

## Estudio de un nuevo cemento de polialquenoato vítreo preparado con poli(ácido $\gamma$ -glutámico) de origen microbiano

Antonio S. Ledezma-Pérez, Jorge Romero-García, Eduardo Arias-Marín  
*Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA). Gerencia de Biopolímeros  
 Blvd.. Enrique Reyna # 140, C.P. 25100, Saltillo, Coahuila, México*

Gregorio Vargas-Gutiérrez  
*Centro de Investigación y de Estudios avanzados del IPN. Unidad Saltillo  
 Carretera Saltillo-Monterrey Km 13. C.P. 25900, Ramos Arizpe, Coahuila, México.*  
 (Recibido: 10 de octubre de 2003; Aceptado: 13 de enero de 2006)

Este trabajo, describe el uso de un biopolímero de origen microbiano, poli(ácido  $\gamma$ -glutámico) ( $\gamma$ -PGA) en la preparación y fraguado de un nuevo cemento de polialquenoato vítreo. En el estudio se analizó el efecto de la masa molecular del biopolímero, el tamaño de partícula del vidrio, la relación polvo/líquido (P/L) y relación vidrio/polímero (V/P) sobre la resistencia a la compresión de los cementos. Se describe la caracterización de los cementos mediante espectroscopia infrarroja (IRFT). Se analizó además el desempeño de estos nuevos cementos con base en vidrio/ $\gamma$ -PGA con respecto a un cemento de polialquenoato vítreo (CPAV) comercial.

*Palabras clave:* Cementos de polialquenoato vítreo; Cementos ácido-base; Poli(ácido  $\gamma$ -glutámico).

This study described the use of a microbial biopolymer poly( $\gamma$ -glutamic acid) ( $\gamma$ -PGA) in the preparation and setting of a new polyalkenoate cement. In this study, the effect of biopolymer molecular weight, glass particle size, powder/liquid and powder/polymer ratios over the compressive strength of the cements were analyzed. Also we described the infrared spectroscopy (IRFT) characterization of the cement. The performance of these new materials was compared against a commercial restorative polyalkenoate cement.

*Keywords:* Vitreous polyalkenoate cement; Poly( $\gamma$ -glutamic acid); Acid-basic cements.

### 1. Introducción

Los cementos de polialquenoato vítreo (CPAV), constituyen una clase importante de biomateriales útiles en la práctica odontológica como materiales de restauración dental, así como agentes de adhesión de artículos utilizados en ortodoncia [1,2], y más recientemente se han considerado con aplicación potencial en la fijación de implantes [3] y en cirugía reconstructiva [4]. Los CPAV convencionales, son materiales compuestos constituidos por un material inorgánico (vidrio de fluoroaluminosilicato) y un polímero basado en poli(ácido acrílico), poli(ácido itacónico) o copolímeros de poli(ácido acrílico)-poli(ácido itacónico) [5]. La mezcla de sus componentes en un medio acuoso, genera una reacción ácido-base que permite el fraguado y endurecimiento del material [6-8]. El estudio de diversos parámetros en la preparación de los CPAV ha contribuido a la mejora en las propiedades físicas de estos materiales, tales es el caso de evaluaciones con respecto a la composición del vidrio [9-11], relación vidrio/polímero así como polvo/líquido [12,13], concentración y masa molecular del polímero (poli(ácido acrílico)) [14]. Estos estudios han permitido mejorar la resistencia a la compresión, flexión y sensibilidad a la humedad, sin embargo, en algunos casos estas características se han alcanzado sacrificando la estabilidad dimensional, la adhesión, liberación de fluoruro y la biocompatibilidad [2].

Actualmente, el uso de biopolímeros en aplicaciones biomédicas [15,16], representan una alternativa importante en la reducción de efectos secundarios como irritación, inflamación y toxicidad. Dentro de este contexto existe un biopolímero poli(ácido  $\gamma$ -glutámico) ( $\gamma$ -PGA), susceptible a ser utilizado en la preparación de CPAV. El poli(ácido  $\gamma$ -glutámico), es una poliamida soluble en agua y de origen natural producida por especies de microorganismos como *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis* [17,18]. Sus aplicaciones se han enfocado en su uso como agentes espesantes, humectantes, crioprotectores, materiales de liberación controlada de fármacos, adhesivos, suturas biodegradables, hidrogeles con gran capacidad de absorción de agua, agentes quelatantes de iones metálicos y aditivos en alimentos. Sin embargo, lo que atrajo nuestra atención, deriva de su estructura química, que al igual que los ácidos alquenoicos muestra grupos carboxílicos libres fundamentales para la reacción de formación de los CPAV.

