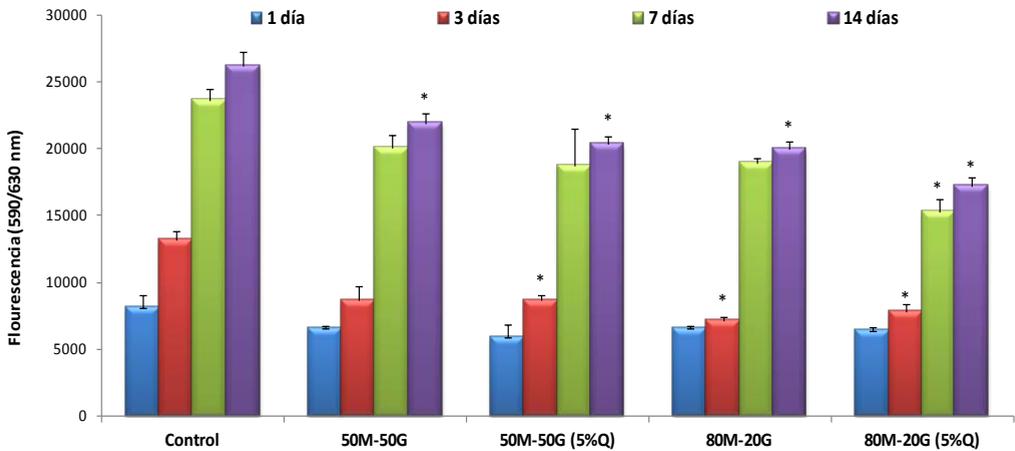


Figura 3.36: Estudio de la medida de la adhesión y proliferación celular de los sistemas 50M-50G y 80M-20G base y con 5% quitosano.

Tal y como se puede observar en la figura 3.36, los ensayos de adhesión y proliferación celular realizados a estos materiales indican que a pesar de que dichos materiales presentan valores ligeramente inferiores a los que presenta el titanio control, la adhesión y posterior proliferación aumenta considerablemente a partir del tercer día de cultivo, con un perfil muy similar al del Ti. Esto corrobora que los recubrimientos obtenidos no son tóxicos, y que además favorecen una correcta adhesión y proliferación celular en el tiempo.

El hecho de que la adhesión y proliferación del titanio sea superior, se atribuye, como se ha comentado anteriormente, a la rugosidad propia de los discos control¹². Como se observó con anterioridad mediante el microscopio electrónico de barrido (SEM), al recubrir los discos de titanio granallado con el sol-gel, la rugosidad queda enmascarada por el recubrimiento, lo que afecta a la adhesión celular (figura 3.22).

Por otra parte, hay que tener en cuenta también, los estudios de degradación hidrolítica y los estudios de liberación de silicio. En ambos ensayos se ha observado que los materiales con quitosano sufren mayores pérdidas que los materiales base, es decir, el recubrimiento se va eliminando con mayor facilidad del sustrato, y por consiguiente las células adheridas a él también. De este modo, los valores de adhesión en la superficie de los discos recubiertos son aparentemente menores que en el caso del disco control, e incluso, todavía menores en los materiales con quitosano. A pesar de esto, en todos los materiales se aprecia un aumento de la adhesión y proliferación celular con el paso del tiempo, a partir del tercer día de cultivo.

4.6.3. Determinación de la actividad antibacteriana de los materiales.

La determinación de la actividad antibacteriana de los distintos materiales se llevó a cabo siguiendo la norma ISO 22196:2007(E) frente a bacterias *Staphylococcus aureus* CECT 86.

Para la obtención de los valores del número viable de bacterias sobre la superficie de los discos, hay que tener en cuenta que el número viable de bacterias se expresa como UCF/cm² que hay presente en cada muestra después de su incubación. Los resultados se presentan en la figura 3.37.

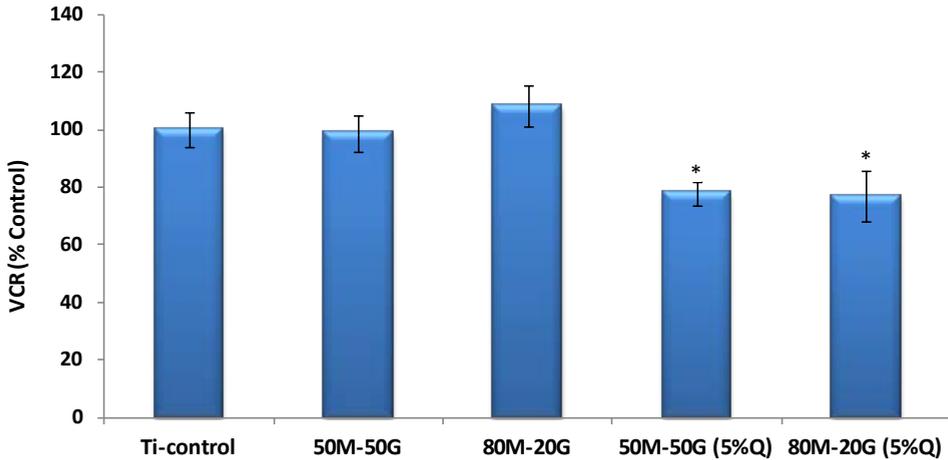


Figura 3.37: Estudio de la actividad bactericida de las superficies de los sistemas 50M-50G y 80M-20G base y con 5% quitosano.

Si bien la capacidad bactericida de estos recubrimientos depende de la formulación sintetizada, la presencia de quitosano favorece cierta actividad bactericida frente a las bacterias *Staphylococcus aureus*, disminuyendo la viabilidad celular bacteriana por debajo del 80%. Los materiales base no presentan ningún tipo de actividad bactericida, igualándose al control titanio en ciertos casos (50M-50G).

A pesar de ello, y como se ha documentado en la bibliografía²³, la actividad del quitosano es más bien bacteriostática, ya que altera la capacidad de proliferación de las células bacterianas sobre las superficies que forma, si bien no es suficientemente potente como para inhibir su total crecimiento o reducirlo en gran manera una vez adheridas las bacterias a su superficie. Por lo tanto, este comportamiento del quitosano está dentro de lo esperado.

Debido a los buenos resultados obtenidos, se decide realizar la síntesis de nuevos recubrimientos para obtener materiales de larga permanencia mediante la introducción de una pequeña cantidad de TEOS en las formulaciones. De este modo se sintetizan dos familias de híbridos con 3 alcóxidos y un 5% de quitosano y así, estudiar cómo afecta la introducción de un tercer precursor al carácter híbrido de la red y a la unión de la molécula de quitosano con la red polisiloxánica, así como al carácter bactericida del recubrimiento. En todos los casos, se cuenta siempre con el precursor GPTMS debido a la unión covalente que forma con la molécula de quitosano.

5. SÍNTESIS DE LOS RECUBRIMIENTOS QUITOSANO-[MTMOS-GPTMS-TEOS]

Tal y como se ha comentado, a la vista de los resultados obtenidos con los recubrimientos anteriores, y teniendo en cuenta estudios previos del grupo²⁴ se decidió incorporar una pequeña cantidad del precursor TEOS, y así aumentar la degradabilidad, la liberación de Si, y consecuentemente sus efectos positivos en la osteointegración¹⁰. Se eligió como sistema de partida el sistema ternario 35MTMOS-35GPTMS-30TEOS²⁴, que ha sido estudiado y completamente caracterizado en su formulación base, obteniéndose muy buenos resultados tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*. Por otra parte, y con el objetivo de minimizar la degradabilidad, se estudió otra formulación, en la que sólo se incorporó un 10% de TEOS, y que es la formulación 45MTMOS-45GPTMS-10TEOS.

Así, en todas las formulaciones se mantuvo la misma relación MTMOS-GPTMS, variando la proporción de TEOS, y el porcentaje de quitosano elegido para el estudio de estos materiales fue el 5% en peso respecto a los precursores (tabla 3.1), teniendo en cuenta los resultados que se han mostrado anteriormente, y la mayor facilidad de manejo debido a su viscosidad.

El método de síntesis seguido para obtener estos recubrimientos es el mismo que para los sistemas que no contenían TEOS en su formulación. La síntesis de los recubrimientos base se realiza añadiendo isopropanol como medio, los precursores y el agua acidificada para que comience la reacción. Tras esto se procede a la etapa de agitación (300 rpm) y a la etapa de gelificación, y finalmente se recubre el sustrato elegido y se somete al tratamiento térmico fijado. Al incorporar quitosano se realiza la prehidrólisis del mismo con el precursor GPTMS, realizando la síntesis sol-gel (Isopropanol, MTMOS, TEOS y HCl 0.1N) separadamente, y mezclando posteriormente ambas reacciones. En este caso, el tratamiento de curado será diferente en función del contenido en TEOS, y la temperatura de curado variará según dicha cantidad.

Las temperaturas y los tiempos de curado para ambos materiales (tanto para las formulaciones base como para las que incorporan quitosano) han sido fijados en trabajos previos del grupo de investigación obteniéndose buenos resultados, y son las siguientes: 35M-35G-30T (**80°C**, 2h) y 45M-45G-10T (**100°**, 2h)

6. RESULTADOS DE LOS RECUBRIMIENTOS QUITOSANO-[MTMOS-GPTMS-TEOS]

6.1. Ensayo de adherencia

Todos los materiales, muestran unas buenas características superficiales así como una gran adherencia al sustrato (desprendimiento 0 en el ensayo de corte por enrejado). En todos los casos se obtuvo un recubrimiento altamente transparente y homogéneo. No se han observado diferencias entre los materiales base y los materiales con quitosano por lo que en la figura 3.38 sólo se muestra la caracterización morfológica del sistema 45M-45G-10T base y con un 5% de quitosano.

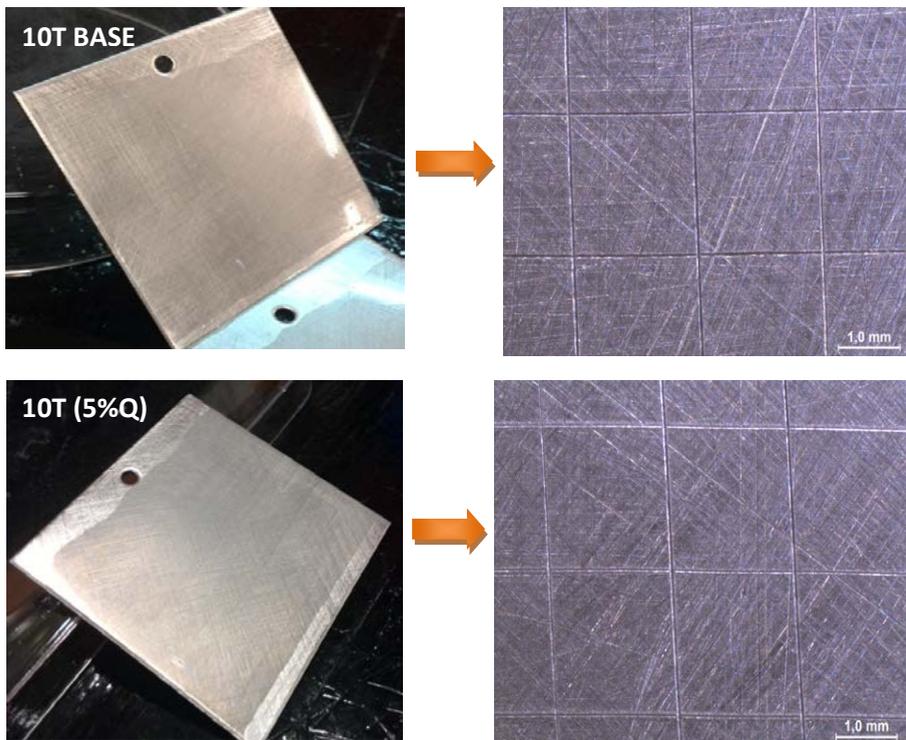


Figura 3.38: Caracterización morfológica de los sistemas triples 35M-35G-30T y 45M-45G-10T base y con 5%Q.

6.2. Caracterización química

La caracterización química de los materiales se lleva a cabo del mismo modo que en los casos anteriores.

6.2.1. Resonancia Magnética Nuclear del átomo de Silicio (^{29}Si -RMN)

Primeramente, se realiza el estudio de las etapas de hidrólisis y condensación que tiene lugar durante la síntesis mediante la técnica de RMN de ^{29}Si en estado líquido.

Como se ha explicado anteriormente la síntesis seguida varía si se trata de los materiales base o de los que incorporan quitosano, y por lo tanto la adquisición de los espectros de RMN es también diferente. En el caso de los sistemas base se obtienen los espectros de los precursores sin hidrolizar, y a continuación se añade el catalizador ($t=0\text{h}$) y se registran los espectros durante las dos horas siguientes (todo ello en el propio tubo de RMN).

Los espectros obtenidos para los sistemas base de ambos sistemas se muestran en las figuras 3.39 y 3.40.

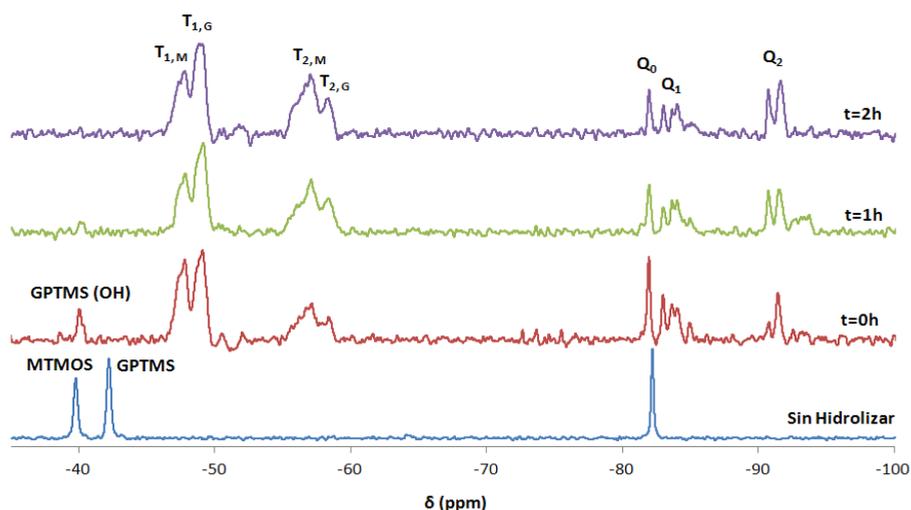


Figura 3.39: Espectro de ^{29}Si -RMN en estado líquido del sistema triple 35M-35G-30T base.

En el primer espectro se observan los picos correspondientes a los precursores sin hidrolizar, donde se muestran las tres señales correspondientes a los

tres precursores en su posición base. La señal a -40 ppm correspondiente al MTMOS, a -42 ppm correspondiente al GPTMS y a -82 ppm la correspondiente al TEOS. En el instante en el que se añade el catalizador, se obtiene el espectro $t=0h$ y aparecen ya las señales correspondientes a la hidrólisis y condensación de los precursores.

En el caso del MTMOS, desaparece la señal del precursor base y aparecen los picos asociados a sus especies condensadas, T_1 y T_2 . Ocurre lo mismo para el precursor GPTMS, aunque en este caso, al añadir el agua acidificada aparece también la señal de su especie hidrolizada GPTMS(OH), que disminuye en intensidad a medida que avanza la reacción, hasta llegar a desaparecer a $t=2h$.

Por último, en el caso del precursor TEOS, la señal asociada al precursor base permanece a la vez que aparecen las señales de la especie hidrolizada, TEOS (OH) y de las especies condensadas, Q_1 , Q_2 , y Q_3 . Del resultado de la hidrólisis y condensación de este precursor se obtiene que tras dos horas desde la adición del agua ácida, coexiste cierta cantidad de precursor sin reaccionar con las especies condensadas, lo que da idea de que reacciona más lentamente que los otros dos precursores.

En la figura 3.40 se muestra el espectro obtenido para el sistema 45M-45G-10T.

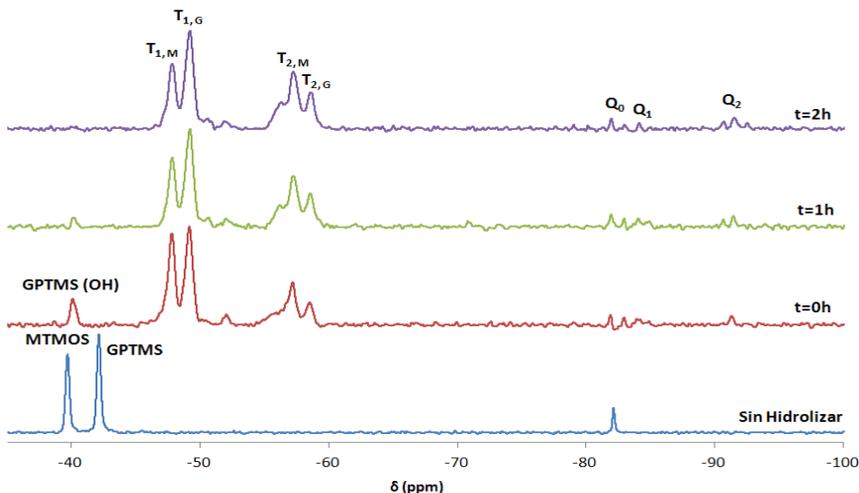


Figura 3.40: Espectro de ^{29}Si -RMN en estado líquido del sistema triple 45M-45G-10T base.

En el espectro del sistema 45M-45G-10T se observa el mismo comportamiento del sistema anterior. La diferencia más significativa entre ambos sistemas se encuentra en las señales derivadas del precursor TEOS. Debido a la pequeña proporción de éste en el sistema 45M-45G-10T, las señales asociadas a este precursor son de menor intensidad que en el caso anterior, aunque se puede observar como avanza la reacción a partir de la adición del agua ácida. De nuevo, observamos que a $t=0h$ aparecen las señales T_1 y T_2 de los precursores MTMOS y GPTMS, así como la señal de las especies hidrolizadas de éste último precursor GPTMS(OH).

Para el TEOS, se encuentran también su señal base Q_0 , y las de las especies de mayor grado de condensación Q_1 y Q_2 , llegando a observarse incluso la señal Q_3 .

En cuanto a los sistemas con quitosano, primero se obtiene el espectro del GPTMS sin hidrolizar para a continuación añadirlo sobre la disolución de quitosano en ácido acético al 2% en peso. En ese momento se obtiene el siguiente espectro, y tras las 2h de agitación, el siguiente. De esta manera, se obtiene el espectro de la mezcla antes de incorporar la síntesis sol-gel.

A continuación, se adquiere el espectro de la síntesis sol-gel de los otros dos precursores (MTMOS y TEOS) y el isopropanol como medio de reacción. Se obtiene el espectro de los precursores sin hidrolizar y tras esto se añade el agua ácida catalizadora para que dé comienzo la reacción. De nuevo se adquieren los espectros a $t=0h$ (justo al añadir el agua ácida) y posteriormente a 1 hora de reacción, y es en ese instante cuando se mezclan las dos disoluciones.

Por último se adquiere el espectro de la mezcla final a los 90 minutos de mezcla (pasado este tiempo se recubren los sustratos elegidos). Debido a la similitud entre ambas formulaciones, sólo se van a mostrar los resultados obtenidos para el sistema 45M-45G-10T con un 5% de quitosano.

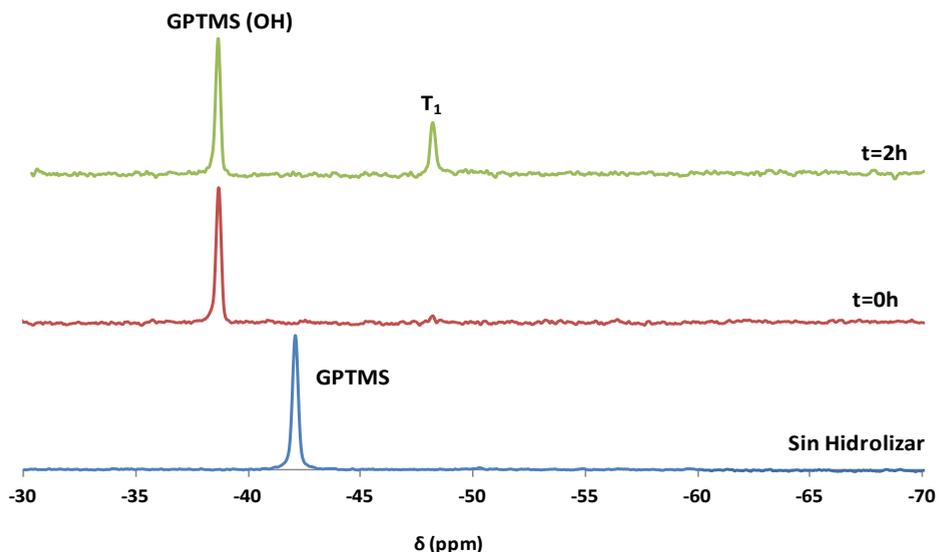


Figura 3.41: Espectro de ^{29}Si -RMN en estado líquido del precursor GPTMS en ácido acético con 5% de quitosano.

Tal y como se puede observar en la figura 3.41, en el primer espectro aparece únicamente la señal correspondiente al precursor GPTMS a -42 ppm. Tras la adición del GPTMS a la disolución de quitosano en ácido acético, esta señal desaparece, y se observan las señales de las especies hidrolizadas GPTMS(OH) a -39 ppm, y una señal muy pequeña correspondiente a la especie condensada T_1 a -49 ppm.

La especie GPTMS (OH) permanece hasta la segunda hora de reacción, y la señal T_1 aumenta en intensidad a lo largo del tiempo, lo que confirma el avance de la reacción. Todo esto indica que el ácido acético en el que está disuelto el quitosano es suficiente para hidrolizar al GPTMS, y por lo tanto podría favorecer la unión covalente entre el precursor y la molécula de quitosano.

A continuación, se muestran los espectros de la hidrólisis de los precursores MTMOS y TEOS en la figura 3.42. Tal y como se ha mencionado en el apartado 3.2.1, este espectro se adquiere en el propio tubo de RMN.

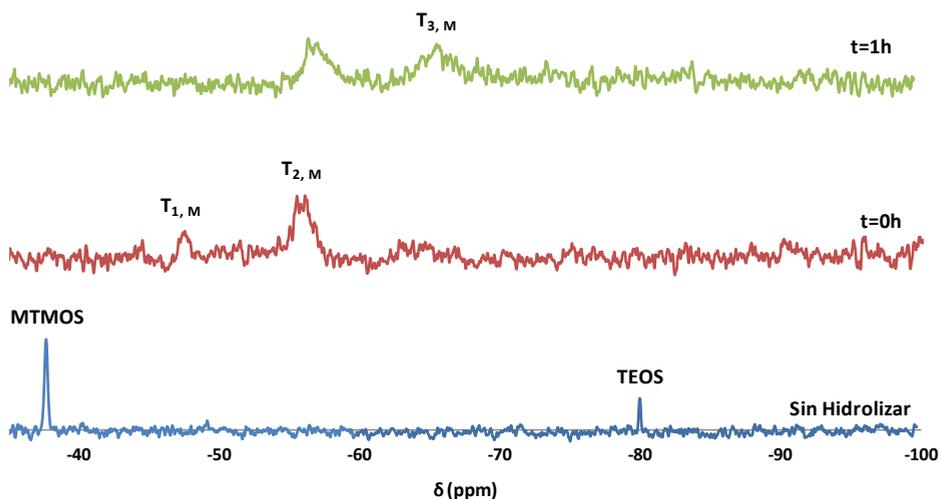


Figura 3.42: Espectro de ^{29}Si -RMN en estado líquido de los precursores MTMOS Y TEOS en medio ácido.

En el primer espectro los dos únicos picos que aparecen son los correspondientes a los dos precursores, a -40 ppm la del MTMOS y a -82 ppm la del TEOS. Al añadir el agua acidificada aparecen las señales de las especies condensadas únicamente del MTMOS, que son la señal T_1 a -47 ppm y la señal T_2 a -58 ppm. Estas señales aumentan en intensidad en el espectro adquirido a $t=1\text{h}$, donde además aparece también la señal debida a las especies más condensadas T_3 a -67 ppm.

Además, la señal de la posición base del precursor desaparece para dar lugar a una pequeña señal correspondiente a la especie hidrolizada MTMOS(OH) que desaparece a su vez a la hora de reacción.

En lo que respecta al precursor TEOS y debido a la pequeña proporción en la que se encuentra, sus señales quedan enmascaradas por el ruido propio del espectro de RMN. Aún así, se comprueba que la reacción avanza favorablemente y que se obtienen las señales de las especies más condensadas a $t=1\text{h}$, momento en el que se añade esta disolución a la disolución de quitosano con GPTMS.

Por último, se ha obtenido el espectro final de la mezcla, a los 90 minutos juntado las dos disoluciones (figura 3.43).

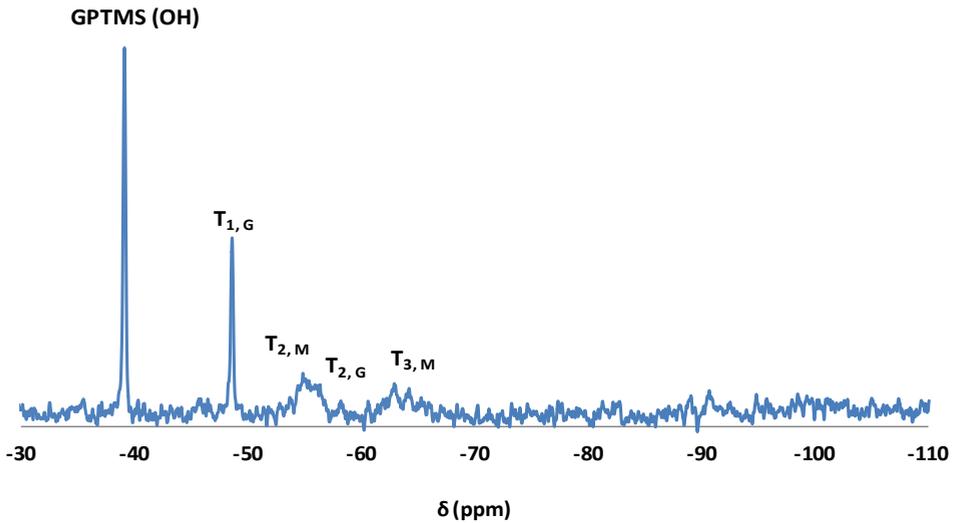


Figura 3.43: Espectro de ^{29}Si -RMN en estado líquido de la síntesis sol-gel final del sistema triple 45M-45G-10T con un 5% de quitosano.

En este espectro, se sigue observando la señal de las especies hidrolizadas del precursor GPTMS, lo que indica que la reacción de condensación se da de manera más lenta, probablemente, por la incorporación de la molécula de quitosano, que ralentiza la cinética de reacción. Además, se pueden observar las señales correspondientes a la especie T_1 de este precursor, así como una pequeña señal a -58 que podría deberse a las especies T_2 del GPTMS, y las señales T_2 y T_3 del MTMOS que ya se observaban también en el espectro de la síntesis sol-gel.

En cuanto al TEOS, debido a la pequeña proporción de éste en la síntesis, apenas se pueden diferenciar sus señales de las del ruido del espectro. En cualquier caso, la cinética de reacción es favorable, obteniéndose tras la reacción global especies de alto grado de condensación.

Para estudiar la red formada tras el curado, se utilizó la técnica de RMN de ^{29}Si en estado sólido. En la figura 3.44, se exponen los espectros de RMN de silicio en estado sólido para los 4 sistemas.