Este trabajo tuvo como objetivo la preparación de cementos de polialquenoato vítreo a partir de un vidrio de fluoroaluminosilicato y poli(ácido  $\gamma$ -glutámico) biosintetizado por *B. licheniformis* ATCC-9945a, con el fin de obtener materiales con propiedades mecánicas aceptables sin afectar su respuesta en el medio biológico. Este estudio, describe el efecto de la masa molecular del biopolímero, el tamaño de partícula del vidrio, la relación polvo/líquido (P/L) y relación vidrio/polímero (V/P) sobre la resistencia a la compresión de los cementos. Se analizó

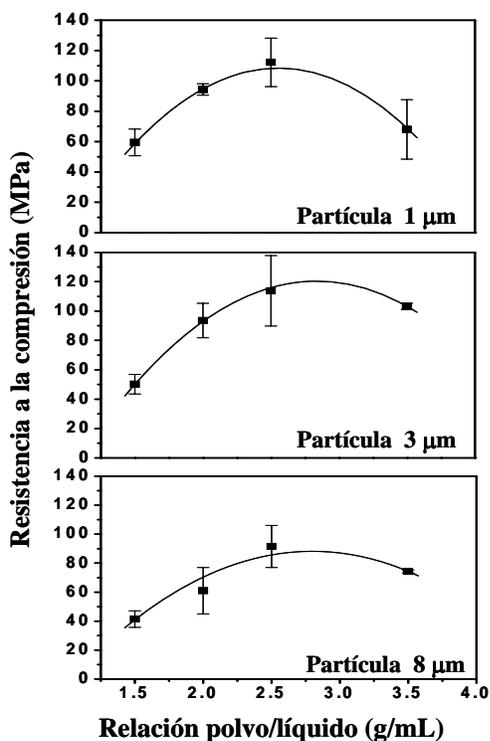


Figura 1. Efecto de la relación P/L sobre la resistencia a la compresión de cementos del sistema vidrio/ $\gamma$ -PGA, con una relación V/P de 3:1 g/g, tamaño de partícula de 1,3 y 8  $\mu$ m, madurados durante 7 días.

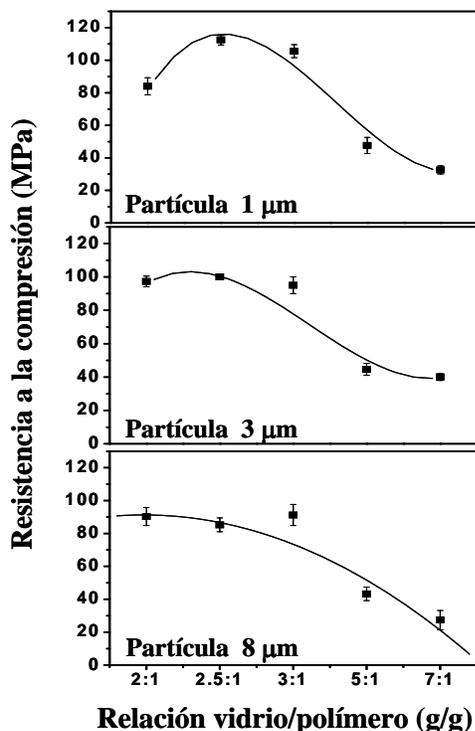


Figura 2. Efecto de la relación V/P, sobre la resistencia a la compresión de cementos del sistema vidrio/ $\gamma$ -PGA, con una relación P/L de 2.5 g/mL, tamaño de partícula de 1,3 y 8  $\mu$ m y madurados durante 7 días.