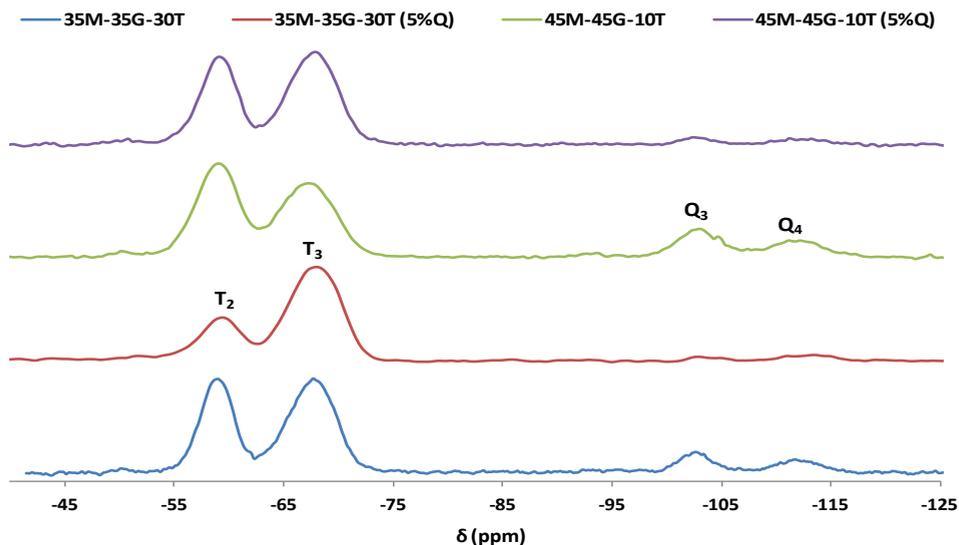


Figura 3.44: Espectro de ^{29}Si -RMN en estado sólido de los sistemas triples 35M-35G-30T y 45M-45G-10T base y con 5% de quitosano.

En todos los espectros se pueden observar las señales de las especies más condensadas de los precursores MTMOS y GPTMS, y en los espectros de los dos materiales que no contienen quitosano incluso los correspondientes a las especies más condensadas del TEOS, Q_3 y Q_4 . Esto indica que mediante la etapa de curado o tratamiento térmico, se promueven las reacciones de condensación, y la formación de los enlaces siloxano.

Los sistemas que incorporan quitosano tienen una mayor cantidad de especies condensadas T_3 que los base. En los espectros de RMN de líquidos se observó que en el caso del sistema híbrido con quitosano, la cantidad de grupos silanoles GPTMS(OH) sin reaccionar, era mucho mayor que en caso del sistema base. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos tras el tratamiento térmico de curado, se podría decir que estos grupos silanol sufren una condensación mayor por el efecto de la temperatura durante el proceso de curado, así como por la posible condensación de los mismos con los grupos hidroxilos de la molécula de quitosano.

De este modo, el entrecruzamiento de la red se ve acelerado en el caso de los híbridos con quitosano al compararlos con el sistema base.

6.2.2. Espectroscopia infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

Tras el estudio por RMN, se realizan los espectros Infrarrojos de los recubrimientos obtenidos tras su aplicación en molde de teflón y posterior tratamiento térmico. Los espectros se registran mediante la técnica de transmisión en pastilla de KBr y se realizan medidas en el intervalo de 4000-450 cm^{-1} . De este modo se constata la correcta formación de la red polisiloxánica tras el curado y el carácter híbrido de los recubrimientos obtenidos.

Los espectros obtenidos para los cuatro sistemas tanto bases como con la incorporación de un 5% de quitosano se muestran en la figura 3.45:

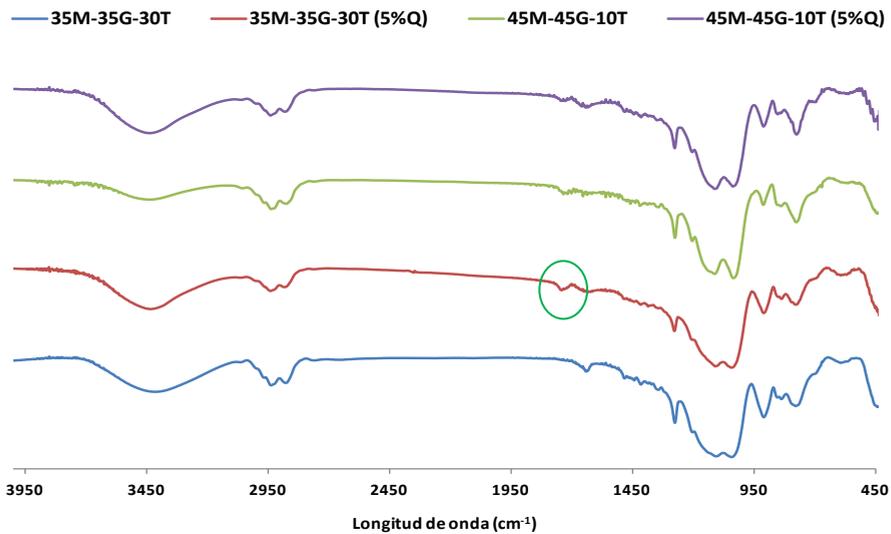


Figura 3.45: Espectro infrarrojo de los sistemas triples 35M-35G-30T y 45M-45G-10T base y con 5% de quitosano.

En todos los casos se observan las bandas debidas a la red polisiloxánica (1075 cm^{-1} , 1105 cm^{-1} y 760 cm^{-1}), lo que indica su correcta formación tras la etapa de curado, y las bandas debidas a la parte orgánica de los precursores, por ejemplo, las debidas al grupo metilo no hidrolizable del precursor MTMOS (2975 cm^{-1} y 1275 cm^{-1}). También aparecen las bandas debidas al precursor GPTMS, siendo la más intensa y visible la correspondiente al enlace C-O del anillo epoxi (910 cm^{-1}). Se observa también la banda a 2870 cm^{-1} debida a la vibración de tensión simétrica de los grupos metileno ($-\text{CH}_2$), de la cadena no hidrolizable de dicho precursor. No se

observan señales debidas al precursor TEOS debido a su carácter totalmente inorgánico con todos sus grupos hidrolizables.

En cuanto a las señales propias del quitosano, se observa, marcada en verde, a 1648 cm^{-1} , la banda de amida I, del enlace carbonilo del grupo funcional acetilo del quitosano (función de su grado de desacetilación). Esta señal aparece en los espectros de los materiales que incorporan dicha molécula lo que confirma la presencia de quitosano en los materiales finales.

6.3. Determinación del grado de hidrofilia/hidrofobia

La medida de los ángulos de contacto de los sistemas se lleva a cabo de la misma manera que en los casos anteriores, y se obtienen los resultados que se muestran en la figura 3.46.

Tabla 3.4: Valores del ángulo de contacto para los sistemas triples con un 5% de quitosano.

SISTEMA	ANGULO DE CONTACTO (°)
35M-35G-30T	63.8±1.8
50M-50G (5%Q)	75.4±1.1
80M-20G	69.0±1.0
80M-20G (5%Q)	85.6±0.2

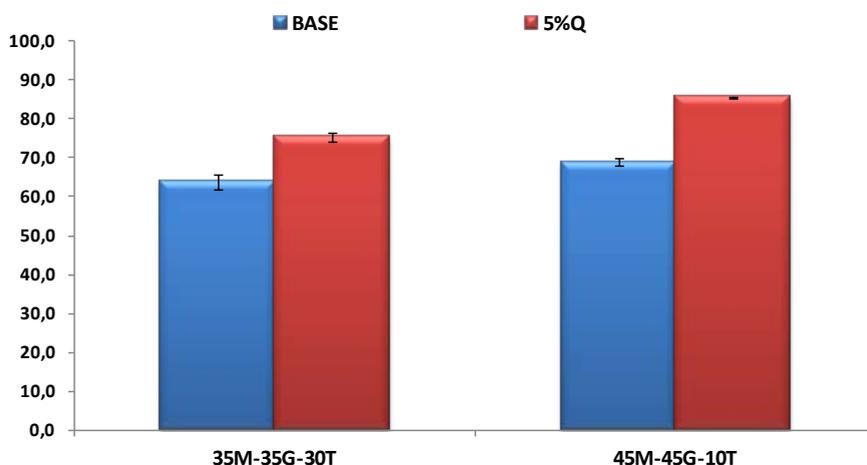


Figura 3.46: Valores del ángulo de contacto de los sistemas triples 35M-35G-30T y 45M-45G-10T base y con 5% de quitosano.

Como se observa en la tabla 3.4 y en la figura 3.46, la hidrofilia de los sistemas disminuye con la incorporación de quitosano en la red, tal y como se observaba para todos los sistemas binarios. Además, los sistemas con una mayor cantidad de TEOS son algo más hidrófilos, lo que puede deberse en primer lugar a la hidrofilia propia de este precursor, y, a que el sistema 45M-45G-10T sufre un tratamiento de curado más severo que el 35M-35G-30T, puesto que el primero cura a 100°C, mientras que el segundo lo hace a 80°C. Por lo tanto, y a pesar de ser ambos tratamientos térmicos adecuados para formar la red, la presencia de grupos silanoles en el recubrimiento 45M-45G-10T será menor, como se observaba en el estudio de RMN en estado sólido (figura 3.44).

6.4. Ensayo de degradación hidrolítica

Para estudiar la degradación hidrolítica de estos sistemas se recubren porta-objetos de vidrio mediante el método de *flow-coating*, y se curan en estufa. A continuación, se sumergen en agua destilada y se almacenan a 37°C durante un periodo de 63 días. Los resultados se obtienen como tanto por ciento de pérdida de peso del recubrimiento y se presentan en la figura 3.47.

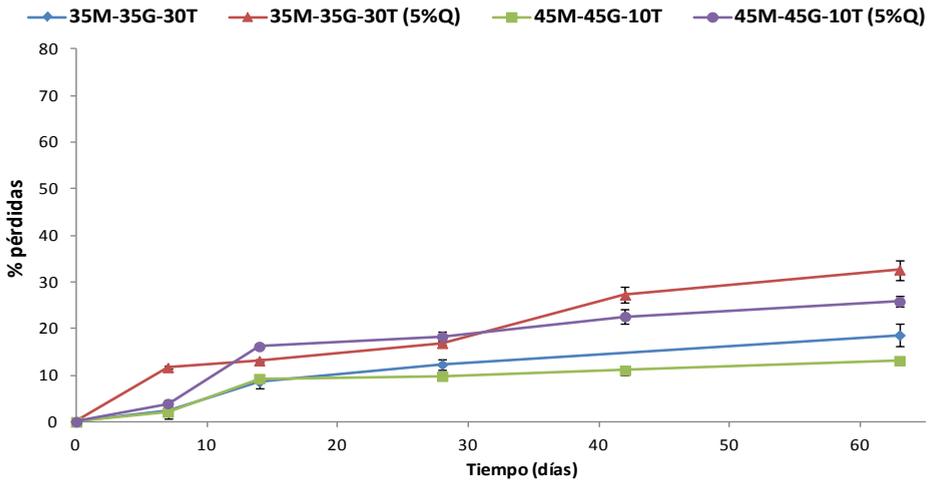


Figura 3.47: Degradación hidrolítica de los sistemas triples 35M-35G-30T y 45M-45G-10T base y con 5% de quitosano.

Al comparar los dos sistemas sin quitosano, como cabría esperar, el sistema que más contenido en TEOS tiene, el sistema 35M-35G-30T, es el que sufre una mayor degradación, lo que puede ser debido a que ha sido sometido a un

tratamiento térmico de curado menos severo (80°C), y, a la mayor proporción en su formulación de este precursor tan hidrófilo.

Al incorporar quitosano el comportamiento de los dos sistemas es similar. En ambos materiales, la incorporación del polímero hace que la degradación aumente respecto a los materiales base debido al gran tamaño de esta molécula que favorece la entrada de agua al interior y por lo tanto, las reacciones de hidrólisis y la posterior degradación.

En todos los materiales, la tendencia que sigue la degradación de los recubrimientos es similar, presentando una pérdida de peso más acentuada durante los primeros días (hasta la segunda semana de estudio) tras los cuales, la degradación se da de manera más gradual, llegando en todos los casos a no superar el 40% de pérdidas en dos meses.

6.5. Ensayo de liberación de silicio

Como se ha mencionado, una de las propiedades que se quiere obtener de estos materiales es que, además de tener una efectiva acción bactericida sean capaces de promover la creación de tejido óseo alrededor del implante, para lo cual es muy importante la liberación de agentes osteoinductores, como el ácido ortosilícico derivado de la degradación hidrolítica.

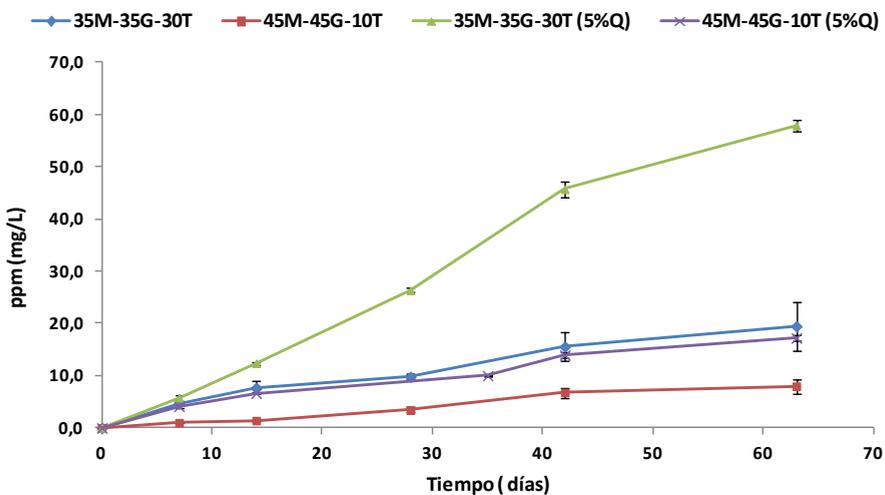


Figura 3.48: Liberación de silicio de los sistemas triples 35M-35G-30T y 45M-45G-10T base y con 5% de quitosano.

A la vista de los perfiles de liberación de Si (figura 3.47) se puede concluir por una parte, que la incorporación de quitosano favorece la liberación de Si, respecto a los sistemas base, sobre todo en el sistema que tiene un 30% de TEOS. Y por otra que, como era de esperar, la incorporación de más TEOS al material favorece la liberación de Si, tal y como se ha comprobado en otros estudios¹⁰. El efecto del quitosano puede ser debido a que la red contenga una mayor cantidad de canales tras el curado aumentando su porosidad, y por lo tanto, sea más fácil la entrada de agua al interior y la salida del silicio generado mediante la hidrólisis del recubrimiento. En cuanto al efecto del precursor TEOS, puede deberse a un efecto sinérgico de la alta hidrofiliía de este precursor, unido a la mayor porosidad de la red por la introducción de quitosano, dando como resultado la alta liberación de Si de este sistema 35M-35G-30T.

Las cinéticas de liberación son similares en casi todos los casos, con perfiles de liberación más constantes y estables, mientras que en el sistema 35M-35G-30T con quitosano la liberación aumenta de forma pronunciada a partir de la primera semana, llegando a altos valores de liberación. De nuevo, y como se ha comentado, esto podría deberse a un efecto sinérgico de la introducción de quitosano, y en este caso, de una mayor proporción del precursor TEOS, que aporta una gran hidrofiliía y una mayor degradabilidad.

6.6. Estudios *in vitro*

Se han realizado tres tipos de estudios *in vitro*, tanto en el caso de los materiales base como en el caso de los sistemas con 5% de quitosano. Estos ensayos son los mismos que en el caso de los sistemas binarios y se estudiarán, tanto la citotoxicidad de estos materiales, la medida de la adhesión y proliferación celular utilizando el ensayo de Alamar Blue, como su poder bactericida/bacteriostático mediante la determinación antibacteriana de las superficies. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

6.6.1. Medida de la viabilidad celular utilizando el ensayo de MTT.

Tal y como se ha explicado anteriormente la medida de la citotoxicidad de estos materiales se obtiene mediante el porcentaje de viabilidad celular de la línea celular de FBH, como se recoge en la norma ISO 10993-5.

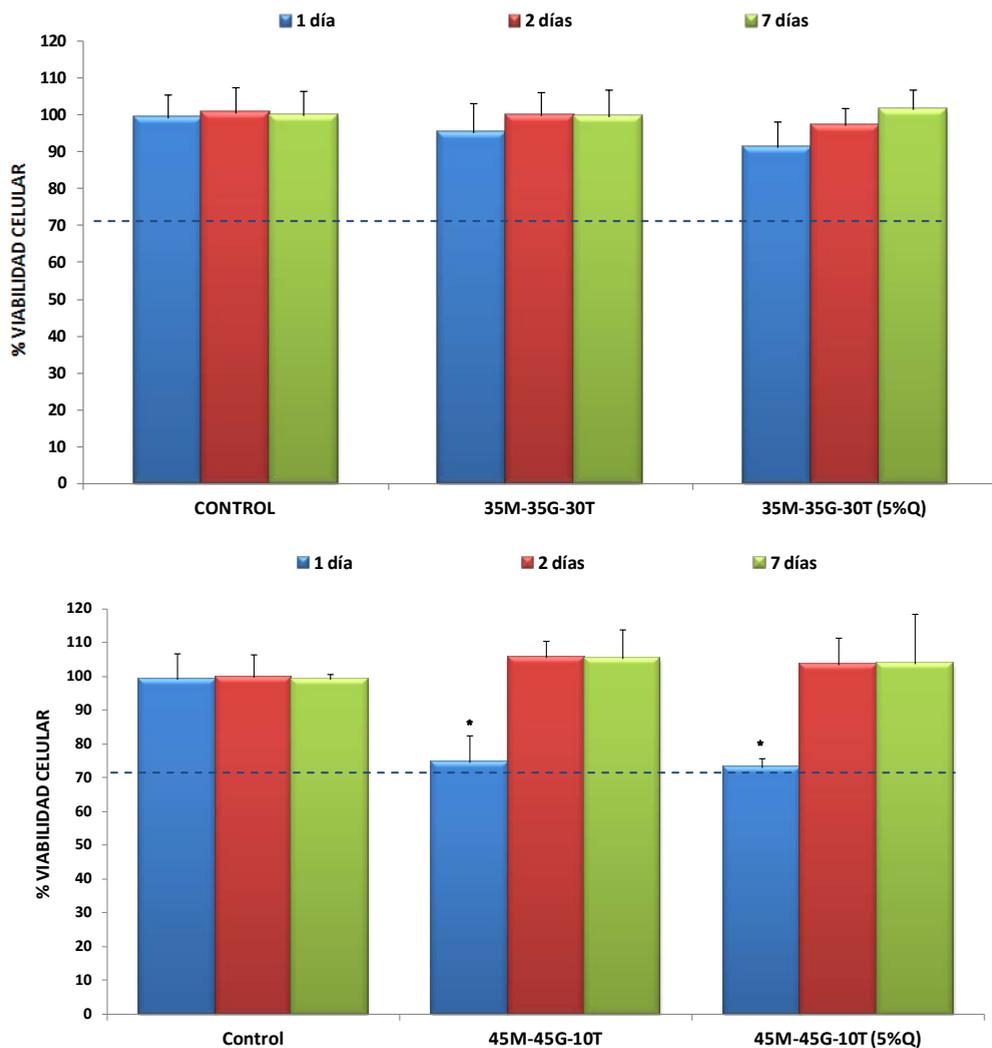


Figura 3.49: Viabilidad celular de los sistemas triples 35M-35G-30T y 45M-45G-10T base y con 5% de quitosano.

Los resultados de este ensayo se muestran en la figura 3.49. En ambos sistemas, tanto en las formulaciones base como en las que incorporan quitosano, se supera el valor del 70% de viabilidad celular, por lo que se puede afirmar que ninguno de los materiales presenta citotoxicidad. En el caso del sistema 45M-45G-10T, tanto en el material base como en el que incorpora quitosano, se observa un valor bastante bajo de viabilidad durante el primer día (cercano al 70%), pero este

valor aumenta considerablemente el segundo día y se mantiene hasta el séptimo día de estudio, por lo que se puede afirmar que no presenta toxicidad.

6.6.2. Medida de la adhesión y proliferación celular. Ensayo de Alamar Blue.

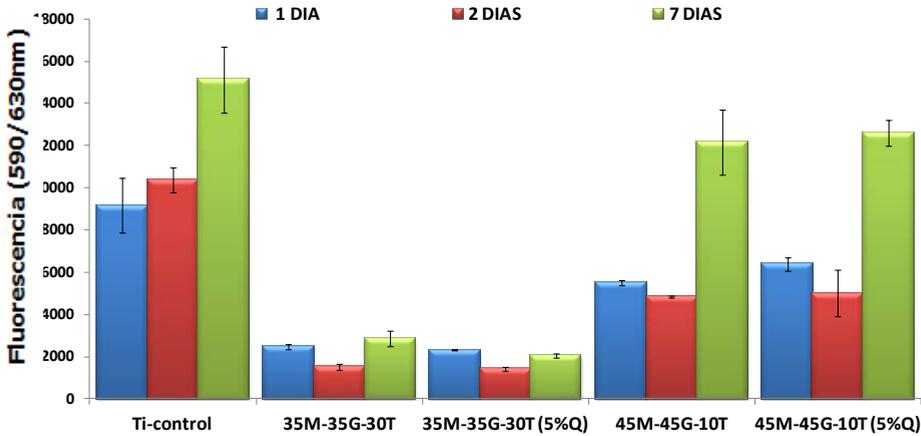


Figura 3.50: Adhesión y proliferación celular de los sistemas triples 35M-35G-30T y 45M-45G-10T base y con 5% de quitosano.

Los valores obtenidos para los ensayos de adhesión y proliferación se muestran en la figura 3.50.

En ninguno de los materiales sintetizados se obtienen valores de adhesión y proliferación superiores al del control. Como se ha explicado antes, este comportamiento tiene lugar por la disminución de la rugosidad superficial al recubrir los discos, ya que, esta rugosidad promueve la adhesión celular y su posterior proliferación. Sin embargo, al recubrir el disco, la rugosidad queda tapada por el recubrimiento (tal y como se ha mostrado anteriormente mediante imágenes de SEM).

Hay que destacar que en el caso del sistema 45M-45G-10T, la adhesión celular y la proliferación aumentan notablemente a medida que avanza el tiempo de ensayo, produciéndose un aumento progresivo en el número de células viables sobre la superficie de estos materiales, que se acentúa hasta los 7 días de ensayo.

Al comparar los sistemas entre ellos, se observa que el sistema 45M-45G-10T mejora significativamente la adhesión y proliferación celular respecto al 35M-35G-30T, tanto con la incorporación de quitosano como sin ella. Este comportamiento está relacionado en parte, con la diferente proporción de los precursores en los recubrimientos y quizás con la mayor degradabilidad de las formulaciones.

Con este sistema, el film se obtiene a partir de un tratamiento térmico menor, y la mayor cantidad de TEOS, además, favorece la hidrofilia de los sistemas y por tanto su degradación hidrolítica. Así, los materiales sufren una mayor pérdida de material y desprendimiento del film, y en consecuencia, las células adheridas a la superficie se eliminan junto con el recubrimiento, disminuyendo al ser contadas. Este es otro de los factores a tener en cuenta en la disminución de la adhesión y proliferación celular respecto al titanio control.

6.6.3. Determinación de la actividad antibacteriana de los materiales

Se ha estudiado la capacidad bactericida de los materiales mediante la determinación de la actividad antibacteriana de la superficie de los mismos, obteniéndose los resultados de la figura 3.51.

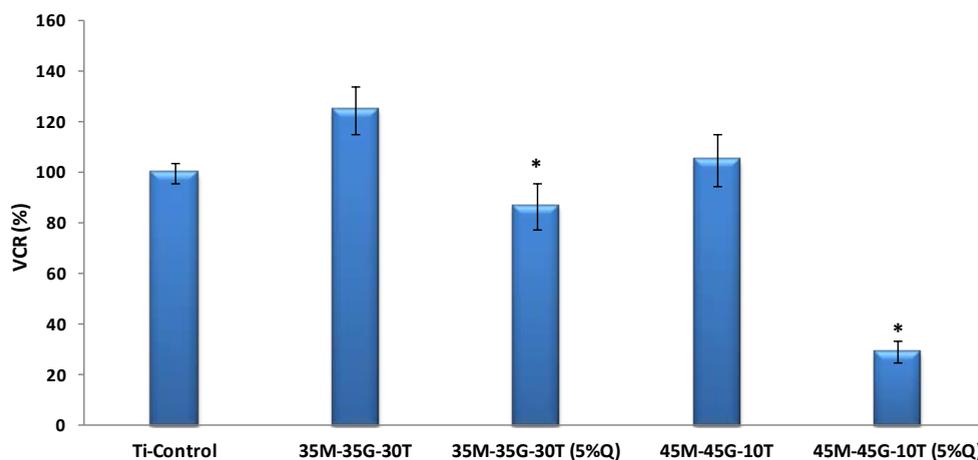


Figura 3.51: Capacidad bactericida de las superficies de los sistemas triples 35M-35G-30T y 45M-45G-10T base y con 5% de quitosano.

Se observa que el sistema 35M-35G-30T presenta una baja capacidad bactericida. Sin embargo, el sistema 45M-45G-10T con la incorporación de

quitosano, sí presenta actividad bactericida, erradicando una gran cantidad de bacterias de su superficie. Su capacidad antibacteriana es clara ya que las colonias bacterianas disminuyen hasta un 29%, no permitiendo el desarrollo de *Staphylococcus aureus* sobre su superficie.

7. Conclusiones

De los resultados obtenidos, y tal y como se ha demostrado mediante diversas técnicas de caracterización química, se obtiene para todos los casos un material híbrido con la molécula de quitosano incorporado a través de un enlace covalente en la estructura final del material. La incorporación de esta molécula en las formulaciones, aumenta la degradabilidad de los mismos y la liberación de silicio de los recubrimientos, comportamiento muy interesante para favorecer la osteointegración. Además, mediante la incorporación de quitosano, se pueden modular estas velocidades de degradación y liberación de silicio, sin comprometer la integridad de la red final.

En todos los casos, los materiales no son tóxicos, y todos ellos favorecen la adhesión y posterior proliferación celular a tiempos largos de ensayo.

A la vista de los resultados obtenidos y del objetivo que se pretendía lograr, el sistema que mejores resultados da como sistema de larga permanencia antibacteriano y a la vez osteoinductor, sería el sistema triple 45MTMOS-45GPTMS-10TEOS.

Esta formulación presenta una baja degradabilidad, una adecuada liberación de Silicio de manera gradual, no presenta citotoxicidad y la adhesión celular sobre su superficie es buena, aumentando con el tiempo de estudio. Por último, posee un marcado carácter antibacteriano.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rabea, E. I., Badawy, M. E. T., Stevens, C. V., Smagghe, G., & Steurbaut, W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 4(6), 1457-1465.
2. Wang, D., Romer, F., Connell, L., Walter, C., Saiz, E., Yue, S., & Jones, J. R. (2015). Highly flexible silica/chitosan hybrid scaffolds with oriented pores for tissue regeneration. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(38), 7560-7576.
3. Tay, F. R., Durán, G., Paula, A. J., & Durán, N. (2015). Advances in Dental Materials through Nanotechnology: Facts, Perspectives and Toxicological Aspects.
4. Vasilev, K., Michelmore, A., Griesser, H. J., & Short, R. D. (2009). Substrate influence on the initial growth phase of plasma-deposited polymer films. *Chem. Commun.*, (24), 3600-3602.
5. Tiller, J. C. (2010). Antimicrobial surfaces. In *Bioactive surfaces* (pp. 193-217). Springer Berlin Heidelberg.
6. Tiller, J. C., Liao, C. J., Lewis, K., & Klibanov, A. M. (2001). Designing surfaces that kill bacteria on contact. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(11), 5981-5985.
7. Al-Sagheer, F., & Muslim, S. (2010). Thermal and mechanical properties of chitosan/SiO₂ hybrid composites. *Journal of Nanomaterials*, 2010, 3.
8. Connell, L. S., Romer, F., Suárez, M., Valliant, E. M., Zhang, Z., Lee, P. D., Smith, M.D; Hanna, J.V & Jones, J. R. (2014). Chemical characterisation and fabrication of chitosan–silica hybrid scaffolds with 3-glycidoxypropyl trimethoxysilane. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(6), 668-680.
9. Reffitt, D. M., Ogston, N., Jugdaohsingh, R., Cheung, H. F. J., Evans, B. A. J., Thompson, R. P. H., & Hampson, G. N. (2003). Orthosilicic acid stimulates collagen type 1 synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells in vitro. *Bone*, 32(2), 127-135.
10. Shirotsaki, Y., Tsuru, K., Hayakawa, S., Nakamura, Y., Gibson, I. R., & Osaka, A. (2011). Effects of Si (IV) released from chitosan-silicate hybrids on proliferation and

differentiation of MG63 osteoblast cells. *Bioceramics Development and Applications*, 1.

11. Desarrollo de recubrimientos híbridos bioactivos para implantes dentales. María Jesús Juan Díaz. Universidad del País Vasco.

12. Juan-Díaz, M. J., Martínez-Ibáñez, M., Lara-Sáez, I., da Silva, S., Izquierdo, R., Gurruchaga, M., & Suay, J. (2016). Development of hybrid sol-gel coatings for the improvement of metallic biomaterials performance. *Progress in Organic Coatings*.

13. Davis, S. R., Brough, A. R., & Atkinson, A. (2003). Formation of silica/epoxy hybrid network polymers. *Journal of non-crystalline solids*, 315(1), 197-205.

14. Hoebbel, D., Nacken, M., & Schmidt, H. (1998). A NMR study on the hydrolysis, condensation and epoxide ring-opening reaction in sols and gels of the system glycidoxypropyltrimethoxysilane-water-titaniumtetraethoxide. *Journal of sol-gel science and technology*, 12(3), 169-179.

15. Silva, S. M., Braga, C. R., Fook, M. V., Raposo, C. M., Carvalho, L. H., & Canedo, E. L. (2012). Application of infrared spectroscopy to analysis of chitosan/clay nanocomposites. *Infrared Spectroscopy—Materials Science, Engineering and Technology*, 43-62.

16. Peniche, C., Argüelles-Monal, W., Davidenko, N., Sastre, R., Gallardo, A., & San Román, J. (1999). Self-curing membranes of chitosan/PAA IPNs obtained by radical polymerization: preparation, characterization and interpolymer complexation. *Biomaterials*, 20(20), 1869-1878.

17. Zolkov, C., Avnir, D., & Armon, R. (2004). Tissue-derived cell growth on hybrid sol-gel films. *Journal of Materials Chemistry*, 14(14), 2200-2205.

18. Rupp, F., Gittens, R. A., Scheideler, L., Marmur, A., Boyan, B. D., Schwartz, Z., & Geis-Gerstorfer, J. (2014). A review on the wettability of dental implant surfaces I: theoretical and experimental aspects. *Acta biomaterialia*, 10(7), 2894-2906.

19. Gristina, A. G. (1987). Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science*, 237(4822), 1588-1595.

20. Salvi, G. E., Fürst, M. M., Lang, N. P., & Persson, G. R. (2008). One-year bacterial colonization patterns of *Staphylococcus aureus* and other bacteria at implants and adjacent teeth. *Clinical oral implants research*, 19(3), 242-248.
21. Harris, L. G., & Richards, R. G. (2004). *Staphylococcus aureus* adhesion to different treated titanium surfaces. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 15(4), 311-314.
22. Deligianni, D. D., Katsala, N. D., Koutsoukos, P. G., & Missirlis, Y. F. (2001). Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. *Biomaterials*, 22(1), 87-96.
23. Paladini, F., Pollini, M., Sannino, A., & Ambrosio, L. (2015). Metal-based antibacterial substrates for biomedical applications. *Biomacromolecules*, 16(7), 1873-1885.
24. Martínez-Ibañez, M; Development of osteoinductive Si-based coatings to improve dental implants' performance, Universidad del País Vasco, 2015.

Capítulo 4

Recubrimientos con nitrato de plata como agente bactericida

CAPÍTULO 4

RECUBRIMIENTOS CON NITRATO DE PLATA COMO AGENTE BACTERICIDA.

1. Introducción.....	165
2. Síntesis de los recubrimientos.....	166
3. Resultados.....	167
3.1. Caracterización morfológica.....	167
3.1.1. Ensayo de adherencia.....	167
3.1.2. Caracterización mediante Microscopía Electrónica de Barrido.....	169
3.2. Caracterización química.....	174
3.2.1. Resonancia Magnética Nuclear del átomo de Silicio (^{29}Si -RMN).....	174
3.2.2. Espectroscopia infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR).....	182
3.3. Determinación del grado de hidrofilia/hidrofobia.....	184
3.4. Ensayo de degradación hidrolítica.....	185
3.5. Ensayo de liberación de silicio (ICP).....	187
3.6. Ensayo de liberación de plata (ICP).....	189
3.7. Ensayos <i>In Vitro</i>	190
3.7.1. Medida de la viabilidad celular utilizando el ensayo de MTT.....	191
3.7.2. Medida de la adhesión y proliferación celular (Alamar Blue).....	191
3.7.3. Determinación de la actividad antibacteriana de los materiales.....	192
4. Conclusiones.....	193
Bibliografía.....	195

1. INTRODUCCIÓN

En este capítulo se va a desarrollar una familia de recubrimientos con capacidad de liberación de un potente agente antibacteriano como es la plata, con el objetivo de erradicar infecciones bacterianas tras la colocación de un implante.

Tal y como se ha comentado en la introducción, la plata se conoce como agente bactericida desde tiempos remotos^{1, 2}, y ha sido ampliamente estudiada y utilizada debido a dos de sus propiedades características. La primera es la gran variedad de microorganismos que es capaz de erradicar (bacterias, hongos y levaduras), y la segunda y más importante, es su capacidad para evitar que algunas cepas bacterianas creen resistencia frente a ella. Por estas razones es el agente terapéutico de elección en el curado de quemaduras y heridas infectadas.

En este capítulo se elige la plata, concretamente el nitrato de plata (AgNO_3) como agente biocida. Se ha elegido esta sal como precursor de los iones plata por su fácil disociación en iones plata (Ag^+) e iones nitrato (NO_3^-) en contacto con el agua. Estos Ag^+ son los que poseen la acción bactericida³, que se basa en que estos iones liberados reaccionan con las proteínas bacterianas por combinación con los grupos tiol (-SH) de las enzimas bacterianas, lo que conduce a la inactivación de estas proteínas y a la muerte bacteriana^{4, 5}.

En este caso se busca la liberación controlada de los iones Ag^+ , por lo que para desarrollar este estudio, se eligen dos formulaciones distintas de recubrimientos con buenas propiedades, sobre todo respecto a su comportamiento *in vitro* e *in vivo*, en el que demuestran su carácter osteoinductor, y que han sido caracterizadas en anteriores trabajos de investigación de este grupo. Estos sistemas son, el sistema 70MTMOS-30TEOS y el sistema 35MTMOS-35GPTMS-30TEOS^{6, 7}.

El sistema 70M-30T base ha resultado totalmente biocompatible en estudios *in vivo* y además tiene capacidad para inducir la formación de hueso e incluso mejorar el comportamiento del titanio en el primer periodo tras la implantación. En cuanto al sistema 35M-35G-30T, ya comentado en el capítulo anterior, se ha comprobado que la introducción del precursor GPTMS en la formulación acelera notablemente la cinética de liberación de silicio de los recubrimientos obtenidos dando lugar, posiblemente, a una mejora de la osteoinducción de los mismos.

Teniendo en cuenta las propiedades de estos recubrimientos, se eligen como materiales base para el desarrollo de sistemas con capacidad de liberación de plata, para su actuación como recubrimientos bactericidas, pero además con carácter osteoinductor. Para este fin, se han añadido diferentes cantidades de AgNO_3 , estudiando las formulaciones que aparecen en la tabla 4.1.

Tabla 4.1: Proporciones de AgNO_3 utilizadas y nomenclatura de las muestras.

Nomenclatura	%MTMOS	%TEOS	% AgNO_3
70M-30T			0%
70M-30T (1% AgNO_3)	70	30	1%
70M-30T (5% AgNO_3)			5%

Nomenclatura	%MTMOS	%GPTMS	%TEOS	% AgNO_3
35M-35G-30T				0%
35M-35G-30T (1% AgNO_3)	35	35	30	1%
35M-35G-30T (5% AgNO_3)				5%

2. SINTESIS DE LOS RECUBRIMIENTOS

Tanto para los sistemas binarios como para los ternarios, la síntesis sol-gel se ha llevado a cabo mediante catálisis ácida, utilizando ácido nítrico (HNO_3) 0.1 N como catalizador. Ésta, tal y como se ha explicado en el capítulo 2, sigue el esquema mostrado en la figura 4.1.

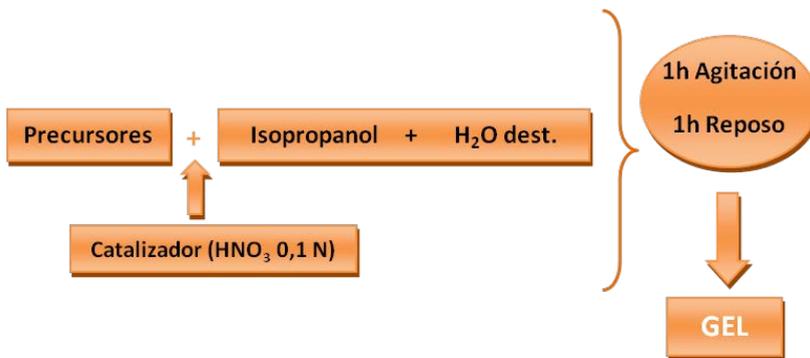


Figura 4.1. Esquema de la síntesis para los recubrimientos base.

En el caso de la síntesis de los recubrimientos cargados con 1% y 5% de AgNO_3 , se utiliza como disolvente, además de isopropanol, agua destilada puesto que esta sal es muy soluble en agua. Por tanto, la cantidad necesaria de disolvente se reparte en mitad isopropanol, mitad agua destilada, de esta forma se consigue un medio para disolver el nitrato de plata (agua) junto con un medio para disolver los precursores (alcohol).

En primer lugar, se disuelve el AgNO_3 en la cantidad correspondiente de agua destilada. Una vez que está bien disuelto se añade una cantidad idéntica de isopropanol junto con los precursores, y se sigue el mismo proceso que en el caso de los recubrimientos base. A continuación se muestra el esquema de la síntesis (Figura 4.2).

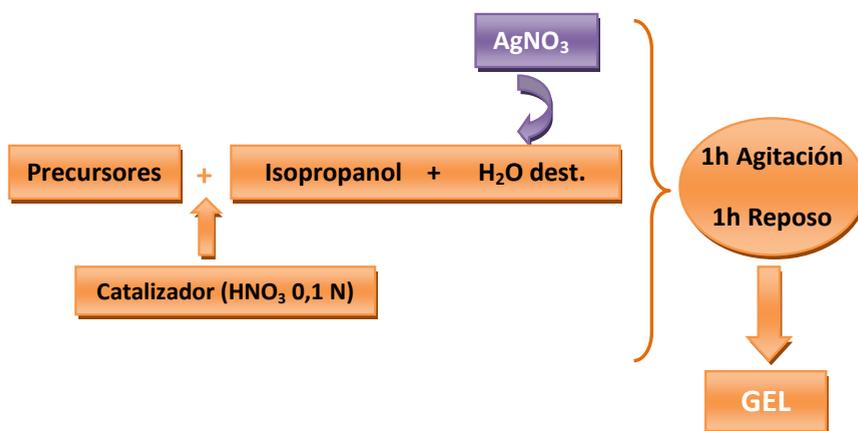


Figura 4.2. Esquema de la síntesis para los recubrimientos cargados con plata.

3. RESULTADOS

3.1. Caracterización morfológica y ensayo de adherencia

3.1.1 Ensayo de adherencia

En primer lugar, para determinar la adherencia de los recubrimientos con y sin plata sobre el sustrato metálico se ha realizado el ensayo de corte por enrejado. Para ello, se han recubierto placas de acero con los diferentes sistemas.

Todos los recubrimientos presentan buenas propiedades superficiales (uniformidad, ausencia de grietas, transparencia y brillo), exceptuando el sistema

triple 35M-35G-30T con un 5% de AgNO_3 que muestra tras el curado una coloración amarilla oscura debido a la posible formación de nanopartículas⁵. En la Figura 4.3 se muestran el sistema 70M-30T y el sistema 35M-35G-30T cargados con un 5% de AgNO_3 .

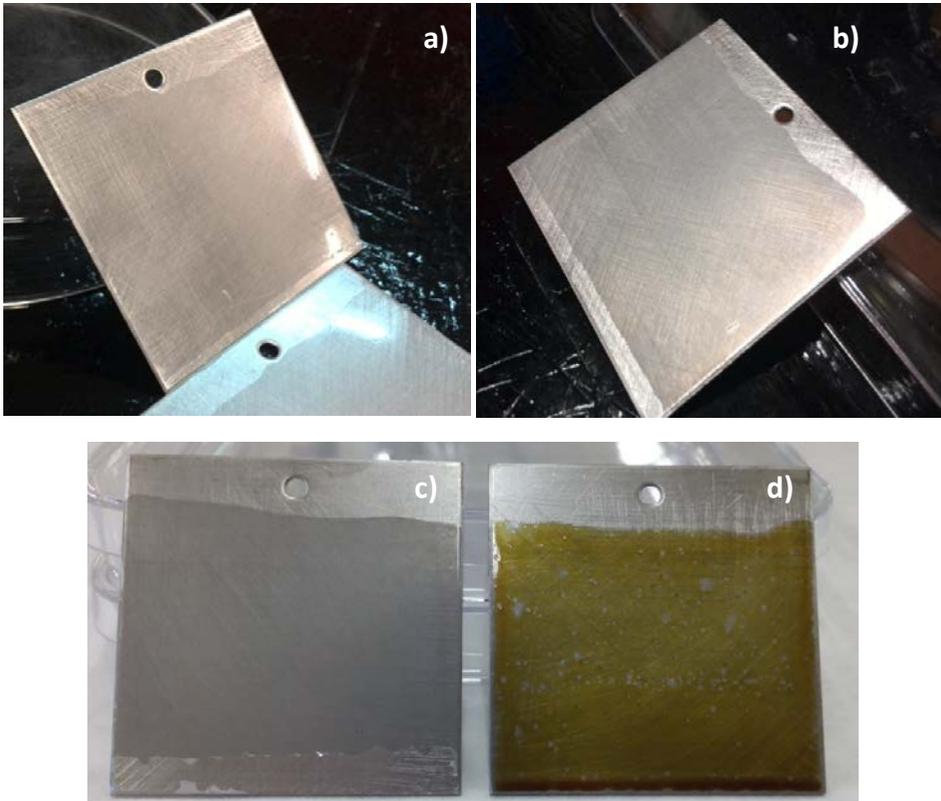


Figura 4.3. Recubrimientos de los sistemas 70M-30T (a) y 35M-35G-30T (b) y los mismos con un 5% de AgNO_3 (c y d respectivamente).

A continuación en las figuras 4.4 y 4.5 se muestran las imágenes obtenidas mediante el microscopio óptico ambos sistemas, tanto de los sistemas base como de los sistemas que incorporan el nitrato de plata.

Como se ha explicado anteriormente, tras la realización de los cortes de forma perpendicular y después de retirar la cinta adhesiva, se comprueba la cantidad de material perdido para cada sistema y se observa la superficie con un microscopio óptico.

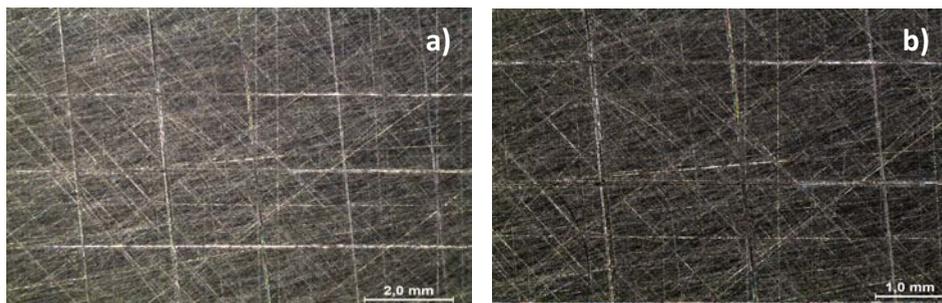


Figura 4.4. Ensayo corte por enrejado para los sistemas base 70M-30T (a) y 35M-35G-30T (b).

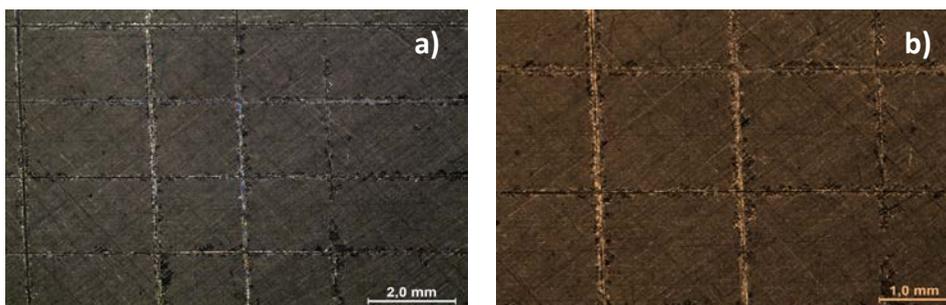
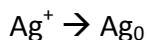


Figura 4.5. Ensayo corte por enrejado para los sistemas 70M-30T (a) y 35M-35G-30T (b) con un 5% de nitrato de plata.

Todos los recubrimientos, presentan buena adhesión y no se observa desprendimiento notable del material (desprendimiento 0 o 1). Por tanto, se puede afirmar que los recubrimientos obtenidos se adhieren perfectamente al sustrato metálico.

3.1.2. Caracterización mediante Microscopía Electrónica de Barrido

En el caso del sistema triple 35M-35G-30T con ambos porcentajes de plata se observa además, una coloración amarilla oscura de los sustratos recubiertos. En la bibliografía se atribuye esta coloración a una posible formación de nanopartículas, debido a una reducción térmica de los iones Ag^+ , mediante la siguiente reacción⁵.



Para determinar si en este caso esta coloración se debe también a la formación de nanopartículas, se realizó un estudio morfológico comenzando con un barrido en el UV-VIS, de la disolución tras el tratamiento térmico (80 °C, 30 min). En el espectro

UV-VIS se observó la aparición de dos bandas (Figura 4.6). La banda más intensa a aprox. 305 nm se atribuye a clusters o agregados (Ag_2^+)⁸. La banda más ancha y menos intensa a aproximadamente 420 nm se asocia con la absorción de plasma o plasmón característica de las nanopartículas de plata^{9, 10, 11, 12}.

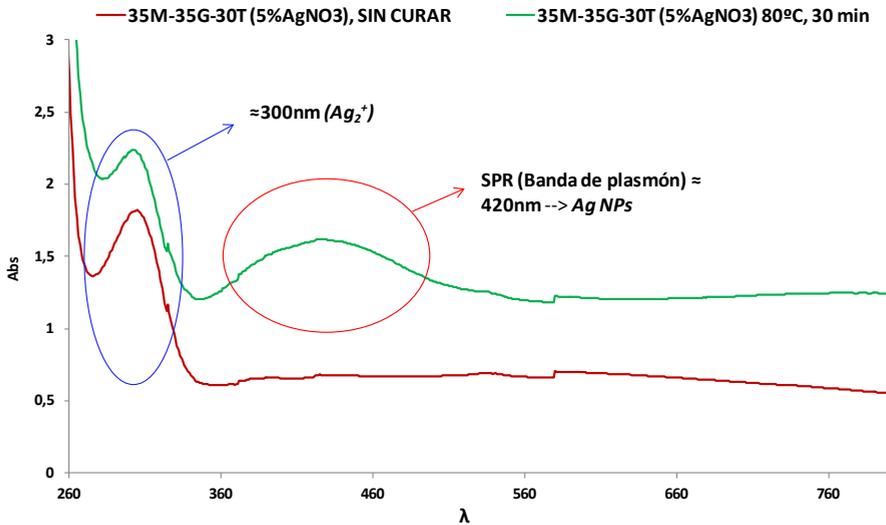
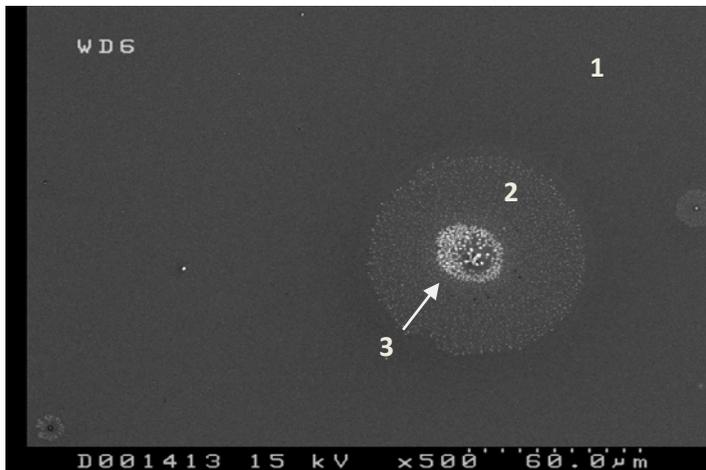


Figura 4.6. Espectro UV-VIS del sistema 35M-35G-30T +5% $AgNO_3$.

Para confirmar la existencia de las nanopartículas y los clusters de plata en el recubrimiento se recubrieron porta-objetos de vidrio para observar los films al Microscopio Electrónico de barrido (SEM). Tras su análisis, se observaron tres zonas diferenciadas (Figura 4.7).



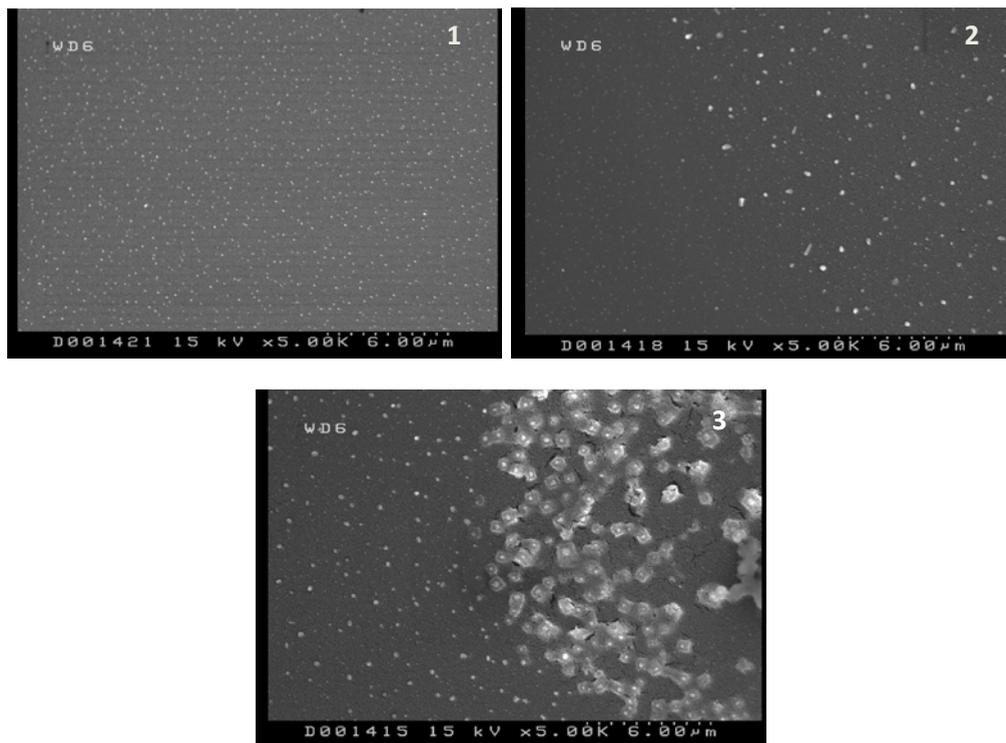


Figura 4.7: Micrografías obtenidas por SEM del sistema 35M-35G-30T +5% AgNO₃.

Tal y como se aprecia en las imágenes obtenidas por SEM, la parte mayoritaria del recubrimiento está compuesta por partículas de plata dispersas por la superficie (1). En algunas zonas del recubrimiento esas partículas forman acumulaciones o clusters de plata. En el interior de estos clusters se encuentra una gran acumulación de plata (3) y hacia el exterior los agregados son mucho más pequeños (2).

Tras el estudio de los recubrimientos por SEM, las muestras se analizaron también mediante también la Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), debido a su mayor resolución^{10, 11}. El equipo utilizado es un Microscopio Electrónico de Transmisión TECNAI G2 20 TWIN (FEI), operando con un voltaje de 200kV y equipado con un accesorio EDAX EDS. Para el análisis de la muestra se deposita una gota de la solución a estudiar sobre un film de carbono en una rejilla de cobre. El fundamento de esta técnica es el mismo que en el caso del microscopio electrónico de barrido (SEM), pero en este caso de los electrones que inciden sobre la superficie, atraviesan la muestra.

Para la caracterización de las muestras por TEM, es necesario aislar las nanopartículas formadas tras el tratamiento térmico (80°C durante 30 minutos), para lo que se centrifuga repetidas veces la disolución obtenida hasta la obtención de las mismas¹⁰. A continuación, se realizan disoluciones de concentración conocida, que se colocan sobre la rejilla del TEM para su análisis.

En la figura 4.8 se muestran las imágenes de TEM obtenidas de la síntesis con mayor porcentaje de plata (5% AgNO_3).

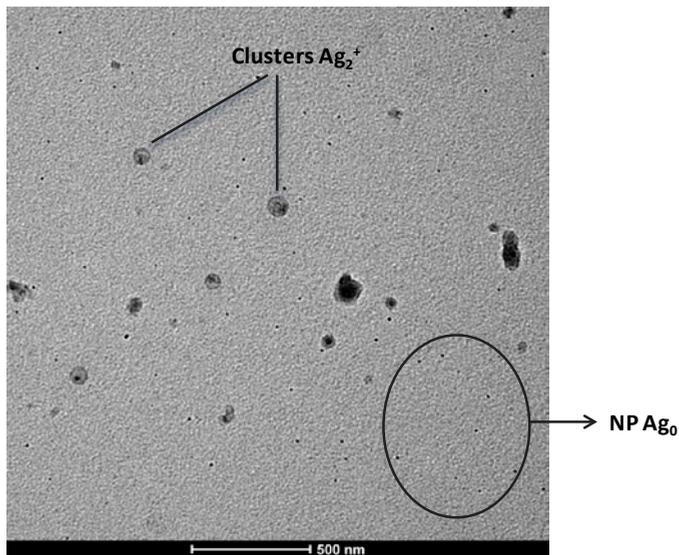


Figura 4.8: Micrografía obtenida por TEM del sistema 35M-35G-30T +5% AgNO_3 .

Como puede observarse en la figura 4.8, se confirma la presencia de las nanopartículas y los clusters de plata en la muestra. Los puntos negros esféricos que se observan en la micrografía corresponden a las nanopartículas de plata, que tienen un tamaño de aproximadamente 14 nm. Los círculos oscuros más grandes son los clusters.

Se realizó también un mapeo o análisis elemental de la muestra mediante dos análisis EDX, uno de ellos de la muestra en cuestión, y el otro del fondo, es decir, en un punto cualquiera de la rejilla donde se colocan las muestras a analizar. El análisis por EDX se basa en la excitación de la muestra con el haz de electrones, lo que provoca saltos de electrones entre los orbitales del átomo de la misma. Estos saltos crean unos fotones o rayos x, y en función de los niveles de los saltos tendrán una

energía, siendo ésta la que se detecta en el EDX. Los resultados obtenidos se muestran a continuación (figuras 4.9 y 4.10).

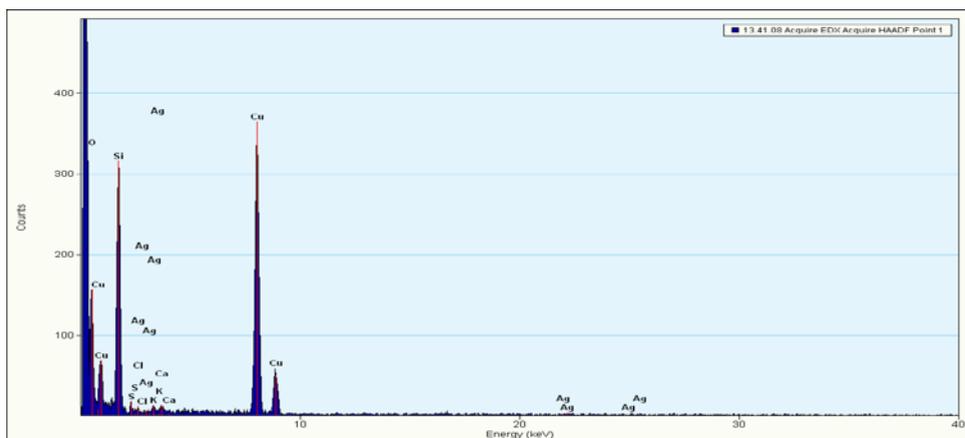


Figura 4.9: Resultados obtenidos del análisis elemental de la muestra (fondo de la muestra).

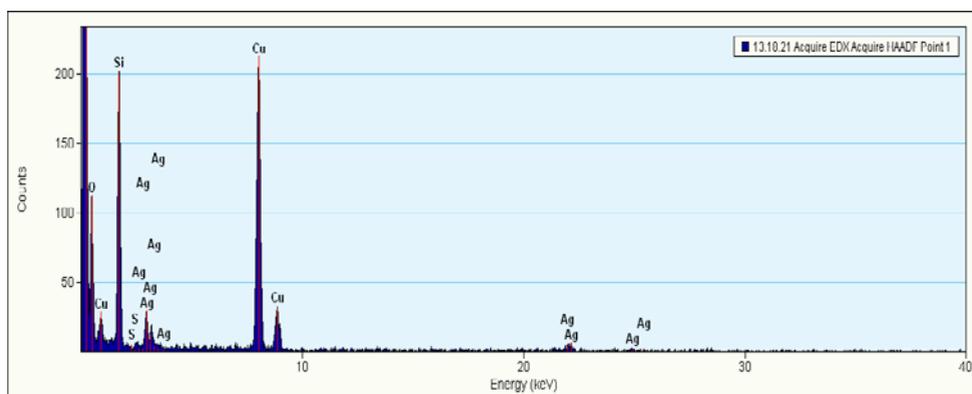


Figura 4.10: Resultados obtenidos del análisis elemental de la muestra (nanopartícula de la muestra).

Al observar ambas figuras, se ve que en tanto en el fondo de la muestra como en el análisis de una de las nanopartículas aparecen señales debidas a la plata. Esto confirma que, efectivamente las nanopartículas de los materiales son de plata. La aparición de varias señales asociadas a la plata se debe a los diferentes saltos de energía o transiciones de los electrones de una capa a otra del átomo de plata. De este modo, las señales más intensas se deben a las transiciones o saltos más probables, y el resto de señales tiene lugar debido a otras transiciones posibles, de diferente energía.

Por último, en ambas figuras se aprecia la presencia de cobre, que es debida a la rejilla en la que se colocan las muestras a analizar, así como pequeñas trazas de otros elementos que se deben a impurezas atrapadas en la rejilla de cobre de muestras anteriores.

3.2. Caracterización química

3.2.1. Resonancia Magnética Nuclear del átomo de Silicio (^{29}Si -RMN)

Al igual que en los capítulos anteriores, primeramente, la técnica de ^{29}Si -RMN en estado líquido se ha utilizado para hacer un seguimiento de las especies que se van formando a medida que transcurren las reacciones de hidrólisis y policondensación durante el proceso sol-gel. Para ello, se mezclan los precursores y el alcohol en el propio tubo de RMN y se registra el espectro de los precursores sin hidrolizar. En el caso de los sistemas sintetizados con plata se añade también el agua con el AgNO_3 disuelto. A continuación, se añade el ácido para que se den las reacciones de hidrólisis y condensación y se registran espectros a cada hora (considerando tiempo cero al primer espectro que se obtiene tras la adición del ácido). En las figuras 4.11, 4.12 y 4.13 se muestran los espectros de ^{29}Si -RMN de líquidos obtenidos para el sistema 70M-30T sin plata y con su incorporación.

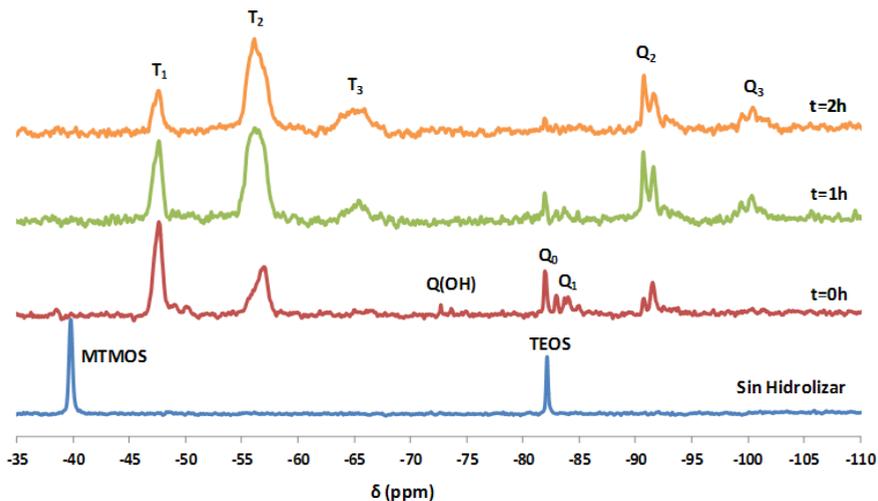


Figura 4.11. Espectro ^{29}Si -RMN del sistema 70M-30T.

En el primer espectro, espectro de la mezcla de los dos precursores MTMOS y TEOS en isopropanol sin hidrolizar aparecen dos señales: a -40 ppm la

correspondiente al precursor MTMOS y a -82 ppm la correspondiente al precursor TEOS. En el instante en el que se añade el agua ácida, se adquiere el espectro a $t=0h$ y se observa como aparecen las señales asociadas a los productos obtenidos en la hidrólisis y condensación de los precursores.

En el caso del MTMOS, desaparece totalmente la señal asociada al precursor y aparecen los picos asociados a las especies condensadas T_1 y T_2 . Una hora después de la adición del agua ácida, la intensidad de la señal T_1 disminuye, mientras que la de la señal T_2 aumenta e incluso aparece la señal asociada a las especie T_3 . Así, al igual que en el sistema ternario, se obtienen todas las especies condensadas posibles T_1 , T_2 (la más abundante) y T_3 .

En el caso del TEOS, se observa como la señal asociada al precursor permanece y aparecen a $t=0h$ un pequeña señal asociada a especies hidrolizadas TEOS(OH) de baja intensidad y a especies condensadas Q_1 y Q_2 . La señal asociada a las especies hidrolizadas desaparece a $t=1h$. A medida que transcurre la reacción, las señales correspondientes al precursor y a la especie Q_1 van disminuyendo, mientras que la intensidad de la señal Q_2 aumenta significativamente y aparece la correspondiente a la señal Q_3 . Del resultado de la hidrólisis y condensación de este precursor se obtiene que tras dos horas de hidrólisis, desde la adición del agua ácida, coexisten el precursor sin reaccionar con las especies Q_2 y Q_3 , aunque la presencia de TEOS es insignificante respecto a la de las especies condensadas.

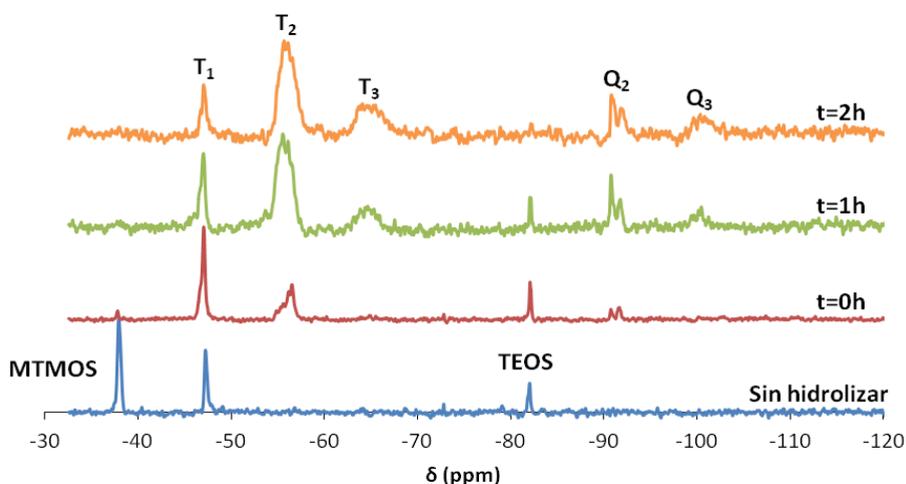


Figura 4.12. Espectro ^{29}Si -RMN del sistema 70M-30T +1% AgNO_3 .

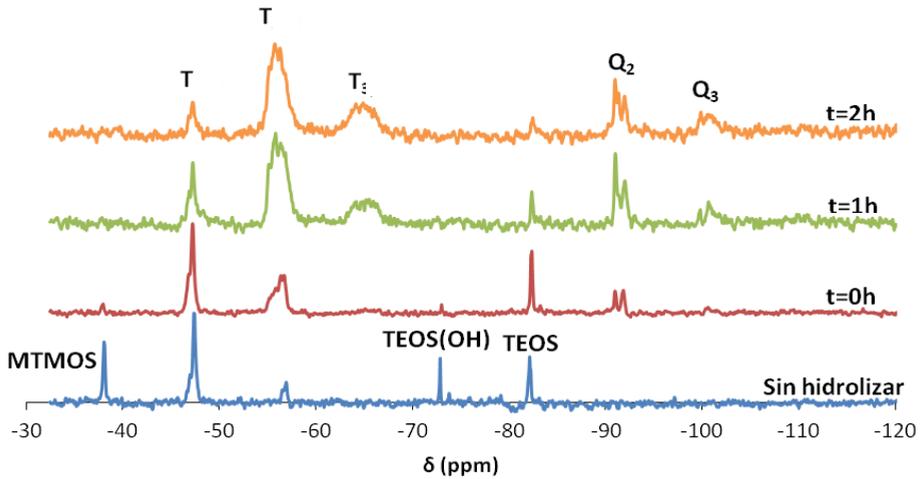


Figura 4.13. Espectro ^{29}Si -RMN del sistema 70M-30T +5% AgNO_3 .

Como puede verse en las figuras 4.12 y 4.13, al incorporar el AgNO_3 , la reacción progresa en el tiempo análogamente a lo visto en la formulación base. Así, a tiempo cero predominan las especies con menor grado de condensación y a medida que va transcurriendo el tiempo de reacción va aumentando la intensidad de las señales correspondientes a las especies con mayor grado de condensación, tal y como era de esperar.

Para el precursor MTMOS, en el caso del sistema que contiene 1% de AgNO_3 , sin haber añadido el catalizador ácido ya comienza a aparecer la especie condensada T_1 , y en el sistema con 5% de AgNO_3 , además de la especie T_1 , también aparece la especie T_2 . Esto es debido al agua en la que está disuelto el AgNO_3 que podría actuar como catalizador débil de la hidrólisis. Para corroborar esta teoría, se mide el pH de la mezcla isopropanol, nitrato de plata y precursores, dando como resultado de esta medida un pH de 3,02. Al ser un pH ácido, favorece el inicio de la reacción de hidrólisis y condensación del MTMOS.

Para el TEOS, se observa que al añadir el ácido la señal de su posición base se mantiene al mismo tiempo que van apareciendo las especies condensadas. Esto indica que el TEOS reacciona más lentamente que el MTMOS, ya que la banda de posición base se mantiene a lo largo de la reacción. En el sistema base aparecen las especies condensadas Q_1 , Q_2 y Q_3 . A medida que las especies Q_0 y Q_1 van desapareciendo, las especies más condensadas Q_2 y Q_3 van aumentando en

intensidad. En cambio, en los sistemas con plata la especie Q_1 no llega a verse y la Q_0 no llega a desaparecer. Por último, en el caso del sistema con 5% de $AgNO_3$ el TEOS se hidroliza debido al agua en la que se encuentra disuelta la sal, aunque en menor medida que el MTMOS. Esta hidrólisis se acentúa en el caso de haber un mayor porcentaje de plata, debido a la disminución del pH de la disolución.

Por último, se muestran los espectros del sistema 35M-35G-30T tanto sin la introducción de plata como con los dos diferentes porcentajes estudiados.

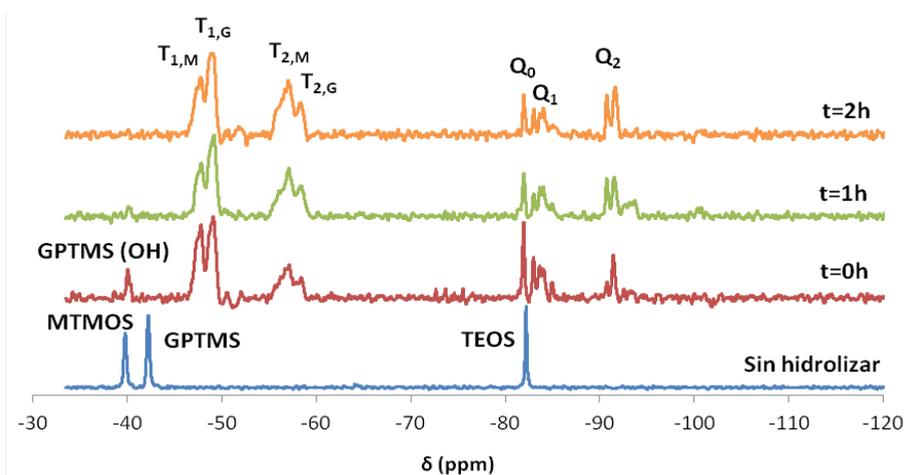


Figura 4.14. Espectro ^{29}Si -RMN del sistema 35M-35G-30T base.

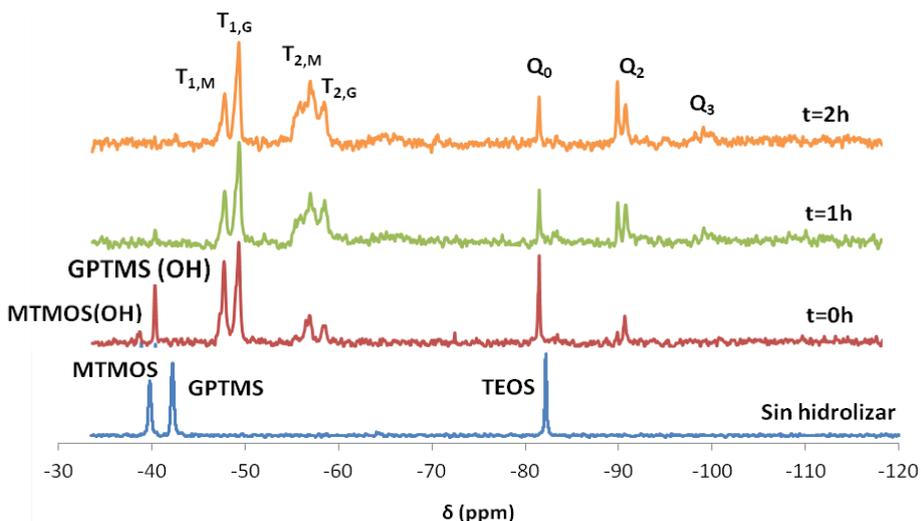


Figura 4.15. Espectro ^{29}Si -RMN del sistema 35M-35G-30T + 1% $AgNO_3$.

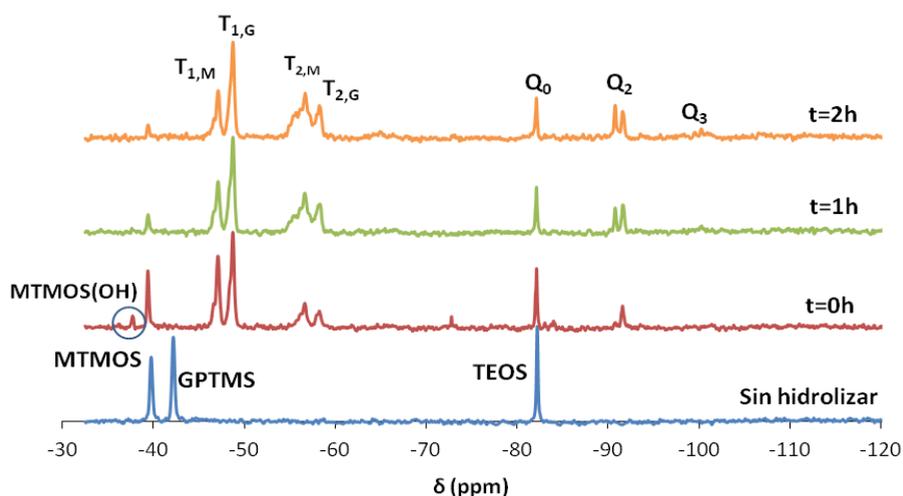


Figura 4.16. Espectro ^{29}Si -RMN del sistema 35M-35G-30T + 5% AgNO_3 .

Al igual que en los sistemas anteriores, a medida que avanza el tiempo de reacción hay una mayor cantidad de especies condensadas, responsables de la formación de la red. En el caso de los sistemas triples hay que destacar que al contrario que en el sistema 70M-30T, no se produce hidrólisis y condensación de los precursores antes de añadir el agua ácida. Esto se debe, en primer lugar, a que la medida del pH de esta mezcla es ligeramente superior (3,75) al del sistema doble (3,02).

En el caso de los dos sistemas que contienen plata, la señal del precursor MTMOS no desaparece por completo con la adición del ácido (no reacciona tan rápidamente como en los sistemas anteriores), además no llega a verse la especie más condensada $T_{3,M}$ en ninguno de los casos. Esto podría ocurrir de nuevo, por la introducción del GPTMS en el material. El GPTMS tiene un grupo no hidrolizable voluminoso que actúa como impedimento para las reacciones de hidrólisis y condensación.

La intensidad de la señal de la especie $T_{1,M}$ va disminuyendo a medida que $T_{2,M}$ va aumentando. Además, a tiempo cero aparece la señal del MTMOS hidrolizado al mismo tiempo que aparecen las señales de las especies condensadas $T_{1,M}$ y $T_{2,M}$ (las reacciones de hidrólisis y condensación se dan simultáneamente).

Respecto al GPTMS, una vez añadido el ácido su posición base desaparece, dando lugar a la señal de las especies hidrolizadas GPTMS (OH). En cuanto a las especies condensadas, de nuevo, la señal más condensada ($T_{3,G}$) no llega a verse.

En el caso del precursor TEOS, Q_0 se mantiene al añadir el ácido (reacciona lentamente como en los sistemas anteriores) y la intensidad va disminuyendo a medida que van aumentando las especies condensadas. El hecho de que el TEOS mantenga su señal quiere decir que no reacciona por completo, pero la aparición de las especies condensadas indica que la red se está formando.

A continuación se presenta una tabla (tabla 4.2) con los valores aproximados de las posiciones a las que aparece cada especie. Se ha utilizado tetrametil silano (TMS) como referencia.

Tabla 4.2. Posición de las señales de cada especie en los espectros de ^{29}Si -RMN en estado líquido.

PRECURSOR	ESPECIE	POSICIÓN (ppm)
MTMOS	MTMOS (OH)	-38
	$T_{0,M}$	-40
	$T_{1,M}$	-47
	$T_{2,M}$	-57
	$T_{3,M}$	-65/-67
GPTMS	GPTMS (OH)	-41
	$T_{0,G}$	-42
	$T_{1,G}$	-49
	$T_{2,G}$	-58
	$T_{3,G}$	-66/-69
TEOS	TEOS (OH)	-75
	Q_0	-82
	Q_1	-83
	Q_2	-91
	Q_3	-102
	Q_4	-110

Tras el estudio de la cinética de reacción, se procede al estudio de la red formada tras la etapa de tratamiento térmico.

En las figuras 4.17 y 4.18 se muestran los espectros de ^{29}Si -RMN en estado sólido tras el tratamiento de curado para cada sistema, es decir, para el sistema 70M-30T y para el sistema 35M-35G-30T.

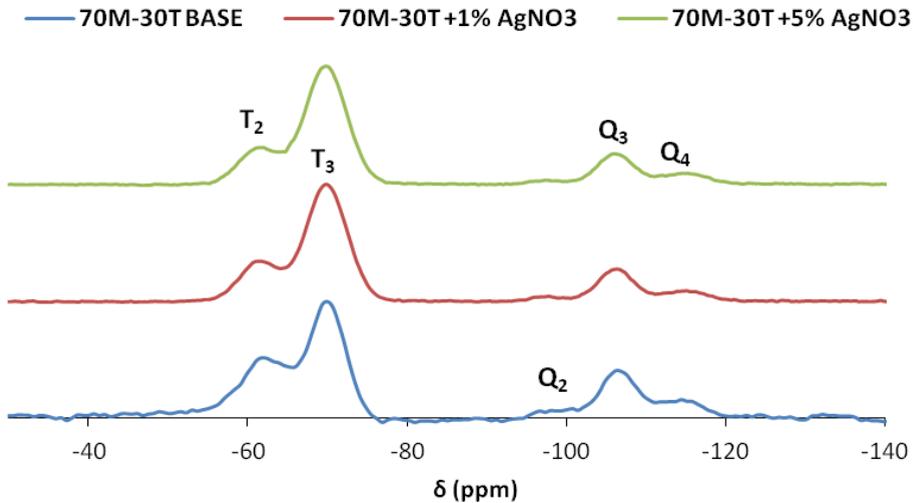


Figura 4.17: Espectro ^{29}Si -RMN (s) del sistema 70M-30T con y sin AgNO_3 .

Se observa que las especies predominantes en los espectros obtenidos tras el curado son las más condensadas, ya no aparecen las señales correspondientes a la posición base de cada precursor, es decir, han reaccionado completamente para dar especies condensadas. En el caso del TEOS incluso puede verse la especie más condensada Q_4 que no se observaba en los espectros obtenidos en estado líquido. Si nos fijamos en el MTMOS, la especie de mayor intensidad es la correspondiente a la más condensada (T_3). Esto da constancia de la formación de una red polisiloxánica densa.

Por otro lado, es de gran importancia el hecho de que las señales no varían con la adición de 1% y 5% de AgNO_3 . Esto significa que la plata no impide la formación de la red y se sigue obteniendo una red altamente entrecruzada, lo que confirma lo observado en estado líquido, es decir, que con el tiempo, el grado de condensación se hace similar tanto en los sistemas base como en los que incorporan plata.

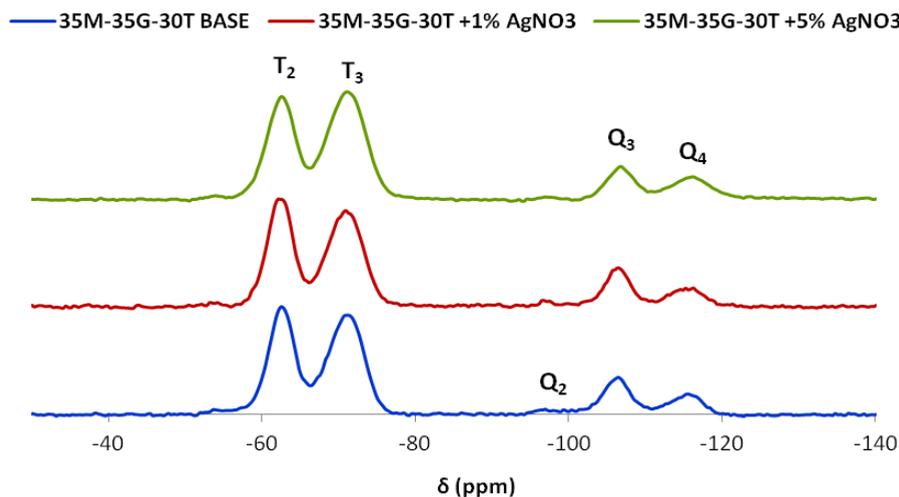


Figura 4.18: Espectro ^{29}Si -RMN (s) del sistema 35M-35G-30T con y sin AgNO_3 .

En el caso del sistema ternario, no se puede distinguir las señales correspondientes al precursor MTMOS y al precursor GPTMS, ya que la resolución de los picos en los espectros de RMN de sólidos es menor que en RMN de líquidos. Sólo se puede hacer distinción entre especies T_2 y T_3 .

En estos espectros se sigue observando que las especies mayoritarias son las de mayor grado de condensación. Al igual que en la figura 4.17, no se ven las señales correspondientes a las especies de menores grados de condensación y aparecen especies condensadas que no llegaban a verse en los espectros en disolución.

Por último, en este caso la incorporación del AgNO_3 en la síntesis tampoco produce variación en las señales. Solamente en el sistema 35M-35G-30T +5% AgNO_3 puede apreciarse un pequeño cambio respecto de los sistemas 35M-35G-30T +1% AgNO_3 y 35M-35G-30T base. En estos dos últimos sistemas la señal T_2 presenta más intensidad que la T_3 , en cambio al añadir 5% de AgNO_3 la señal T_3 varía en intensidad, aumentando respecto a la señal T_2 . Esto significa que en este sistema al añadir más cantidad de plata la señal de mayor condensación pasa a ser más abundante y por tanto la red formada será más densa. Esto se puede relacionar con el estudio de las etapas de hidrólisis y condensación, donde se observaba que el sistema con mayor proporción de plata favorecía la hidrólisis y condensación durante las primeras etapas.

3.2.2. Espectroscopia infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

Se han obtenido los espectros de los diferentes sistemas base y con 1% y 5% de AgNO_3 .

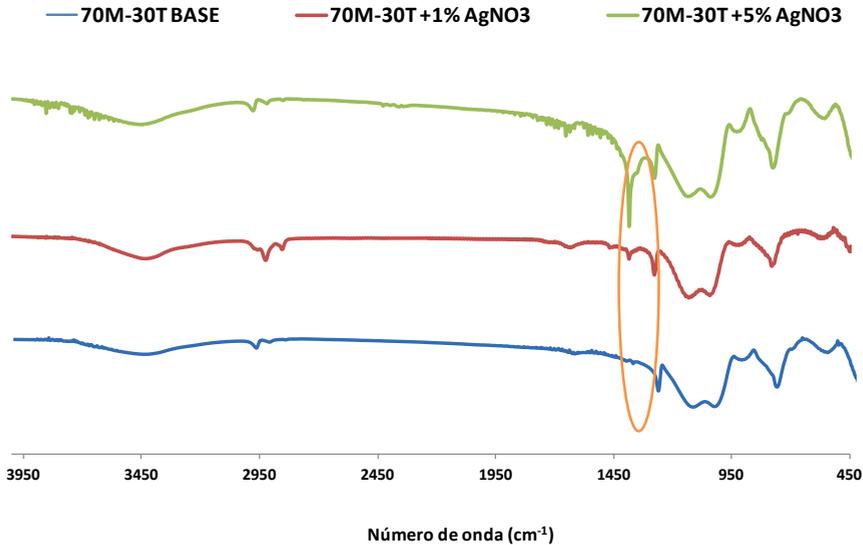


Figura 4.19. Espectros infrarrojos del sistema 70M-30T con y sin plata.

En los espectros de la figura 4.19 se observan las bandas correspondientes a los enlaces Si-O-Si de la red de sílice (entre 400 y 1200 cm^{-1}). La banda más intensa que aparece desdoblada, aproximadamente a 1090 cm^{-1} , corresponde a la vibración de tensión asimétrica del enlace Si-O-Si. Alrededor de 770 cm^{-1} se encuentra la tensión simétrica de estos enlaces, y a 440 cm^{-1} las vibraciones de deformación. Por tanto, estas bandas confirman la formación de la red en la síntesis sol-gel.

Las bandas a 940 y 570 cm^{-1} son debidas a la tensión de los enlaces Si-OH de los grupos silanol. Éstas son bandas poco intensas en todos los sistemas, es decir, hay pocos grupos silanol sin condensar, lo que quiere decir que se forma una red densa. También se observan bandas debidas a la parte orgánica del MTMOS, puesto que tiene un grupo metilo no hidrolizable. Las bandas asociadas a las vibraciones de tensión simétrica y asimétrica del enlace C-H se encuentran a 2890 y 2980 cm^{-1} , respectivamente. La vibración de deformación del grupo metilo CH_3 aparece a 1275 cm^{-1} . Como puede verse, estas bandas aumentan en intensidad con el contenido de MTMOS.

A valores en torno a 3400 cm^{-1} se distingue una banda no muy intensa que corresponde a la tensión del enlace -OH de los grupos silanol sin condensar o de la posible humedad presente en la muestra.

Por último, la banda a 1380 cm^{-1} , marcada en naranja en la figura, se atribuye a iones NO_3^- . En los sistemas base esta banda no aparece y en los sistemas sintetizados con AgNO_3 la banda aumenta en intensidad con el contenido de nitrato de plata¹³. En el resto de bandas de los espectros apenas se aprecian diferencias con la adición de AgNO_3 .

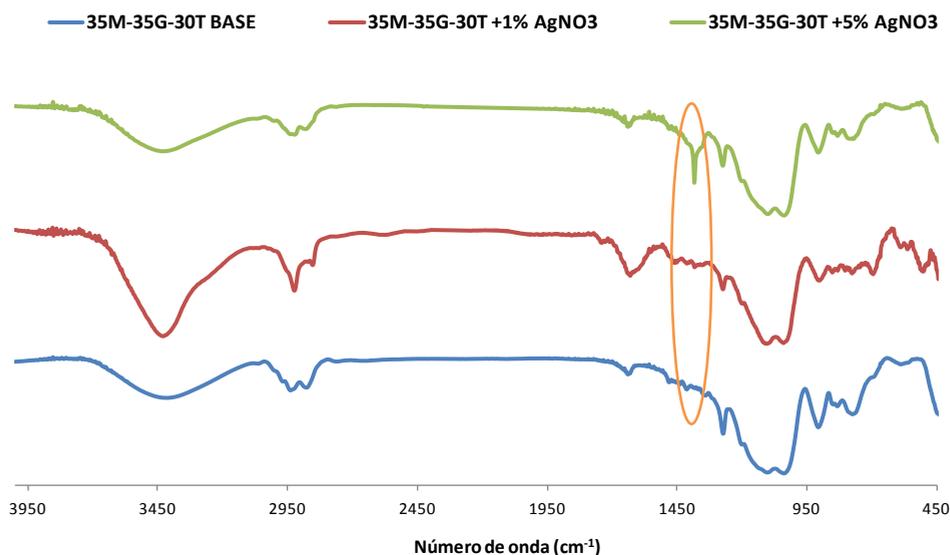


Figura 4.20. Espectros infrarrojos del sistema 35M-35G-30T con y sin plata.

En el espectro de las figura 4.20 también aparecen las bandas correspondientes a los enlaces Si-O-Si . La banda más intensa sigue siendo, como en el caso de los espectros anteriores, la banda de tensión asimétrica de los enlaces Si-O-Si de la red (a $1050, 1120\text{ cm}^{-1}$). Aproximadamente a 770 cm^{-1} se encuentra la tensión simétrica de estos enlaces, y a 440 cm^{-1} las vibraciones de deformación. Al igual que en el caso de los sistemas anteriores, se confirma la formación de la red polisiloxánica. Estas bandas no cambian con la adición de plata en cada sistema, por tanto, se puede decir que la incorporación del AgNO_3 en la síntesis no afecta a la red polisiloxánica formada.

Las bandas que aparecen a 920 y 560 cm^{-1} son debidas a la tensión de los enlaces Si-OH de los grupos silanol. Al igual que en el sistema 70M-30T, son bandas poco intensas que puede ser debidas a que se forma una red densa con pocos grupos silanol residuales sin condensar.

También se pueden apreciar las bandas asociadas al MTMOS debidas a las vibraciones de tensión simétrica y asimétrica del enlace C-H (a 2890 y 2980 cm^{-1}). La vibración de deformación del grupo metilo CH_3 aparece a 1275 cm^{-1} .

En cuanto al GPTMS, este precursor presenta una banda característica del grupo glicidoxilopropilo a 1200 cm^{-1} . Alrededor de 900 cm^{-1} aparece la banda correspondiente al enlace C-O del grupo epoxi. Esta banda se encuentra entre la banda de tensión simétrica de los enlaces de la red siloxánica (a 770 cm^{-1}) y la banda de tensión de los enlaces Si-OH (a 920 cm^{-1}). También se observa la banda debida a la cadena alifática del grupo no hidrolizable del GPTMS. Esta banda correspondiente a la tensión simétrica de los grupos metilenos ($-\text{CH}_2$) aparece aproximadamente a 2870 cm^{-1} junto con las bandas de tensión del grupo metilo del MTMOS.

A 3400 cm^{-1} se ve la banda que corresponde a la tensión del enlace $-\text{OH}$ de los grupos silanol sin condensar o de la posible humedad presente en los recubrimientos.

Al igual que en los espectros anteriores, la banda a 1380 cm^{-1} (marcada en naranja) que se atribuye a los iones NO_3^- no aparece en los sistemas base y se hace más notables a mayor contenido de nitrato de plata.

3.3. Determinación del grado de hidrofilia/hidrofobia

Se han realizado medidas de ángulo de contacto con el fin de caracterizar la hidrofobia/hidrofilia de los recubrimientos obtenidos sobre placas de acero. Las medidas se han realizado en al menos 10 zonas de cada placa recubierta y se han medido tres placas para cada sistema. Por último, se ha obtenido el promedio y la desviación estándar de todas las medidas efectuadas.

En la tabla 4.3 se muestran los valores de ángulo de contacto para los diferentes sistemas, y en la figura 4.21 se observa el gráfico representando esos valores.

Tabla 4.3. Valores de ángulo de contacto para el sistema 70M-30T con y sin plata.

SISTEMA	ÁNGULO DE CONTACTO (°)
70M-30T	67.7±1.4
70M-30T +1% AgNO ₃	69.2±0.8
70M-30T +5% AgNO ₃	73.9±0.6
35M-35G-30T	62.3±0.4
35M-35G-30T +1% AgNO ₃	63.2±0.3
35M-35G-30T +5% AgNO ₃	64.9±0.9

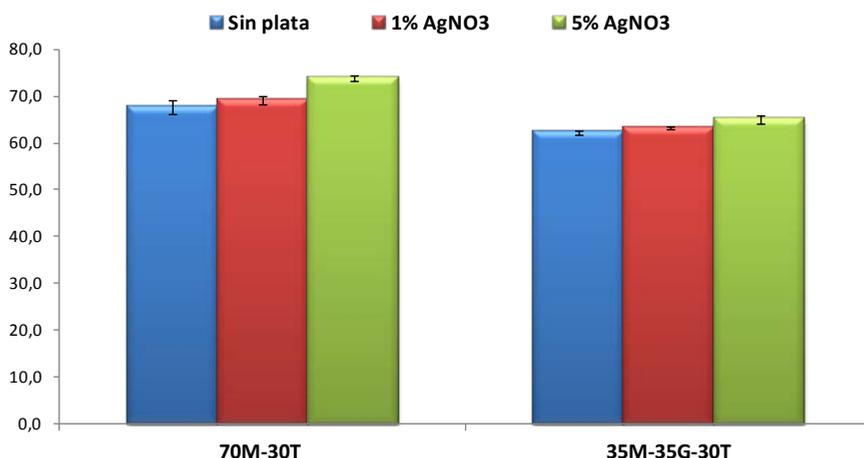


Figura 4.21. Gráfico de valores de ángulo de contacto para los sistemas con y sin plata.

Como se puede observar en el gráfico, los recubrimientos que incorporan nitrato de plata, son ligeramente más hidrófobos, obteniéndose mayores ángulos de contacto a mayor cantidad de nitrato de plata introducida en cada sistema, si bien esta variación es mínima. Además, los sistemas ternarios son mucho más hidrófilos que los binarios, debido, tanto al efecto del precursor GPTMS que aporta mayor hidrofilia a los materiales obtenidos, como al menor grado de condensación que deja más grupos hidroxilos libres. En estudio por RMN en estado sólido se observaba que los materiales ternarios tenían una red más abierta, con una mayor cantidad de especies de menor grado de condensación T_2 , lo que se traduce en una mayor cantidad de grupos hidroxilos, y por lo tanto es una mayor hidrofilia.

3.4. Ensayo de degradación hidrolítica

Los recubrimientos desarrollados están pensados para mejorar la superficie del implante favoreciendo la regeneración de nuevo hueso y produciéndose

posteriormente su degradación mediante reacciones de hidrólisis. De este modo, el bactericida es capaz de salir al exterior para cumplir su función. Se ha estudiado la degradación hidrolítica de los recubrimientos introduciéndolos en agua destilada a 37°C. Los resultados se dan en % de pérdida de masa frente a tiempo.

A continuación, se muestran los gráficos obtenidos para cada sistema con y sin plata (figuras 4.22 y 4.23).

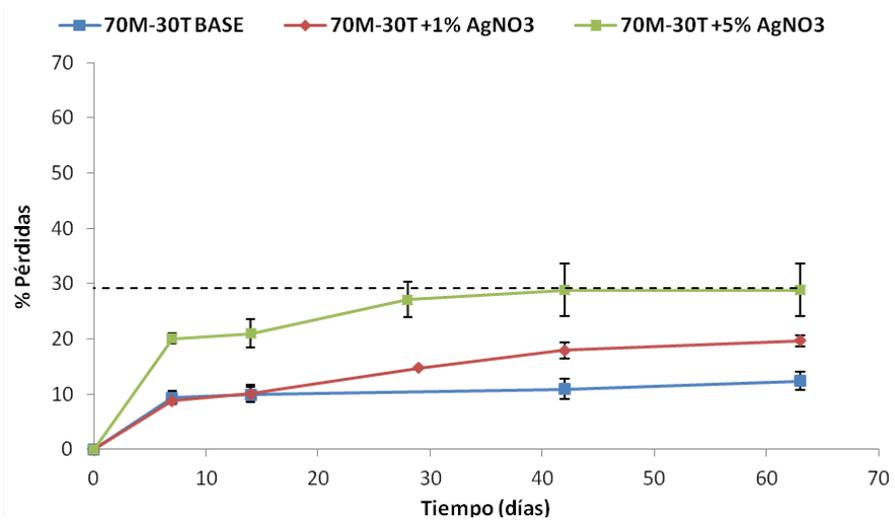


Figura 4.22: Estudio de degradación hidrolítica del sistema 70M-30T con y sin plata.

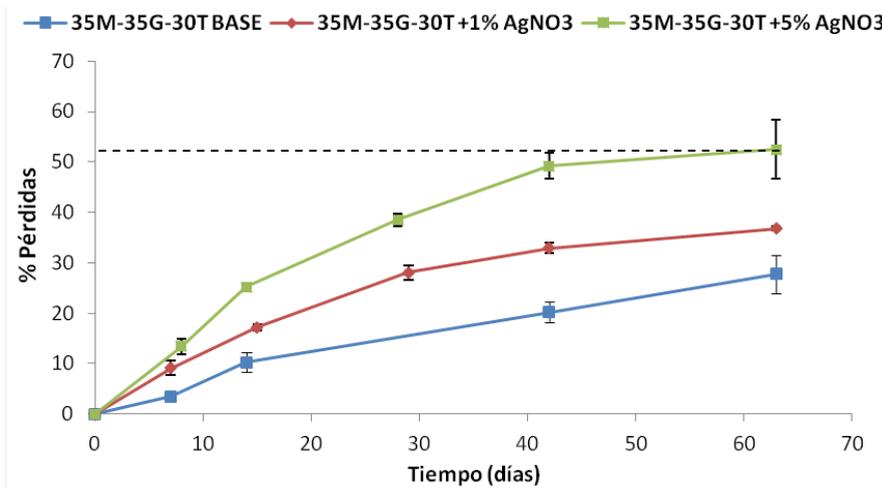


Figura 4.23: Estudio de degradación hidrolítica del sistema 35M-35G-30T con y sin plata.

En los gráficos, se observa que en el caso del sistema binario 70M-30T, durante los primeros días la degradación es mucho más rápida y a partir del día 28 de ensayo, la cinética de degradación de los recubrimientos se estabiliza llegando a valores casi constantes.

En cuanto al sistema triple la degradación no se da de manera acentuada durante los primeros días, sino que se da de una manera más gradual durante los dos meses de estudio. En cualquier caso, tal y como se puede observar en ambas figuras, cuanto mayor es la proporción de plata introducida en el sistema mayores son también las pérdidas sufridas por el material.

Por otro lado, se observa que los sistemas con 1% y 5% de AgNO_3 mantienen el mismo patrón de degradación que los sistemas base y a partir del día 42 la degradación se va ralentizando. Los sistemas con plata presentan porcentajes de degradación mayores que los sistemas base correspondientes. El aumento de pérdida de peso en los sistemas que llevan el agente bactericida, se atribuye, a que a medida que el material se degrada, la red siloxánica se va rompiendo y los iones de plata (solubles en agua) contenidos en la red se disuelven en el medio acuoso que está en contacto con el material. Por tanto, esta pérdida de plata se ve reflejada en las pérdidas de peso que sufre el material.

Al comparar ambos sistemas, el sistema 35M-35G-30T sufre una degradación mayor que el sistema 70M-30T, del orden del doble. Tal y como se vio en los espectros de RMN en estado sólido (figuras 4.17 y 4.18), el sistema 70M-30T tiene una red final con mayor grado de entrecruzamiento, es decir, las especies predominantes tras el curado son las de mayor grado de condensación, las especies T_3 . Sin embargo en el sistema triple, las especies T_3 son casi de la misma intensidad que las señales menos condensadas T_2 , indicando que la red tras el curado está más abierta y por lo tanto se facilita la entrada de agua al interior. Esto es coherente con las medidas del ángulo de contacto en las que se veía que el sistema más hidrófilo es precisamente el sistema triple, por lo que la tendencia a la hidrólisis se ve favorecida.

3.5. Ensayo de liberación de silicio (ICP)

Al igual que en los capítulos anteriores, el ensayo de liberación de silicio de los recubrimientos se realiza mediante la técnica de ICP. En 4.24 se muestran los

resultados obtenidos para la liberación de silicio de los sistemas sin plata y aquellos que incorporan un 5% de AgNO_3 .

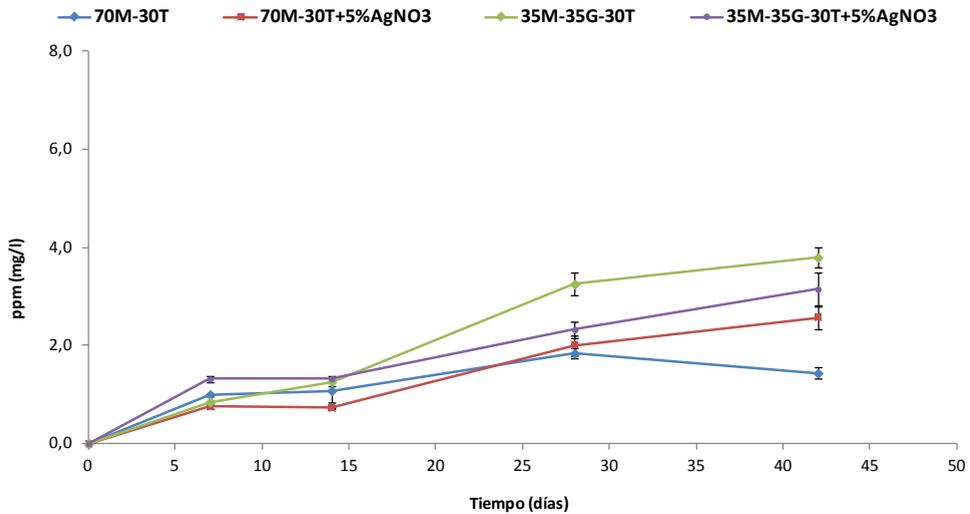


Figura 4.24. Estudio de liberación de silicio de los sistema 70M-30T y 35M-35G-30T con 5% AgNO_3 .

Tal y como se puede observar en la figura 4.24, la liberación de silicio de los sistemas no se ve afectada en gran medida por la introducción de plata en los recubrimientos. El sistema que cuenta con una mayor liberación de silicio es lógicamente el que mostraba una mayor degradación, medida por gravimetría y es el sistema triple 35M-35G-30T. Este comportamiento puede ser debido a la incorporación del precursor GPTMS que da lugar por una parte a una superficie más hidrofílica (figura 4.21) y por otra a que su grupo no hidrolizable es un grupo voluminoso que, tal y como se puede observar por RMN de ^{29}Si , si se comparan las figuras 4.17 y 4.18, da lugar a una red final menos reticulada, y por lo tanto más abierta a la incorporación del agua.

En cuanto a las diferencias entre ambos sistemas en los valores obtenidos en el ensayo de degradación hidrolítica y de liberación de silicio, estas podrían deberse al efecto de la pérdida de peso debida a la plata. Los sistemas que incorporan plata sufren pérdidas de peso mucho mayores que los sistemas base. Tal y como se ha explicado, esto se debe a que la plata presente en los materiales se desprende disolviéndose en el medio acuoso, lo que da lugar a pérdidas gravimétricas grandes.

Sin embargo, al ser la liberación una medida del medio acuoso, la pérdida de plata no influye, siendo ésta una medida más exacta de la degradación que sufre la red polisiloxánica.

3.6. Ensayo de liberación de plata (ICP)

La liberación de la plata se debe a procesos de migración de los iones o partículas de plata a través del material y a procesos de degradación de la matriz que lo contiene, y por lo tanto, los resultados obtenidos estarán relacionados con los obtenidos en el ensayo de degradación hidrolítica. Este estudio, se ha realizado mediante ICP-MS, debido a que en estado acuoso el nitrato de plata se disocia en iones plata debido a la siguiente reacción.



A continuación, se muestran las liberaciones de plata que presentan los diferentes sistemas sintetizados con 5% de AgNO_3 .

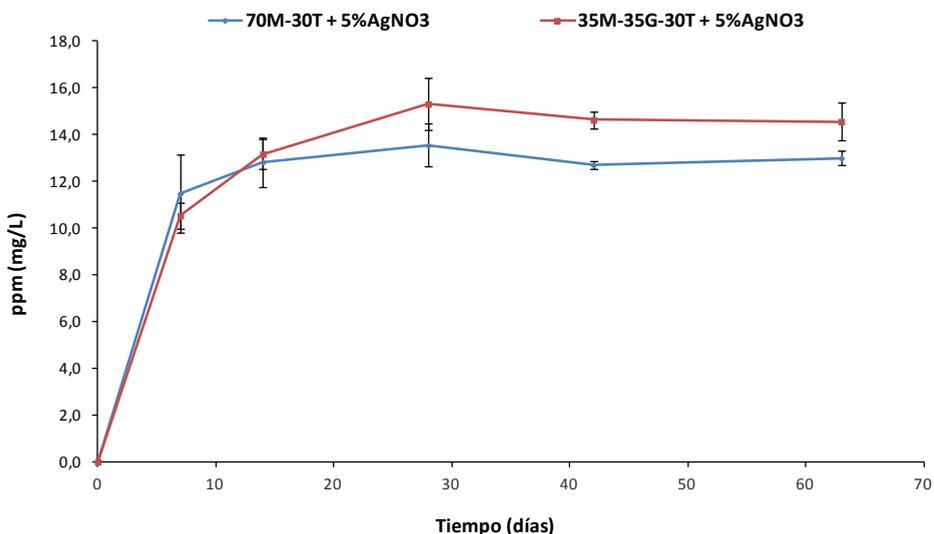


Figura 4.25. Estudio de liberación de Ag^+ de los sistema 70M-30T y 35M-35G-30T con 5% AgNO_3 .

En ambos casos, la cinética de liberación de plata pasa por una difusión de los iones plata muy rápida al principio del ensayo, tras lo que la liberación se estabiliza. Este comportamiento tiene su base en la gran solubilidad del nitrato de plata en agua¹⁴. Al ser una sal tan soluble, en contacto con agua se produce la

hidrólisis de la sal dando lugar a una gran cantidad de iones plata (Ag^+) que difunden de la red al exterior. Por este motivo, la liberación de plata al principio es tan rápida y se da en gran medida. Sin embargo, con el paso del tiempo queda una menor cantidad de iones plata en el material y por eso se da una liberación más estable.

Mediante este estudio se confirma la capacidad de los iones de plata de migrar a través de la matriz híbrida y ser liberados hacia el exterior para cumplir su función antibacteriana. Además los recubrimientos estudiados siguen presentando una liberación estable los días 42 y 63. Este comportamiento puede resultar muy beneficioso, ya que interesa que el biocida actúe intensamente los primeros días para eliminar la infección ya formada, y tras ello, que se libere de forma más gradual durante un cierto tiempo tras la colocación del implante.

El sistema triple, tiene una liberación de iones plata mayor que el sistema doble 70M-30T. Esto se debe a la introducción del precursor GPTMS que aporta una mayor hidrofilia al material (figura 4.21), y además tiene un grupo no hidrolizable voluminoso que afecta al empaquetamiento de la red haciendo que tras el curado, ésta quede más abierta (figura 4.18). De este modo, la degradación de la red es mayor en este sistema, tal y como se puede observar en el ensayo de degradación hidrolítica, permitiendo una mayor difusión de iones plata al medio.

Sin embargo, a pesar de la gran diferencia en cuanto a las tasas de degradación de ambos sistemas, en este caso la diferencia en la liberación de iones plata no es tan evidente, debido, probablemente a la reducción térmica en el caso del sistema triple, y la consecuente formación de agregados y nanopartículas. Este hecho, es decir, el hecho de la formación de nanopartículas hace que haya una menor cantidad de nitrato de plata libre, y por lo tanto la liberación de plata es menos acentuada.

3.7. Estudios *in vitro*

Se realizaron los ensayos *in vitro* de los dos sistemas, pero los resultados del sistema triple no se han podido tener en cuenta debido a un problema de contaminación en las muestras, que aún no se ha podido resolver. Por lo tanto se mostrarán en este apartado únicamente los resultados correspondientes al sistema 70M-30T.

3.7.1. Medida de la viabilidad celular utilizando el ensayo de MTT.

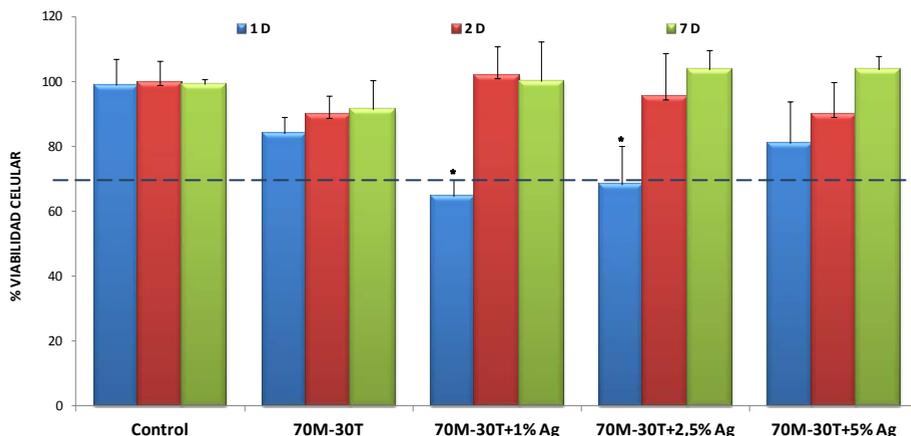


Figura 4.26. Estudio de la medida de la viabilidad celular del sistema 70M-30T.

En el ensayo MTT con FBH se observa que para todas las formulaciones la viabilidad celular es superior al 70% (sobre todo a partir del segundo día, en el caso de los materiales con menores porcentajes de nitrato de plata). Por lo tanto, se puede decir que ninguno de los sistemas presenta citotoxicidad.

3.7.2. Medida de la adhesión y proliferación celular (Alamar Blue).

El siguiente ensayo realizado es el de ALAMAR BLUE, también utilizando como línea celular FBH. Mediante este ensayo se mide la capacidad de adhesión y proliferación de las células sobre la superficie de los materiales.

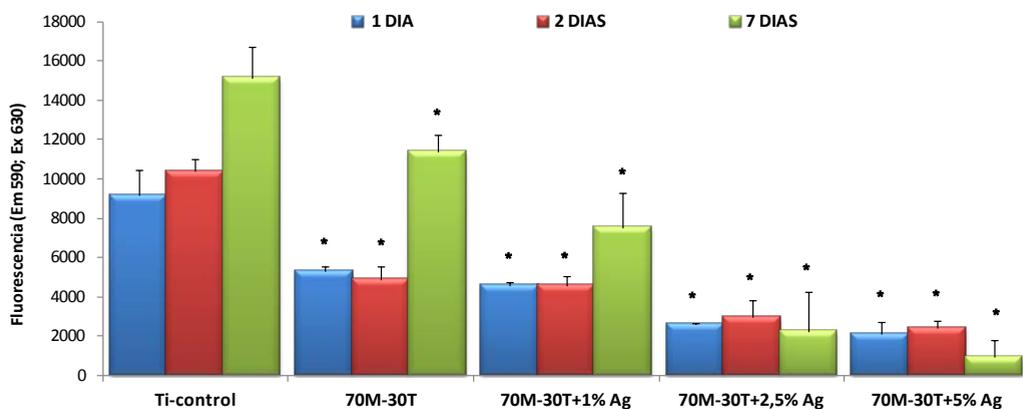


Figura 4.27. Estudio de la medida de la adhesión y proliferación celular del sistema 70M-30T.

En la figura 4.27 se muestran los resultados obtenidos para la adhesión y proliferación celular en los recubrimientos. Este ensayo relaciona la absorbancia de las muestras con la actividad metabólica de las células, y por lo tanto una mayor absorbancia dará lugar a una mayor actividad metabólica celular indicando un mayor número de células vivas.

Tal y como se observa en la figura, cuanto mayor es la cantidad de plata menor es la actividad metabólica de las células, lo que quiere decir que a mayores porcentajes de nitrato de plata menor viabilidad celular hay.

Este comportamiento está relacionado con las altas liberaciones de iones plata que se han observado en los estudios de liberación (figura 4.25), y además, ha sido documentado en la bibliografía, donde diversos estudios demuestran que uno de los mayores inconvenientes es la posible citotoxicidad sobre células no bacterianas del tejido huésped que podrían disminuir la viabilidad.

Los estudios de adhesión y proliferación se han realizado hasta 7 días, dando lugar, en el caso del recubrimiento con mayor porcentaje de AgNO_3 , a una disminución drástica de las células adheridas, y es precisamente durante estos 7 días, e incluso hasta los 14 días, donde se produce una liberación más acentuada de los iones plata desde la matriz hacia el exterior, por lo que ambos comportamientos podrían estar relacionados, tal y como se ha observado anteriormente.

Al contrario, en el caso de la formulación con un 1% de AgNO_3 , se obtienen valores positivos similares a los del recubrimiento base, donde se observa que la adhesión celular aumenta con el tiempo de estudio.

3.7.3. Determinación de la actividad antibacteriana de los materiales.

Por último, se realizan los estudios de la capacidad bactericida de los materiales obtenidos (figura 4.28).

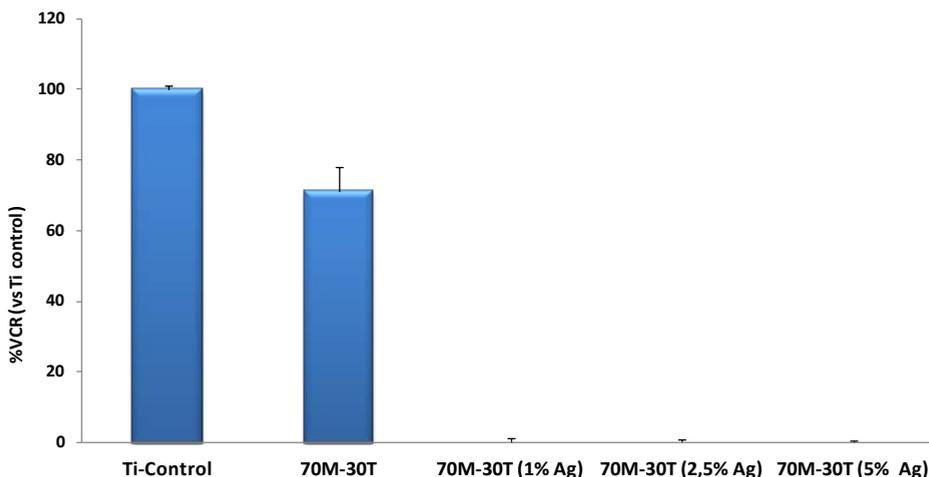


Figura 4.28. Estudio de la actividad antibacteriana del sistema 70M-30T

En la figura 4.28 se observa que los sistemas cargados con plata son totalmente bactericidas, incluso aquellos que incorporan la menor cantidad (1%), lo cual es importante ya que estos recubrimientos son los que mejores valores de adhesión y proliferación han proporcionado.

Como se ha comentado en la introducción, la plata es un bactericida de amplio espectro y muy efectivo, por lo que los resultados obtenidos están dentro de lo esperado.

4. CONCLUSIONES

Como conclusión general se puede afirmar que se ha logrado la síntesis de recubrimientos orgánico-inorgánicos con la incorporación de plata (nitrato de plata) como agente bactericida en distintas cantidades, de una forma sencilla, y sin afectar a las propiedades químicas de la red formada.

Los recubrimientos, además, presentan excelentes propiedades superficiales, tales como gran homogeneidad, ausencia de grietas y una buena adhesión al sustrato metálico, por lo que son viables para su aplicación final como recubrimientos para implantes dentales.

La degradación de la matriz no se ve afectada por la incorporación del agente bactericida, haciendo que ésta aumente en el estudio de degradación

gravimétrica debido a la pérdida de peso de la plata, pero sin variar esta degradación real, tal y como se observa en el ensayo de liberación de silicio, donde los valores obtenidos son muy similares. Además, debido a la alta solubilidad del este agente antibacteriano, se libera una gran cantidad de biocida al exterior en poco tiempo. Este comportamiento es muy interesante teniendo en cuenta que una vez que la infección ha colonizado el implante, es necesaria la rápida actuación del agente bactericida para erradicarla, tras lo cual, una liberación más gradual evitará posibles futuras infecciones.

Por último, remarcar el fuerte carácter bactericida frente a bacterias *Staphylococcus aureus* de las formulaciones estudiadas, incluidas las que menor porcentaje de nitrato de plata incorporan, teniendo en cuenta que a falta de los resultados *in vitro* del sistema triple, las conclusiones de ese apartado se refieren únicamente al sistema 70M-30T.

BIBLIOGRAFÍA

1. Chernousova, S., & Epple, M. (2013). Silver as antibacterial agent: ion, nanoparticle, and metal. *Angewandte Chemie International Edition*, 52(6), 1636-1653.
2. Lansdown, A. B. (2010). *Silver in healthcare: its antimicrobial efficacy and safety in use* (No. 6). Royal Society of Chemistry.
3. Mahltig, B., Haufe, H., & Böttcher, H. (2005). Functionalisation of textiles by inorganic sol-gel coatings. *Journal of Materials Chemistry*, 15(41), 4385-4398.
4. Ferraris, S., & Spriano, S. (2015). Antibacterial titanium surfaces for medical implants. *Materials Science and Engineering: C*.
5. Castellano, J. J., Shafii, S. M., Ko, F., Donate, G., Wright, T. E., Mannari, R. J., & Robson, M. C. (2007). Comparative evaluation of silver-containing antimicrobial dressings and drugs. *International Wound Journal*, 4(2), 114-122.
6. Martínez-Ibañez, M; Development of osteoinductive Si-based coatings to improve dental implants' performance, Universidad del País Vasco, 2015.
7. Martínez-Ibañez, M., Juan-Díaz, M. J., Lara-Saez, I., Coso, A., Franco, J., Gurruchaga, M., & Goñi, I. (2016). Biological characterization of a new silicon based coating developed for dental implants. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 27(4), 1-9.
8. Shibata, S., Miyajima, K., Kimura, Y., & Yano, T. (2004). Heat-induced precipitation and light-induced dissolution of metal (Ag & Au) nanoparticles in hybrid film. *Journal of sol-gel science and technology*, 31(1-3), 123-130.
9. Procaccini, R., Ceré, S., & Pellice, S. (2011). Development and thermal evolution of silver clusters in hybrid organic-inorganic sol-gel coatings. *Surface and Coatings Technology*, 205(23), 5464-5469.
10. Pal, S., Tak, Y. K., & Song, J. M. (2007). Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, 73(6), 1712-1720.

11. Mittal, A. K., Bhaumik, J., Kumar, S., & Banerjee, U. C. (2014). Biosynthesis of silver nanoparticles: elucidation of prospective mechanism and therapeutic potential. *Journal of colloid and interface science*, *415*, 39-47.
12. Li, W., Seal, S., Megan, E., Ramsdell, J., Scammon, K., Lelong, G., & Richardson, K. A. (2003). Physical and optical properties of sol-gel nano-silver doped silica film on glass substrate as a function of heat-treatment temperature. *Journal of applied physics*, *93*(12), 9553-9561.
13. Goebbert, D. J., Garand, E., Wende, T., Bergmann, R., Meijer, G., Asmis, K. R., & Neumark, D. M. (2009). Infrared Spectroscopy of the Microhydrated Nitrate Ions $\text{NO}_3\text{-(H}_2\text{O)}$ 1– 6. *The Journal of Physical Chemistry A*, *113*(26), 7584-7592.
14. Mahltig, B., Fiedler, D., & Böttcher, H. (2004). Antimicrobial sol-gel coatings. *Journal of sol-gel science and technology*, *32*(1-3), 219-222.

Capítulo 5

Recubrimientos con octenidina y clorhexidina como agentes bactericidas

CAPÍTULO 5

RECUBRIMIENTOS CON OCTENIDINA Y CLORHEXIDINA COMO AGENTES BACTERICIDAS.

1. Introducción.....	199
2. Síntesis de los recubrimientos.....	201
3. Resultados.....	202
3.1. Ensayo de adherencia.....	202
3.2. Caracterización química.....	203
3.2.1. Resonancia Magnética Nuclear del átomo de Silicio (²⁹ Si-RMN).....	203
3.2.2. Espectroscopia infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR).....	208
3.3. Determinación del grado de hidrofilia/hidrofobia.....	213
3.4. Ensayo de degradación hidrolítica.....	214
3.5. Ensayo de liberación de Si (ICP).....	216
3.6. Estudios de liberación del agente bactericida.....	218
3.7. Estudios <i>in vitro</i>	220
3.7.1. Medida de la viabilidad celular utilizando el ensayo de MTT.....	221
3.7.2. Medida de la adhesión y proliferación celular (Alamar Blue).....	222
3.7.3. Determinación de la actividad antibacteriana de los materiales.....	224
4. Conclusiones.....	225
Bibliografía.....	227

1. INTRODUCCIÓN

En los capítulos anteriores, se han estudiado diferentes matrices de liberación con reconocidos agentes antibacterianos de amplio espectro, tales como el quitosano y la plata (nitrato de plata). A pesar de las buenas propiedades del quitosano en cuanto a biocompatibilidad, biodegradabilidad y acción bacteriostática (evitando la adhesión bacteriana en su superficie)^{1,2}, los recubrimientos desarrollados con quitosano no han mostrado una total capacidad bactericida, con lo que probablemente una vez formado el biofilm no serán capaces de erradicar totalmente las bacterias de la superficie.

En cuanto a los recubrimientos desarrollados con la incorporación de nitrato de plata, sal capaz de disociarse en iones Ag^+ , que son los que poseen la capacidad antibacteriana, éstos han mostrado una alta y efectiva acción bactericida. Sin embargo, uno de los problemas más frecuentes en el uso de la plata como agente antibacteriano es el ennegrecimiento de los tejidos, siendo esto un comportamiento totalmente indeseable en el campo de la implantología dental, donde el factor estético juega un papel crucial.

Así, será importante desarrollar recubrimientos que incorporen otros agentes bactericidas que sean capaces de superar los problemas causados por los anteriores, y por lo tanto, tengan por un lado, una alta capacidad antibacteriana y por otro una buena compatibilidad con los tejidos, no produciendo efectos secundarios, ni a nivel tóxico ni estético, en los tejidos que rodean al implante. Los bactericidas elegidos en este capítulo son la octenidina (dihidrocloruro de octenidina) y la clorhexidina (diacetato de clorhexidina).

La octenidina es un compuesto catiónico que pertenece a la familia de las bispiridinaminas. Tiene un amplio espectro de actuación frente a un amplio rango de microorganismos³, y presenta una buena biocompatibilidad con los tejidos⁴. Uno de sus usos más conocidos es en aplicaciones tópicas de carácter antiséptico así como en suturas^{5,6}.

La clorhexidina es también una molécula catiónica que pertenece a la familia de las bisbiguanidas. Es también un efectivo agente antibacteriano cuyo uso más extendido es en colutorios o enjuagues bucales⁷.

Para el desarrollo de recubrimientos que incorporen estos agentes antibacterianos, se partió de una formulación con la que en estudios anteriores se obtuvieron muy buenos resultados tanto *in vitro* como *in vivo*⁸. Esta formulación, es la que también se ha utilizado en el capítulo anterior, 70MTMOS-30TEOS⁸, que además de ser biocompatible en estudios *in vivo*, mostró capacidad de inducir la formación de hueso e incluso mejorar el comportamiento del titanio en el primer periodo tras la implantación. Por ello se eligió como material base para su estudio como matriz liberadora de agentes bactericidas y así, aunar la capacidad osteoinductora del material con un fuerte carácter bactericida.

En esta formulación se incorporarán diferentes porcentajes de octenidina y clorhexidina, y los materiales resultantes se van a caracterizar del mismo modo que en capítulos anteriores, es decir, se realizará la caracterización morfológica de los recubrimientos, el estudio de corte por enrejado para estudiar su adherencia, y su caracterización química mediante las técnicas de FT-IR y ²⁹Si RMN tanto en estado sólido como en estado líquido.

Se realizarán medidas del grado de hidrofilia/hidrofobia de los materiales, así como estudios de degradación hidrolítica, estudios de liberación de silicio por la técnica de ICP-MS y estudios liberación de los agentes bactericidas mediante UV. Finalmente se realizarán también estudios *in vitro* del comportamiento celular en contacto con estos materiales así como de su capacidad bactericida.

A continuación, en la tabla 5.1 se observan las principales características de los agentes bactericidas empleados.

Tabla 5.1. Propiedades físicas de los agentes bactericidas utilizados.

Compuesto	Fórmula química	Peso molecular (g/mol)	Solubilidad (agua)
Dihidrocloruro de octenidina	C ₃₆ H ₆₄ Cl ₂ N ₄	623.82616	Soluble en agua
Diacetato de clorhexidina	C ₂₆ H ₃₈ Cl ₂ N ₁₀ O ₄	625.55052	19 mg/ml

2. SÍNTESIS DE LOS RECUBRIMIENTOS

El método de síntesis seguido es el explicado en el apartado 2.2 del capítulo de Materiales y Técnicas experimentales. Para el caso del diacetato de clorhexidina y debido a la naturaleza de la molécula, concretamente a sus grupos biguanida (figura 5.1, marcados en color azul), la molécula puede captar protones en el momento de la adición del agua ácida, lo que implica la precipitación de la clorhexidina y la no homogeneidad de los materiales obtenidos. Para evitar este problema, la síntesis de los materiales que incorporan clorhexidina, se modifica añadiendo la cantidad estequiométrica necesaria de agua ácida para que se produzca la hidrólisis y posterior condensación, teniendo en cuenta los protones captados por los grupos biguanida de la molécula.

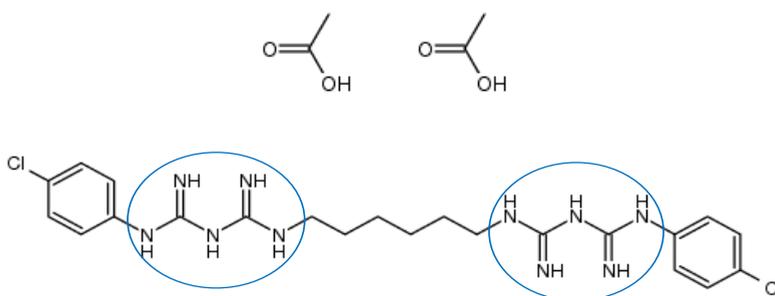


Figura 5.1: Estructura molecular del diacetato de clorhexidina.

Tras la realización de la síntesis se pasa a la etapa de curado, que tras diversos ensayos se estableció en 2h a 80°C.

En todos los casos, con ambos bactericidas, se han obtenido materiales homogéneos y transparentes, si bien es cierto que se podía apreciar una ligera coloración blanquecina para valores altos de octenidina. Teniendo en cuenta esto, y persiguiendo que además de capacidad bactericida los recubrimientos no pierdan su capacidad osteorregeneradora, se decidió incorporar unos porcentajes no demasiado altos. Los porcentajes en peso respecto a los precursores, fueron los mismos para los dos agentes.

En la tabla 5.1 se presentan las diferentes formulaciones desarrolladas, así como su nomenclatura.

Tabla 5.1: Proporciones de biocidas utilizados y nomenclatura de las muestras.

NOMENCLATURA	%MTMOS	%TEOS	%BIOCIDA
70M-30T	70	30	0%
70M-30T (0.5% oct)			0.5%
70M-30T (1% oct)			1%
70M-30T (1.5% oct)	70	30	1.5%
70M-30T (2% oct)			2%
70M-30T (0.5% CHX)			0.5%
70M-30T (1% CHX)			1%
70M-30T (1.5% CHX)	70	30	1.5%
70M-30T (2% CHX)			2%

3. RESULTADOS

3.1. Ensayo de adherencia

Los recubrimientos obtenidos tienen buenas propiedades superficiales en todos los casos. No presentan grietas ni separación de fases y presentan alta transparencia. Dada la similitud de todos los films, únicamente se muestran en la figura 5.2 imágenes de los sistemas que contienen un 2% de octenidina y clorhexidina.

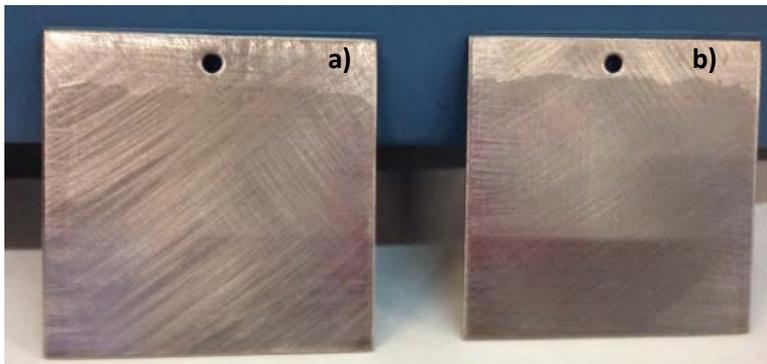


Figura 5.2: Placas de acero recubiertas con el sistema 70M-30T con un 2% de octenidina (a) y 2% de clorhexidina (b).

Para comprobar la buena adhesión de estos materiales sobre sustratos metálicos, se realiza el ensayo de corte por enrejado.

En ningún caso se observa un desprendimiento de material superior a 0, por lo que se puede decir que la adhesión de estos recubrimientos al sustrato es óptima.

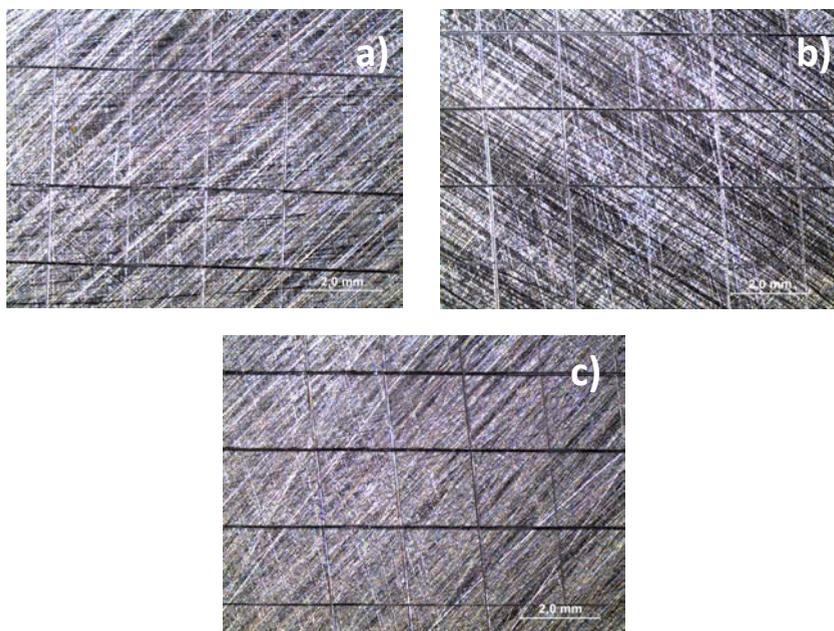


Figura 5.3: Ensayo de corte por enrejado para el sistema 70M-30T base (a) y 70M-30T con un 2% de octenidina(b) y 2% de clorhexidina (c), a un aumento de x2.0.

3.2. Caracterización química

Para caracterizar estas formulaciones, de nuevo las técnicas utilizadas son la Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR) y la Resonancia Magnética Nuclear del átomo de silicio (^{29}Si RMN), en estado líquido y sólido del material.

3.2.1. Resonancia Magnética Nuclear del átomo de Silicio (^{29}Si -RMN)

La caracterización química de los materiales obtenidos se va a comenzar con el estudio de las etapas de hidrólisis y condensación de los sistemas mediante RMN de ^{29}Si en estado líquido, y finalmente con el estudio de la red formada tras el curado mediante RMN de ^{29}Si en estado sólido.

Para realizar el estudio de la cinética de reacción de estos sistemas al igual que en los capítulos anteriores, se utiliza el método de anotación de Lippma y col⁹ para la identificación de las diferentes especies formadas.

Debido a la similitud de los espectros obtenidos, únicamente se van a mostrar los correspondientes al sistema 70M-30T base, y aquellos con el máximo % de agente bactericida, es decir, el sistema 70M-30T con un 2% de octenidina y un 2% de clorhexidina.

En la figura 5.4 se presentan como referencia los espectros del sistema 70M30T que ya se han comentado en la figura 4.11 del capítulo 4.

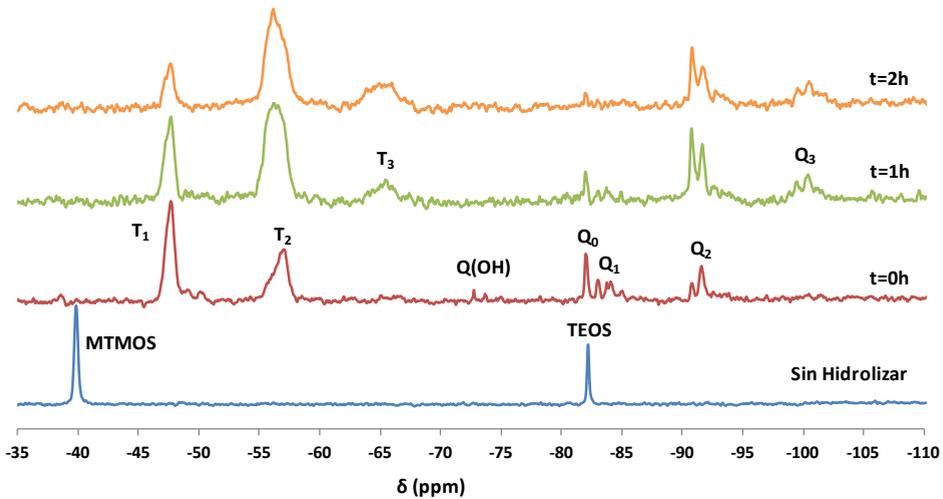


Figura 5.4: Espectro de RMN de ²⁹Si en estado líquido del sistema 70M-30T.

Tal y como se comentó en el capítulo anterior, se observa que a lo largo del tiempo la reacción avanza favorablemente. Para el precursor MTMOS se obtienen todas las especies condensadas T₁, T₂ y T₃, siendo T₂ la especie más abundante. En el caso del TEOS, una vez añadida el agua ácida se observan tanto las señales del precursor base y de la especie hidrolizada, Q₀ y Q(OH) respectivamente, como las señales de las especies condensadas Q₁ y Q₂ y tras la segunda hora de reacción coexisten las especies más condensadas para ambos precursores.

En la figura 5.5 se presentan los espectros del sistema 70M-30T con un 2% de octenidina.

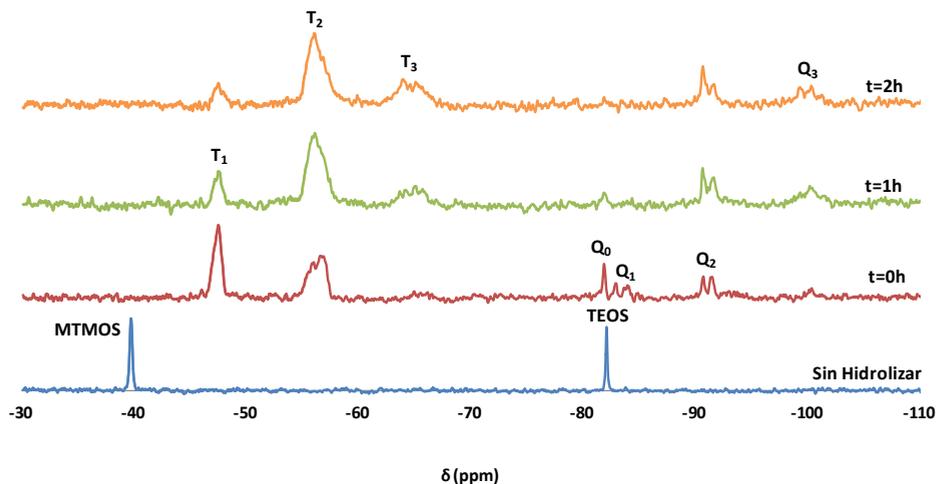


Figura 5.5: Espectro de RMN de ^{29}Si en estado líquido del sistema 70M-30T con un 2% de octenidina.

Se observa que la condensación de las formulaciones con octenidina sigue una cinética similar a la de los sistemas sin bactericida.

En el caso del precursor MTMOS al añadir el agua acidificada su señal base (-40 ppm) desaparece y aparecen las señales asociadas a las especies condensadas T_1 y T_2 . Durante la primera hora de reacción, comienza a aparecer la banda correspondiente a T_3 . Cuanto más tiempo transcurre desde la adición del agua acidificada, las señales de las especies T_2 y T_3 aumentan considerablemente. Se obtienen todas las especies condensadas posibles para el MTMOS: T_1 , T_2 (la más abundante) y T_3 .

En el caso del TEOS, el desplazamiento químico del precursor se encuentra a -82 ppm. En el instante en el que se añade el agua acidificada, al igual que en el sistema base, aparecen las señales de las especies condensadas Q_1 , Q_2 , y Q_3 . La señal asociada al precursor (Q_0) se mantiene durante toda la reacción (aunque va disminuyendo en el tiempo), por lo que coexiste precursor sin reaccionar con el resto de las especies.

A medida que transcurre el tiempo, aumenta la intensidad de las señales asociadas a las especies Q_2 y Q_3 . Con todo, se logran todas las especies condensadas del TEOS, excepto la más condensada (Q_4).

Por último, en la figura 5.6 se pueden ver los espectros correspondientes al sistema 70M-30T con un 2% de clorhexidina.

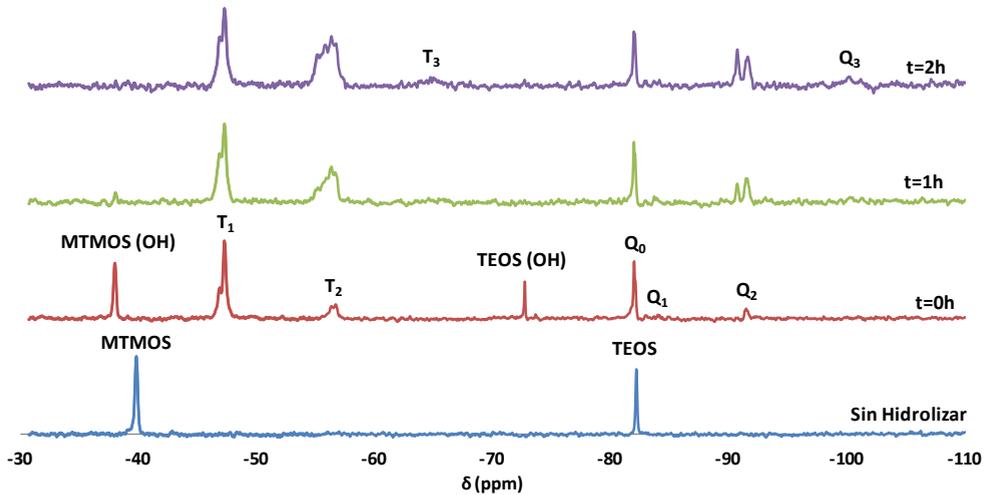


Figura 5.6: Espectro de RMN de ^{29}Si en estado líquido del sistema 70M-30T con un 2% de clorhexidina.

En este caso, las señales que aparecen a lo largo del tiempo, ofrecen un aspecto notablemente diferente a las de la formulación con octenidina. Predominan las especies con menor grado de condensación al añadir el agua acidificada, y al avanzar el tiempo, la intensidad de las señales correspondientes a las especies de mayor grado de condensación va aumentando del mismo modo, llegando a observarse las señales con mayor grado de condensación (T_3 para el MTMOS y Q_3 para el TEOS).

La adición de la clorhexidina hace que se observe la señal de las especies hidrolizadas del MTMOS, que no se observaban ni en el espectro base ni el de los materiales con octenidina, y la señal asociada a Q_0 va desapareciendo de forma más lenta, y se mantiene durante un tiempo mayor que en los espectros anteriores. Además la intensidad de las señales más condensadas es mucho menor que en el caso anterior. Este comportamiento, podría tener lugar debido a una posible unión

de la clorhexidina a la red formada, mediante puentes de hidrógeno a través de sus grupos amino protonados, lo que traería como consecuencia una dificultad para la condensación de los grupos silanol, y por lo tanto menor cantidad de especies condensadas.

Tras el estudio de la cinética de reacción, para el estudio de la red final formada tras el curado, se utiliza la técnica de ^{29}Si -RMN en estado sólido. En primer lugar se muestran los espectros de los recubrimientos con octenidina.

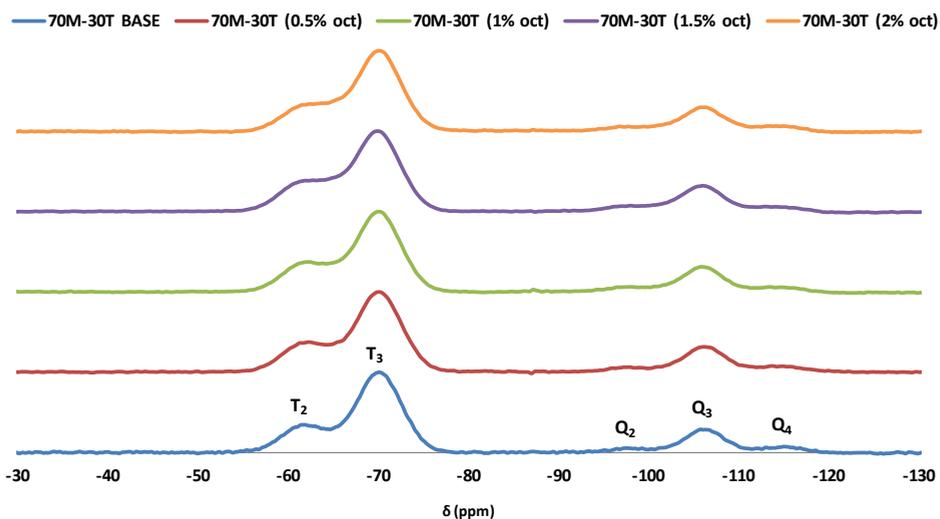


Figura 5.7: Espectro ^{29}Si -RMN sólido del sistema 70M-30T con diferentes de octenidina.

Como se puede observar en la figura 5.7, son las especies más condensadas las que predominan tras el tratamiento térmico. Tras el curado, no aparecen las señales asociadas a los precursores, por lo que éstos han reaccionado totalmente para dar dichas especies condensadas. En el caso del MTMOS, la señal más intensa corresponde a la especie más condensada (T_3).

En lo referente al TEOS, puede apreciarse la especie Q_4 (la más condensada) que no se veía en los espectros obtenidos en estado líquido. No se observan grandes diferencias de entrecruzamiento asociadas a un mayor contenido en octenidina.

A continuación, en la figura 5.8, se muestran los espectros obtenidos para el sistema 70M-30T y para los sistemas con diferentes porcentajes de clorhexidina.

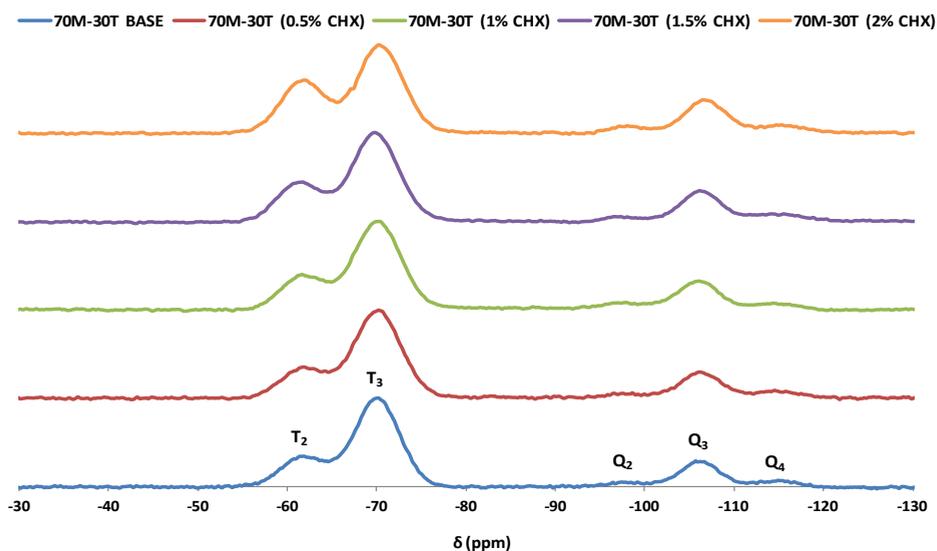


Figura 5.8: Espectro ^{29}Si -RMN sólido del sistema 70M-30T con diferentes de clorhexidina.

En el caso de los sistemas cargados con clorhexidina, el comportamiento es el mismo que el observado en la figura anterior (figura 5.7), las especies más abundantes son las de mayor grado de condensación para el MTMOS, la especie T_3 , y la especie Q_3 para el precursor TEOS, apareciendo la especie más condensada Q_4 , que no se observaba en los espectros de RMN en estado líquido. Además, se puede observar que un aumento en el porcentaje de clorhexidina, aumenta la intensidad de las señales menos condensadas T_2 del MTMOS, que concuerda con lo visto en la figura 5.6, donde la adición de este biocida, parecía ralentizar la cinética de reacción

Los resultados obtenidos para ambas familias de materiales corroboran que el tratamiento térmico aplicado es el adecuado para obtener una red entrecruzada y densa. Además, se comprueba también que la introducción de los bactericidas, no afecta a la correcta formación de la red.

3.2.2. Espectroscopia infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

Para la obtención de los espectros IR, se obtiene un film libre de los materiales y éste se tritura con un mortero y se mezcla con KBr para la obtención de una pastilla. Las medidas se realizan en el intervalo de $4000\text{-}450\text{ cm}^{-1}$.

En la tabla 5.2 y en la figura 5.9 se muestran las bandas características de la molécula de dihidrocloruro de octenidina y su espectro IR.

Tabla 5.2: Señales características de la molécula de octenidina en el IR.

Longitud de onda (cm^{-1})	Asignación
2925	C-H de CH_2 : vibración de tensión simétrica
1655	C=N: vibración de tensión
1590	
1560	C=C aromático: vibración de tensión
1460	CH_2 : vibración de tijera

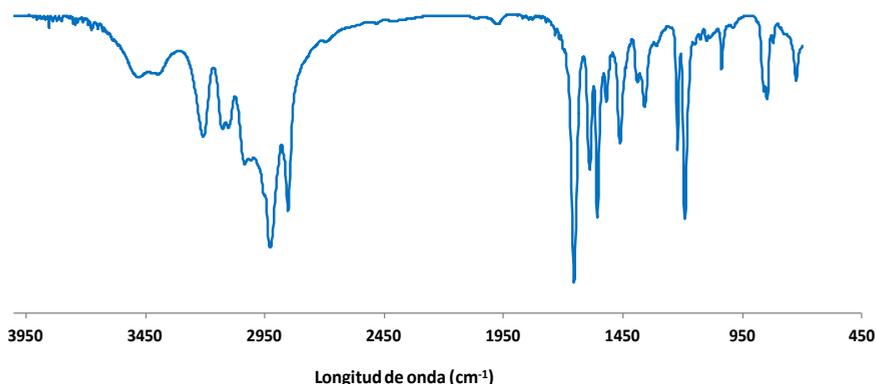


Figura 5.9: Espectro IR del dihidrocloruro de octenidina.

Tal y como se puede observar, la señal más intensa del espectro de la octenidina es la localizada a 1655 cm^{-1} , correspondiente a la vibración de tensión del doble enlace C=N (figura 5.10).

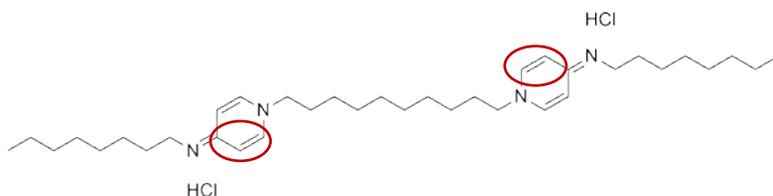


Figura 5.10: Estructura de la molécula de octenidina con dobles enlaces marcados en rojo correspondientes a la señal a 1655 cm^{-1} .

En la figura 5.11 se muestran los espectros IR de los recubrimientos cargados con diferentes porcentajes de octenidina.

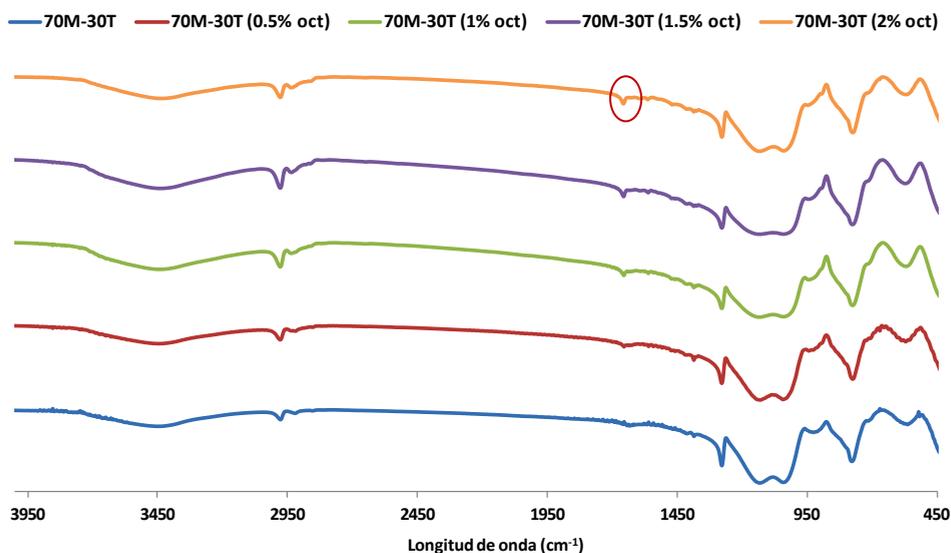


Figura 5.11: Espectro infrarrojo el sistema 70M-30T base y cargado con diferentes porcentajes de octenidina.

En todos los espectros se observan las bandas características de la red polisiloxánica. Estas bandas son las correspondientes a las vibraciones asociadas al enlace siloxano (-Si-O-Si-) a 1075 cm^{-1} , 1105 cm^{-1} y 760 cm^{-1} . La presencia de estas tres bandas en todos los casos (en el sistema base y en los cargados con el fármaco) confirma la formación de la red de sílice tras la síntesis y el tratamiento de curado al que han sido sometidos los materiales.

Además de las bandas características de la red, se observan también las asociadas al precursor MTMOS, concretamente a su grupo metilo no hidrolizable. Estas bandas son, la señal de vibración de tensión asimétrica del grupo metilo (-CH₃) a 2975 cm^{-1} , y la vibración de deformación del enlace (-Si-CH₃) a 1275 cm^{-1} . Por lo tanto, mediante la aparición de estas bandas se confirma el carácter híbrido de la red formada.

En cuanto a la introducción octenidina en la red, se aprecia una banda a 1655 cm^{-1} , que es inexistente en el sistema base, y que aumenta con el aumento de fármaco en los materiales. Esta vibración de enlace se corresponde con la vibración

de tensión (C=N) de la molécula de octenidina (figura 5.10). De este modo se puede concluir que el fármaco se ha incorporado a la red final con éxito. Por último, se aprecia una banda pequeña y ancha, debida a los grupos hidroxilo (-OH), que aparece a 3400 cm^{-1} , y que se puede ser debido a posible humedad presente en la muestra o a los grupos silanol que no han condensado (-Si-OH).

A continuación, en la tabla 5.3 y en la figura 5.12, se muestran las bandas típicas del diacetato de clorhexidina, así como su espectro IR.

Tabla 5.3: Señales características de la molécula de clorhexidina en el IR.

Longitud de onda (cm^{-1})	Asignación
3325	N-H de amina: vibración de tensión
2934	C-H de CH_2 : vibración de tensión antisimétrica
2859	C-H de CH_2 : vibración de tensión simétrica
1640	OH: vibración de deformación del agua C-N: vibración de tensión
1602	C=C aromático: vibración de tensión
1580	
1536	
1492	
1414	C-C inter-anillo: vibración de tensión
1371	
1290	C-N: vibración de tensión
1245	
660	C-Cl: vibración de tensión

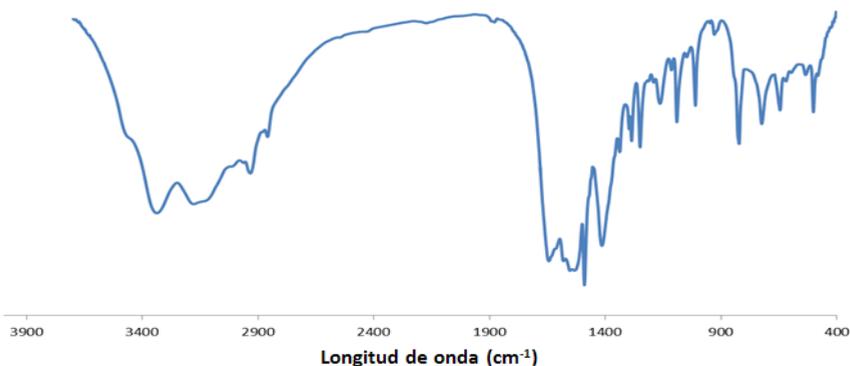


Figura 5.12: Espectro infrarrojo de la clorhexidina.

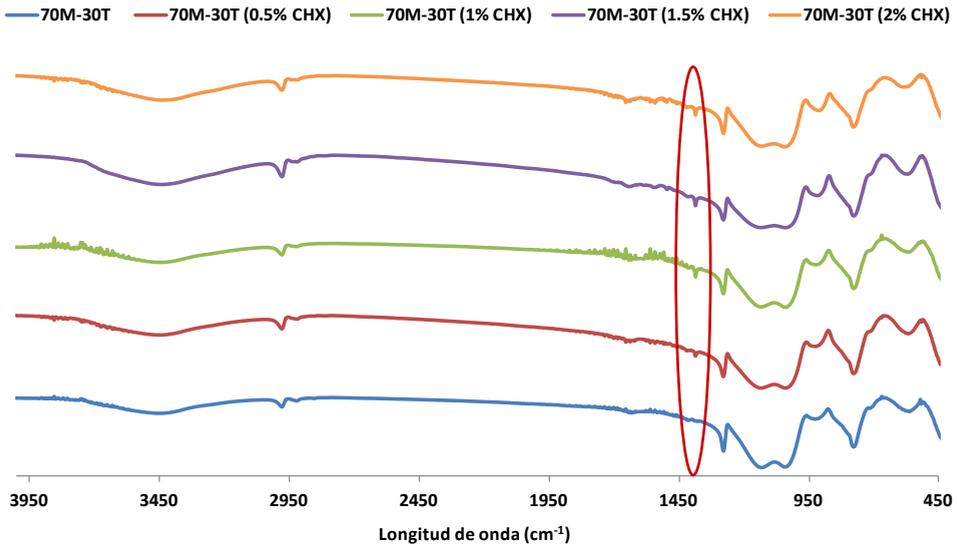


Figura 5.13: Espectro infrarrojo del sistema 70M-30T base y cargado con diferentes porcentajes de clorhexidina.

Al igual que en los espectros de los recubrimientos que incorporan octenidina se puede observar una región asociada a la formación de la red polisiloxánica. Estas señales son las que aparecen a una longitud de onda de 1075 cm^{-1} , 1105 cm^{-1} y 760 cm^{-1} , siendo las dos primeras las más intensas. Se observan también las señales del grupo metilo (no hidrolizable) del MTMOS, y la banda de los grupos hidroxilo (-OH).

En este caso, y debido a la incorporación de la clorhexidina, se puede observar una banda de muy baja intensidad alrededor de 1400 cm^{-1} (marcada en rojo), que se debe a la vibración de tensión del enlace (C-C) interanular de la molécula de clorhexidina. Al igual que en el caso anterior, esta banda aumenta en intensidad la aumentar la cantidad de biocida en los recubrimientos.

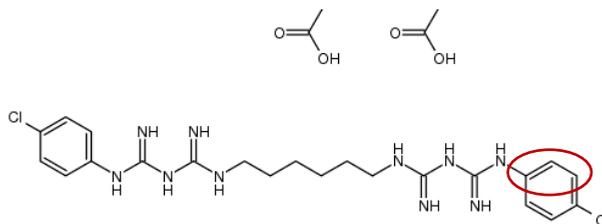


Figura 5.14: Estructura de la molécula de diacetato de clorhexidina con enlaces marcados en rojo correspondientes a la señal de 1400 cm^{-1} .

3.3. Determinación del grado de hidrofilia/hidrofobia

Con el fin de caracterizar el grado de hidrofilia/hidrofobia se realizan medidas del ángulo de contacto que forma una gota de agua destilada sobre los recubrimientos sintetizados. Los resultados obtenidos se muestran a en las figuras 5.15 y 5.16.

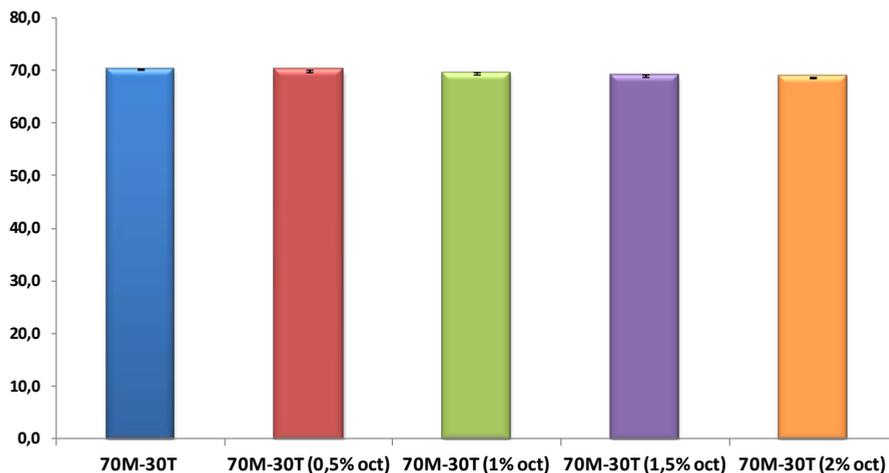


Figura 5.15. Valores de ángulo de contacto de los recubrimientos del sistema 70M-30T con diferentes porcentajes de octenidina.

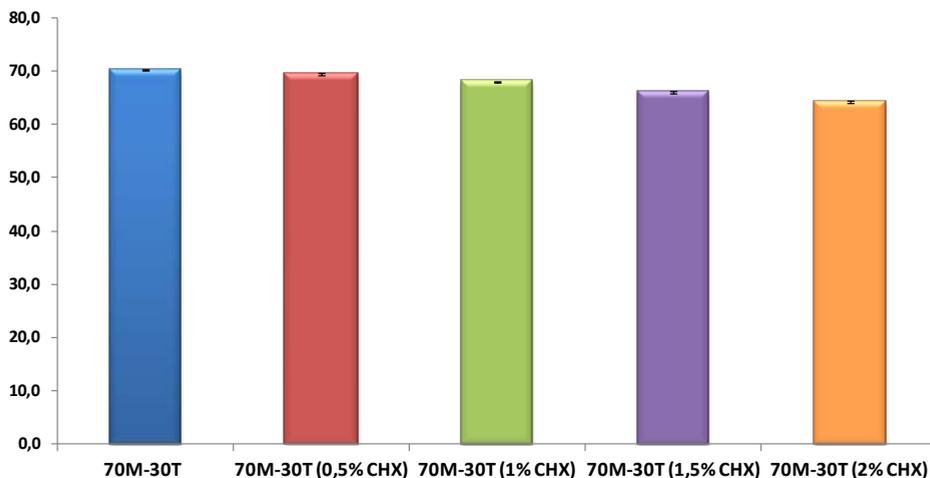


Figura 5.16. Valores de ángulo de contacto de los recubrimientos del sistema 70M-30T con diferentes porcentajes de clorhexidina.

Como se puede observar en ambas figuras, existe una ligera tendencia descendente del ángulo de contacto con la adición de estos agentes bactericidas en los recubrimientos. Es decir, los recubrimientos se vuelven más hidrófilos a mayor cantidad de biocida introducido. Esta tendencia se puede apreciar mejor en la adición de clorhexidina frente a la de octenidina.

Esta diferencia puede ser debida a que la CHX, tal y como se ha visto en la Figura 5.14, es una molécula con varios grupos polares, mientras que la molécula de octenidina tiene menos grupos polares y largas cadenas hidrófobas (figura 5.11). Además, en el estudio de la red formada por RMN en estado sólido (figura 5.8), la adición de mayores porcentajes de clorhexidina hizo que las especies menos condensadas se intensificaran ligeramente, dando lugar a una red más abierta que en el caso de la octenidina, y favoreciendo la hidrofilia de estos recubrimientos. De cualquier forma, para estos recubrimientos el ángulo de contacto ronda los 70°, siendo este resultado muy interesante, ya que es el valor que está descrito en bibliografía como el ángulo de contacto óptimo para la adhesión celular¹⁰.

3.4. Ensayos de degradación hidrolítica

Como en los casos anteriores, los resultados se dan en % de pérdida de masa frente a tiempo. En primer lugar se muestran los resultados obtenidos para los materiales con octenidina.

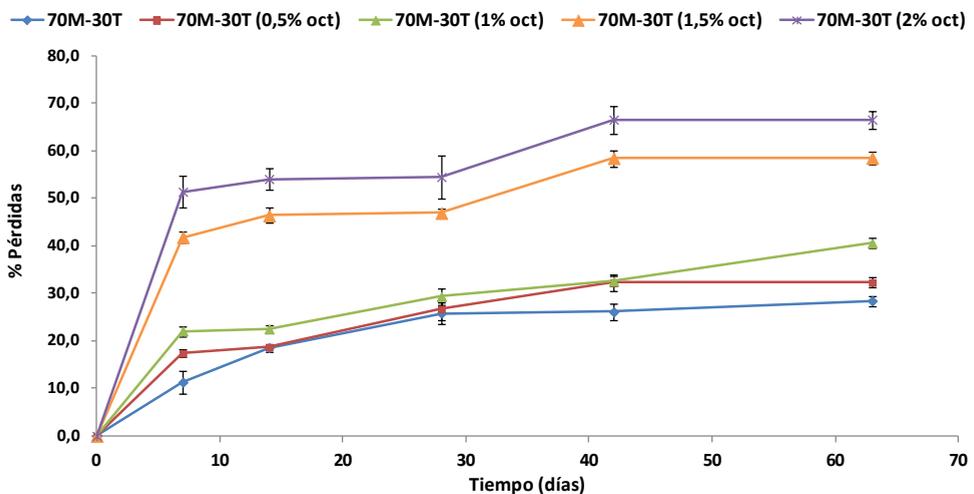


Figura 5.17: Degradación hidrolítica por pérdida de peso del sistema 70M-30T con diferentes porcentajes de octenidina.

En la figura 5.17, se observa una pérdida considerable de material durante los primeros 7 días para continuar después con una pérdida menos pronunciada, más gradual, hasta llegar a valores casi constantes al final del ensayo. Este perfil lo presentan tanto el recubrimiento que no contiene octenidina como los que están cargados con ella.

Adicionalmente, se observa que los sistemas que contienen el biocida sufren una pérdida de peso mayor que el sistema base, siendo ésta más acentuada a mayores porcentajes de octenidina. Esto puede ser debido, por una parte, a la mayor cantidad de octenidina que va liberándose en el tiempo a medida que la red va haciendo que estas pérdidas gravimétricas aumenten, y por otra, a que la introducción de esta molécula favorece la aparición de canales, haciendo al estructura más porosa, que permiten una mayor entrada de agua y, por lo tanto, una mayor degradación de la red siloxánica.

En la figura 5.18 se observan los resultados obtenidos para la degradación hidrolítica de los recubrimientos, que incorporan clorhexidina.

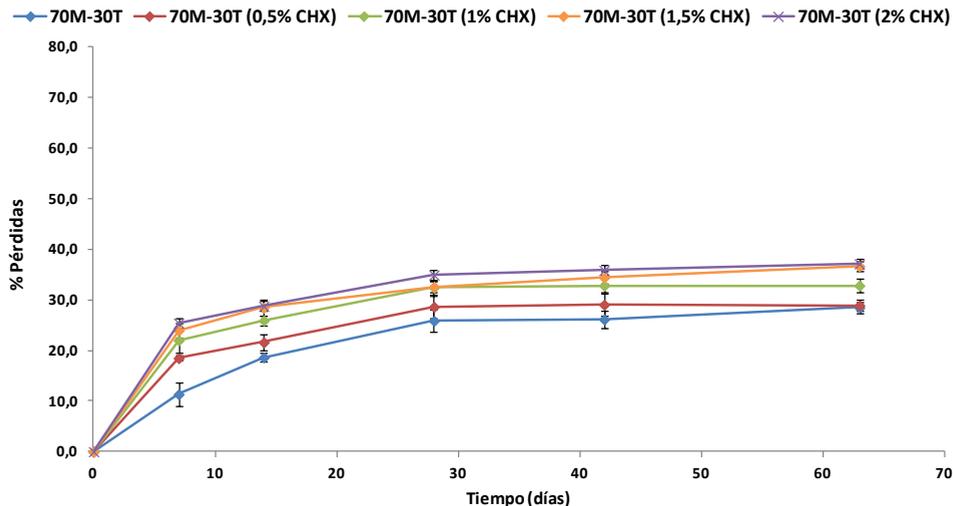


Figura 5.18: Degradación hidrolítica por pérdida de peso, del sistema 70M-30T con diferentes porcentajes de clorhexidina.

Al igual que el caso anterior, se observa que en todos los casos los materiales presentan una degradación rápida durante los primeros 7 días, para dar

lugar tras ello a una degradación más gradual en el tiempo. De nuevo, en lo referente a la adición del agente bactericida, los sistemas que llevan clorhexidina muestran porcentajes de degradación algo mayores que el sistema que no la lleva, y esto puede ser debido de nuevo, a la formación de canales por la incorporación del agente bactericida, al igual que en el caso de la octenidina.

Sin embargo, al comparar ambos grupos de recubrimientos, se observa que los sistemas cargados con clorhexidina presentan tasas de degradación mucho menores que sus homólogos con octenidina. Esto podría deberse a una posible unión débil (por ejemplo, puentes de hidrógeno), entre la clorhexidina y la red polisiloxánica, debido a los grupo amino protonados de su estructura, y que podría favorecer la permanencia de la clorhexidina en la red durante más tiempo. Sin embargo, la octenidina, no posee grupos que puedan establecer enlaces con la red, por lo que se encuentra físicamente atrapada en la red y su difusión y por lo tanto las pérdidas de peso son mayores.

3.5. Ensayos de liberación de Silicio (ICP)

Tal y como se ha comentado en capítulos anteriores, la importancia de este ensayo radica en que el Si liberado tiene una gran capacidad osteoinductora, esto es, promueve la creación de tejido óseo alrededor del implante^{11,12}.

En las figuras 5.19 y 5.20 se muestran los perfiles de liberación de Si obtenidos para los dos grupos de recubrimientos cargados con los dos biocidas.

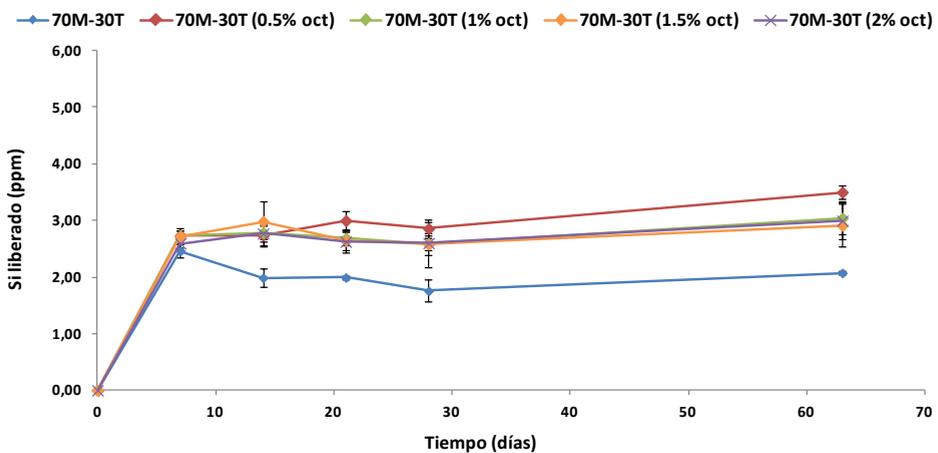


Figura 5.19: Liberación de silicio del sistema 70M-30T con diferentes % de octenidina.

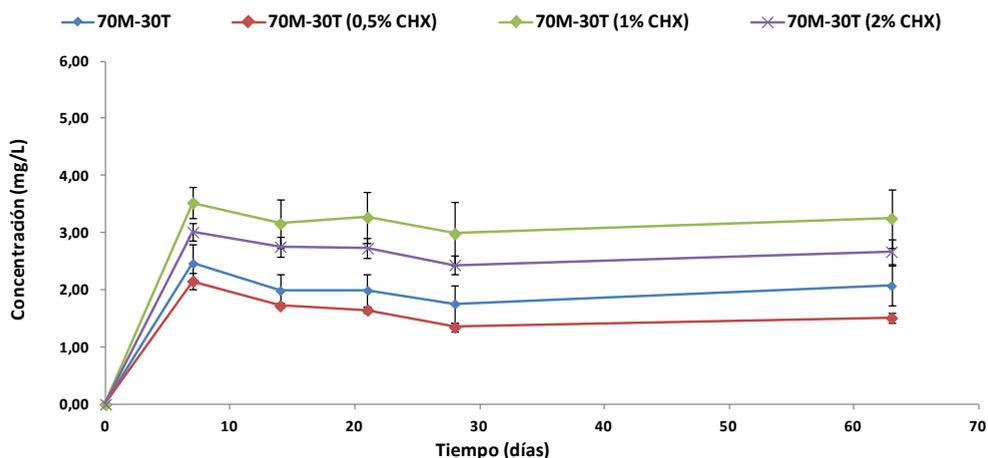


Figura 5.20: Liberación de silicio del sistema 70M-30T con diferentes % de clorhexidina.

Tal y como se observa en los estudios de degradación realizados por gravimetría, los sistemas que incorporan los biocidas tienen degradación hidrolítica mayor y por consiguiente una liberación de silicio también mayor en comparación con el sistema base, aunque en este caso la diferencia es menor. Esto podría ser debido a que en este caso en la medida, no interfiere la liberación del biocida, con lo que esta técnica nos da una idea más real de la degradabilidad de la red de silicio. La cinética de ambos grupos de sistemas es bastante similar, mostrando una liberación de Si más rápida en la primera semana y una liberación más lenta a partir de ese punto. Al comparar los valores de Si liberado en los dos grupos, se ve que son similares, por lo que las diferencias en cuanto a peso detectadas en las medidas gravimétricas entre ambos grupos, serán debidas únicamente a una mayor difusión de la octenidina frente a la clorhexidina.

En la figura 5.19, los sistemas con diferentes porcentajes de octenidina muestran una liberación de silicio mayor que el sistema 70M-30T, pero no se observan diferencias significativas en función del porcentaje de octenidina, siendo en todos los casos una liberación de silicio pronunciada durante los primeros 7 días, que dan lugar a una liberación más estable.

Este comportamiento es ligeramente diferente al observado en la degradación medida por gravimetría (figura 5.17), donde se observaba una mayor influencia del % de octenidina en las pérdidas de peso, lo que corrobora que la

difusión de la octenidina enmascara los valores de degradación obtenidas por gravimetría. Sin embargo, en el ensayo de ICP se mide la cantidad de silicio liberada en el medio acuoso, y en este caso el desprendimiento de la octenidina no afecta a la medida.

En los sistemas con clorhexidina (figura 5.20), se observa una ligera mayor influencia del agente bactericida en la liberación en comparación con las medidas obtenidas por gravimetría. Ahora bien, el comportamiento es muy similar en todos los casos y esto puede ser debido a que se trata de una técnica más precisa y con más capacidad de detectar diferencias.

3.6. Estudios de liberación del agente bactericida

Los recubrimientos sintetizados en este trabajo, como se ha visto anteriormente pueden ser utilizados como medio de liberación localizada de agentes terapéuticos¹, ya que se pueden cargar fácilmente y, y se degradan en medio fisiológico, provocando la liberación de los agentes al entorno.

Se ha utilizado la técnica espectroscópica de UV-Vis para detectar la concentración de biocida liberado, ya que ambos biocidas absorben luz UV a una longitud de onda característica, cuyo tamaño es proporcional a la concentración de la disolución. Así, se determinaron las longitudes de onda características de cada uno de los dos biocidas, siendo éstas 282 nm para la octenidina y 232 nm en el caso de la clorhexidina.

En este caso, calculados los límites de detección (0,6990 mg/L) y cuantificación (2,1184 mg/L), se puede concluir que con cantidades por debajo del 2,5% de ambos fármacos no es posible cuantificar la cantidad de fármaco liberado (LOQ) ni asegurar que lo haya (LOD). Por tanto, al ser las concentraciones de fármaco tan bajas, los datos obtenidos en las liberaciones no son fiables.

Sin embargo, para comprobar cómo se da la liberación en este tipo de sistemas, se han realizado ensayos introduciendo mayor cantidad de agente biocida en los recubrimientos. Así, se han hecho estudios de liberación para sistemas con un 2,5% y un 5% de biocida. Los resultados obtenidos, para cada uno de los biocidas, se muestran a continuación en las figuras 5.21 y 5.22.

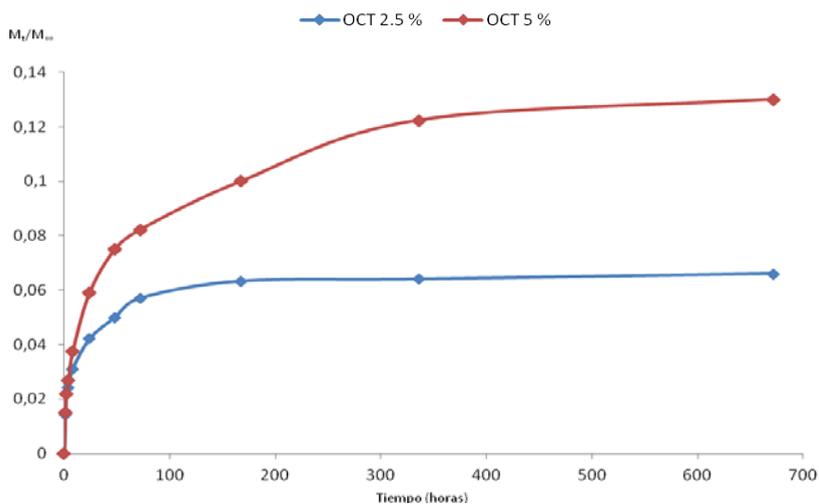


Figura 5.21: Liberación de octenidina para el sistema 70M-30T.

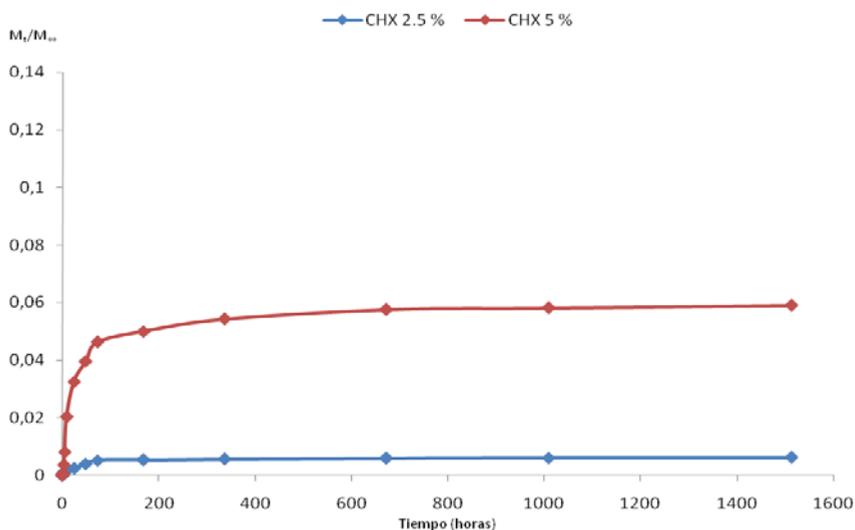


Figura 5.22: Liberación de clorhexidina para el sistema 70M-30T.

Las curvas obtenidas tienen el perfil de liberación esperado, mostrando una primera liberación inicial rápida proveniente del biocida que está albergado en los poros que se encuentran en contacto con el medio, seguida de una liberación más lenta proveniente de los poros internos, tal y como se ha visto en otros estudios de liberación de clorhexidina¹³. Este perfil es muy interesante ya que es importante que

el biocida actúe fuertemente durante los primeros días (que son los más propensos a la infección), y posteriormente sigue actuando de manera más gradual. Después de un cierto tiempo tras la colocación del implante, una liberación menor es suficiente para prevenir posibles infecciones posteriores.

La liberación de los agentes bactericidas está directamente relacionada con los procesos de degradación de la matriz que lo contiene¹⁴. Así, a mayores degradaciones hidrolíticas se darán mayores liberaciones. A pesar de que no se han realizado estudios de degradación con porcentajes tan altos de biocida, la relación entre el porcentaje de pérdidas en degradación y el porcentaje liberado se ve claramente en ambos casos. Los materiales que incorporan octenidina tienen una liberación mucho mayor de biocida que los mismos sistemas con clorhexidina, a pesar de llegar únicamente hasta un 14% de fármaco liberado en 1 mes de estudio. Este comportamiento ha sido estudiado por Mahtlig et al. y se debe a la poca solubilidad de la octenidina en agua¹⁵. Esta mayor liberación tiene lugar debido a la mayor pérdida de peso de los materiales con octenidina y además, podría confirmar la teoría de que la clorhexidina podría unirse a la red formada mediante puentes de hidrógeno a través de sus grupos amino protonados, mientras que la octenidina únicamente queda atrapada físicamente en la red, haciendo que en contacto con el agua y mediante la degradación del film, difunda al exterior más rápidamente y en mayor cantidad. Adicionalmente, y a la vista de los resultados se puede decir que la liberación de fármaco está influenciada por la cantidad de éste introducida en el recubrimiento¹⁴.

Con todo, mediante este estudio se confirma la capacidad de estos recubrimientos de liberar los agentes incorporados al exterior para cumplir su función antibacteriana.

3.7. Estudios *in vitro*

Tal y como se ha explicado anteriormente, los recubrimientos desarrollados deben tener capacidad bactericida suficiente para erradicar posibles bacterias de su superficie, y además promover la osteointegración del implante, favoreciendo los procesos de osteogénesis, sobre todo en los primeros instantes a la implantación. Para llevar a cabo los estudios *in vitro*, se recubren discos de titanio granallado mediante la técnica de deposición *Dip-Coating*, y la línea celular utilizada ha sido en todos los casos la línea celular de FBH (Fibroblastos Humanos).

3.7.1. Medida de la viabilidad celular utilizando el ensayo de MTT.

Para este estudio se cultivaron las células sobre los recubrimientos y se midió la actividad mitocondrial de las mismas mediante un kit colorimétrico MTT. Sólo se detecta actividad mitocondrial de las células vivas y adheridas al recubrimiento, por eso, la medida de absorbancia será directamente proporcional al número de células viables sobre el material.

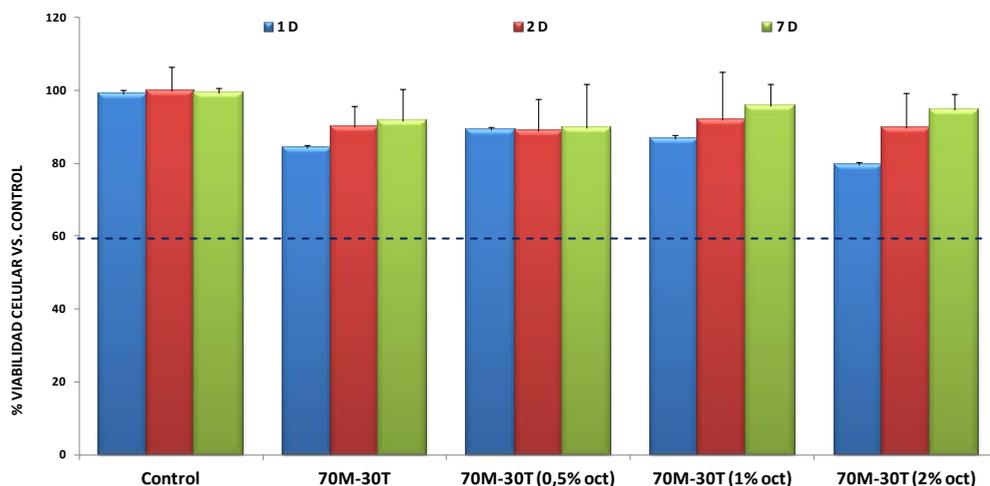


Figura 5.23: Estudio de la medida de la viabilidad celular con FBH del sistema 70M-30T con diferentes porcentajes de octenidina.

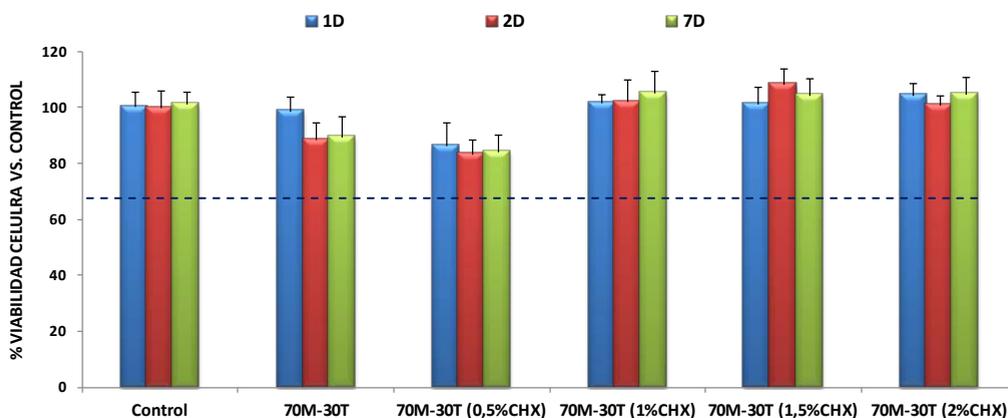


Figura 5.24: Estudio de la medida de la viabilidad celular del sistema 70M-30T con diferentes porcentajes de clorhexidina.

Como se puede observar en las figuras 5.23 y 5.24, todos los materiales estudiados muestran una viabilidad celular superior al 70% respecto al control, por lo que se puede decir que ninguno de ellos es citotóxico.

3.7.2. Medida de la adhesión y proliferación celular (ALAMAR BLUE).

Mediante el ensayo de Alamar Blue se evalúa la capacidad de adhesión y proliferación celular sobre las superficies de interés. Además, y teniendo en cuenta que mediante este ensayo, la células viables producen fluorescencia cuyos valores se miden por espectroscopia UV-VIS, se puede obtener también de este modo, una medida cuantitativa de la viabilidad celular.

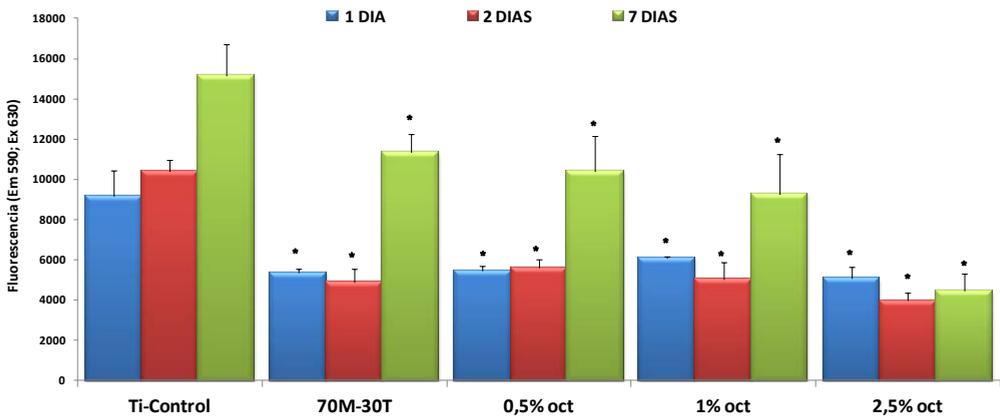


Figura 5.25: Resultados de Alamar Blue con FBH del sistema 70M-30T y los sistemas con diferentes porcentajes de octenidina.

En la figura 5.25, se muestran los resultados obtenidos de este estudio para el caso del sistema 70M-30T base y con diferentes cantidades de octenidina. En todos los casos, se obtienen valores de adhesión y proliferación celular menores que para el control. Al igual que en los sistemas que incorporaban quitosano, al recubrir los discos de titanio granallados, la rugosidad se enmascara por el recubrimiento haciendo que la cantidad de células adheridas disminuya. Esto es debido a que, como ya se ha comentado, una superficie moderadamente rugosa, favorece la adhesión celular y la posterior osteointegración en la intercara hueso/implante de manera más efectiva que una superficie lisa¹⁶. Por ello, la disminución de la rugosidad al recubrir las superficies, puede ser razón suficiente para que la adhesión celular sea menor. Además, la degradabilidad de estos materiales podría influir también en esta medida.

En cualquier caso, y exceptuando el sistema con mayor porcentaje de octenidina, la cantidad de células adheridas al recubrimiento aumenta con el tiempo hasta los 7 días.

A continuación, en la figura 5.26 se muestran los resultados obtenidos para los materiales con clorhexidina.

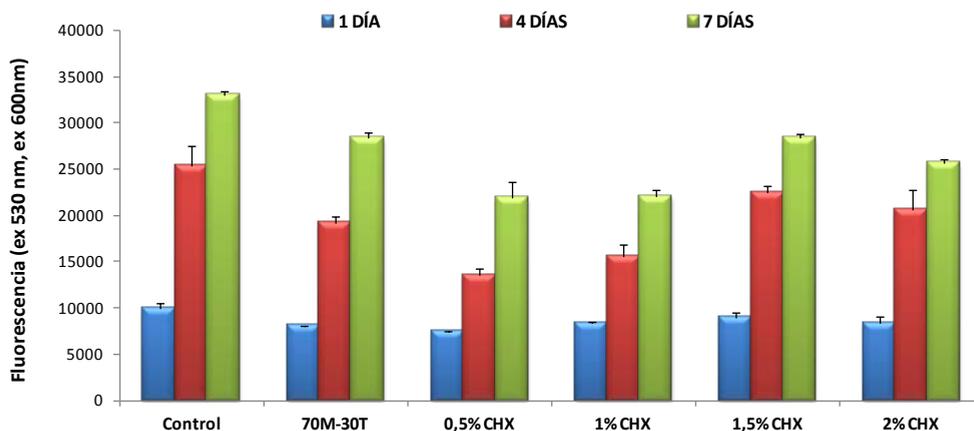


Figura 5.26: Resultados de Alamar Blue con MG -63 del sistema 70M-30T y los sistemas con diferentes porcentajes de clorhexidina.

En el caso de la clorhexidina, la adhesión celular alcanza valores mayores que en el caso de la octenidina, lo que puede estar relacionado con la menor degradabilidad de los recubrimientos con clorhexidina. Como se ha explicado en capítulos anteriores, cuanto mayor es la degradabilidad de los recubrimientos, estos se deslaminan y se desprenden en mayor medida del sustrato. Por lo tanto, en el caso de los sistemas que sufren mayores pérdidas de material (sistemas con octenidina), junto con el recubrimiento desprendido se desprenden también las células adheridas a él, haciendo que las medidas de adhesión y proliferación celular sean menores.

En todos los casos, y a pesar de obtenerse valores de adhesión menores que para el control, las células se proliferan de manera positiva con el tiempo de estudio.

3.7.3. Determinación de la actividad antibacteriana de los materiales.

La determinación de la actividad antibacteriana de los distintos materiales se llevó a cabo mediante la metodología de la norma ISO 22196:2007(E) frente a bacterias *Staphylococcus aureus* CECT 86.

A continuación en las figuras 5.27 y 5.28 se muestran los resultados obtenidos para el sistema 70M-30T con diferentes porcentajes de ambos biocidas.

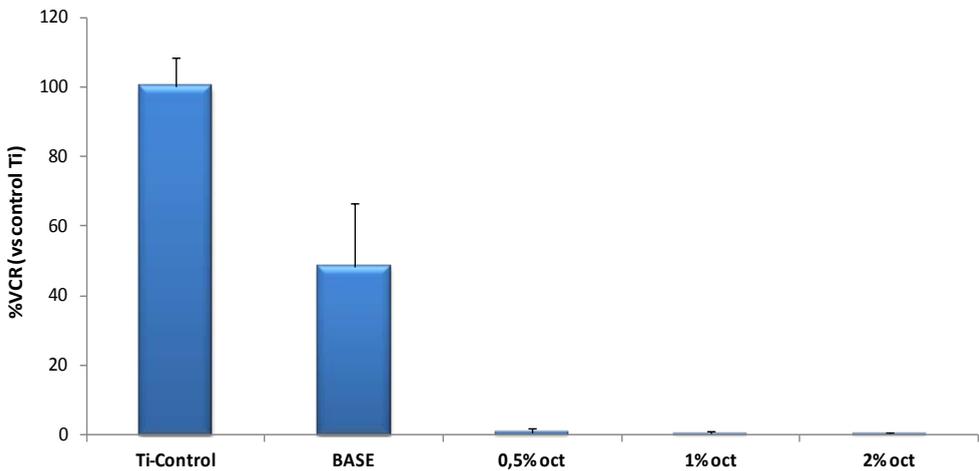


Figura 5.27: Determinación del número viable de bacterias para el sistema 70M-30T con diferentes porcentajes de octenidina.

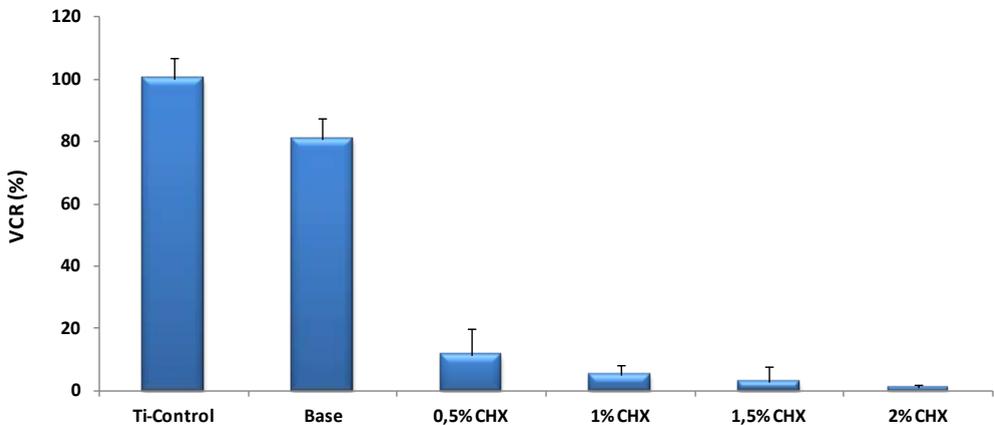


Figura 5.28: Determinación del número viable de bacterias para el sistema 70M-30T con diferentes porcentajes de clorhexidina.

Como se observa en ambas figuras, los sistemas cargados tanto con octenidina como con clorhexidina presentan un marcado carácter bactericida, aumentando éste con el porcentaje de biocida incorporado.

Al comparar ambas familias de materiales entre ellos se observa que los sistemas con octenidina poseen una capacidad bactericida más acentuada a menores porcentajes de ésta, lo que podría estar relacionado con su capacidad para difundir desde la matriz en mayores cantidades y más rápidamente (figura 5.21). Además, este comportamiento, es decir, la alta actividad bactericida de estos materiales junto con su liberación gradual y estabilidad en el tiempo, es un requisito necesario para la aplicación final de estos sistemas¹⁵.

Por último, se puede decir que los materiales sintetizados, tienen una clara capacidad antibacteriana no permitiendo el desarrollo de *Staphylococcus aureus* sobre su superficie.

4. CONCLUSIONES

A la vista de los resultados obtenidos, se puede destacar que se ha conseguido introducir satisfactoriamente y de forma sencilla los biocidas en la red polisiloxánica sin alterar el carácter híbrido de ésta para la mejora de la osteointegración de implantes dentales metálicos y con el fin de prevenir la periimplantitis.

Además, los recubrimientos presentan muy buenas propiedades superficiales (uniformidad, ausencia de grietas, transparencia y brillo), así como una excelente adhesión al sustrato metálico. Por todo ello, son materiales válidos para su uso en implantes dentales.

Se ha comprobado que la liberación del biocida está influenciada por la cantidad de éste introducida en el recubrimiento. Además, el perfil de liberación es muy interesante ya que muestra una primera liberación rápida que le permitirá actuar fuertemente durante los primeros días, que son los más propensos a la infección, seguida de una liberación más lenta suficiente para prevenir posibles infecciones posteriores. Estos recubrimientos pueden liberar los biocidas cumpliendo, por lo tanto con su función antibacteriana.

El estudio *in vitro* demuestra que ninguna formulación es citotóxica, y que además, todas las formulaciones estudiadas presentan actividad bactericida, siendo ésta mayor cuanto mayor es el porcentaje de biocida introducido, sobre todo para los materiales que incorporan octenidina, que aúnan esta alta capacidad antibacteriana con una buena cinética de liberación del agente biocida en el tiempo, para su aplicación en implantes dentales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Connell, L. S., Romer, F., Suárez, M., Valliant, E. M., Zhang, Z., Lee, P. D., & Jones, J. R. (2014). Chemical characterisation and fabrication of chitosan–silica hybrid scaffolds with 3-glycidoxypopyl trimethoxysilane. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(6), 668-680.
2. Paladini, F., Pollini, M., Sannino, A., & Ambrosio, L. (2015). Metal-based antibacterial substrates for biomedical applications. *Biomacromolecules*, 16(7), 1873-1885.
3. Campoccia, D., Montanaro, L., & Arciola, C. R. (2013). A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces. *Biomaterials*, 34(34), 8533-8554.
4. Harke, H. P. (1989). [Octenidine dihydrochloride, properties of a new antimicrobial agent]. *Zentralblatt fur Hygiene und Umweltmedizin= International journal of hygiene and environmental medicine*, 188(1-2), 188-193.
5. Hübner, N. O., Siebert, J., & Kramer, A. (2010). Octenidine dihydrochloride, a modern antiseptic for skin, mucous membranes and wounds. *Skin pharmacology and physiology*, 23(5), 244-258.
6. Obermeier, A., Schneider, J., Föhr, P., Wehner, S., Kühn, K. D., Stemberger, A., & Burgkart, R. (2015). In vitro evaluation of novel antimicrobial coatings for surgical sutures using octenidine. *BMC microbiology*, 15(1), 1.
7. Strydonck, D. A., Slot, D. E., Velden, U., & Weijden, F. (2012). Effect of a chlorhexidine mouthrinse on plaque, gingival inflammation and staining in gingivitis patients: a systematic review. *Journal of Clinical Periodontology*, 39(11), 1042-1055.
8. Martínez-Ibañez, M; Development of osteoinductive Si-based coatings to improve dental implants' performance, Universidad del País Vasco, 2015.

9. Lippmaa, E., Mägi, M., Samoson, A., Engelhardt, G., & Grimmer, A. R. (1980). Structural studies of silicates by solid-state high-resolution silicon-29 NMR. *Journal of the American Chemical Society*, *102*(15), 4889-4893.
10. Zolkov, C., Avnir, D., & Armon, R. (2004). Tissue-derived cell growth on hybrid sol-gel films. *Journal of Materials Chemistry*, *14*(14), 2200-2205.
11. Reffitt, D. M., Ogston, N., Jugdaohsingh, R., Cheung, H. F. J., Evans, B. A. J., Thompson, R. P. H., & Hampson, G. N. (2003). Orthosilicic acid stimulates collagen type 1 synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells in vitro. *Bone*, *32*(2), 127-135.
12. Patel, N., Best, S. M., Bonfield, W., Gibson, I. R., Hing, K. A., Damien, E., & Revell, P. A. (2002). A comparative study on the in vivo behavior of hydroxyapatite and silicon substituted hydroxyapatite granules. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *13*(12), 1199-1206.
13. Verraedt, E., Pendela, M., Adams, E., Hoogmartens, J., & Martens, J. A. (2010). Controlled release of chlorhexidine from amorphous microporous silica. *Journal of Controlled Release*, *142*(1), 47-52.
14. Medicott, N. J., Tucker, I. G., Rathbone, M. J., Holborow, D. W., & Jones, D. S. (1996). Chlorhexidine release from poly (ϵ -caprolactone) films prepared by solvent evaporation. *International journal of pharmaceutics*, *143*(1), 25-35.
15. Mahltig, B., Fiedler, D., & Böttcher, H. (2004). Antimicrobial sol-gel coatings. *Journal of sol-gel science and technology*, *32*(1-3), 219-222.
16. Wennerberg, A., & Albrektsson, T. (2009). Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clinical oral implants research*, *20*(s4), 172-184.

Conclusiones

CONCLUSIONES

Del trabajo anteriormente expuesto se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Se han desarrollado recubrimientos híbridos orgánico-inorgánicos antibacterianos, en base silicio, con la incorporación de diferentes agentes bactericidas, de manera reproducible y homogénea. Los films presentaron buenas características superficiales y buena adhesión a sustratos metálicos.
2. La incorporación de quitosano a la estructura reticulada del recubrimiento se realiza a través del enlace covalente con el GPTMS. Esta unión favorece su permanencia en la red. Los recubrimientos presentan unas adecuadas cinéticas de degradación hidrolítica y liberación de silicio, pudiendo ser moduladas mediante la incorporación de diferentes porcentajes de quitosano. Estos materiales presentan buenos resultados en cuanto a adhesión y proliferación celular, pero una limitada capacidad bactericida.
3. La incorporación de plata ha dado lugar a recubrimientos homogéneos y sin grietas. Estos materiales presentan unas buenas propiedades *in vitro* tanto en cuanto a biocompatibilidad como a acción bactericida, siendo esta alta, incluso con porcentajes bajos de plata.
4. El estudio de los sistemas que incorporan octenidina y clorhexidina da como resultado materiales homogéneos con buenas propiedades *in vitro*, siendo todos ellos no tóxicos, y con una alta acción bactericida. La incorporación de estos agentes en diferentes proporciones aumenta la hidrofilia de los materiales y permite modular la degradación de la red y la liberación de silicio de la misma, sobre todo en los sistemas con octenidina, sin comprometer en ninguno de los dos casos, su carácter híbrido ni dificultar su correcto entrecruzamiento.

Por último, y como conclusión global de este trabajo:

Se han desarrollado diferentes familias de recubrimientos bactericidas que podrán minimizar los riesgos de infecciones, bien en los instantes iniciales de la implantación o bien después de una periimplantitis, y que además, no solo no impedirán una buena osteointegración de los implantes, sino que incluso la podrían favorecer, debido a la acción osteogénica del silicio.

Como posible trabajo futuro dirigido sobre todo a completar los resultados obtenidos en esta tesis, se propone lo siguiente:

- La realización de ensayos que estudien el carácter bacteriostático de los sistemas que incorporan quitosano en su estructura.
- Estudios *in vivo* utilizando un modelo experimental, con periimplantitis inducida en perros Beagle, del recubrimiento aplicable en consulta.
- Estudios *in vivo*, con el fin de ver la biocompatibilidad y la acción osteointegradora de los diferentes recubrimientos seleccionados.