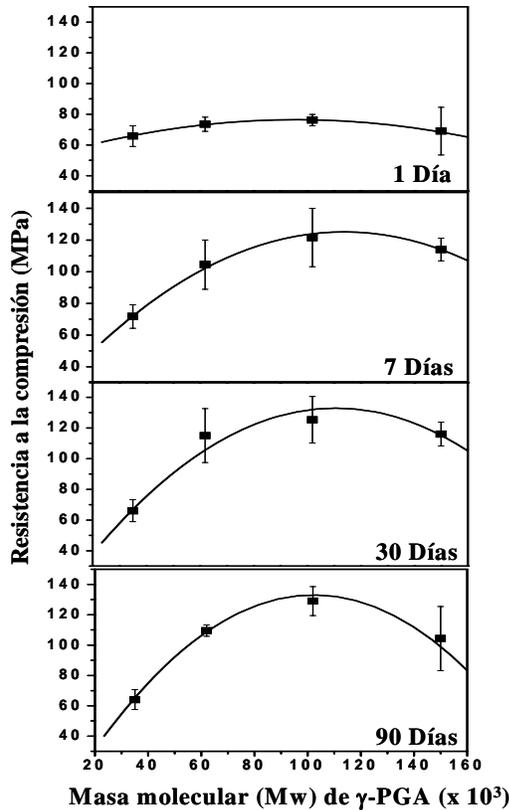
además el desempeño de estos nuevos cementos respecto a un CPAV comercial [19].

## 2. Desarrollo Experimental

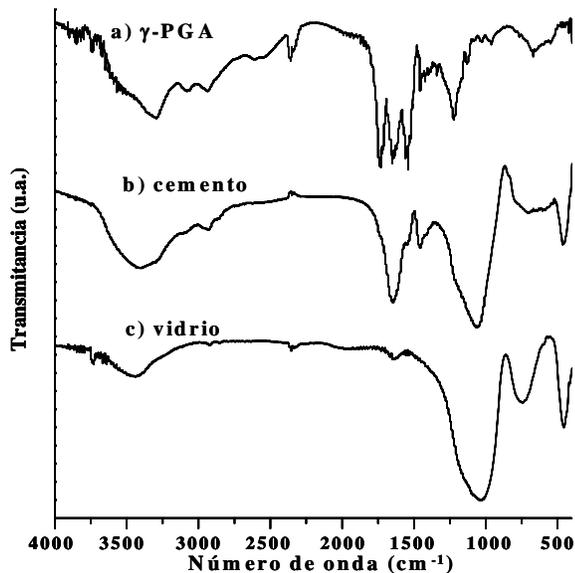
La biosíntesis de poli(ácido  $\gamma$ -glutámico) se desarrolló utilizando la cepa *B. licheniformis* ATCC-9945a. La bacteria se desarrolló en medio "E" descrito por Atsuo Goto[20] a 37 °C durante 96 h. El polímero crudo se extrajo del medio por precipitación con acetona y se purificó mediante diálisis en agua destilada durante 16 h. Se obtuvieron masas moleculares (Mw) del biopolímero en el intervalo de 10000 – 150000 aplicando un tratamiento de hidrólisis alcalina [21] con NaOH a 90 °C y tiempos de reacción de 1-7 horas. La masa molecular del polímero fragmentado se estimó mediante cromatografía de exclusión molecular (GPC), utilizando estándares de sales de sodio de ácido poli(estireno sulfónico), obtenidos de Polymer Laboratories, Inc., La forma ácida de  $\gamma$ -PGA, se obtuvo mediante tratamiento con resina de intercambio iónico Amberjet 1200 H (Aldrich).

El vidrio de fluoroaluminosilicato, se preparó de acuerdo a la composición siguiente: Sílice ( $\text{SiO}_2$ ), 40 %; Alúmina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), 30 %; Fluorita ( $\text{CaF}_2$ ), 10 %; Creolita ( $\text{Na}_2\text{AlF}_6$ ), 15 %; y Fosfato monoaluminico ( $\text{AlPO}_4$ ), 5 %. Los reactivos utilizados fueron de grado analítico (Aldrich), con purezas superiores al 99 %. La fusión se llevó a cabo en un horno de alta temperatura a 1450 °C por 2 h. El vidrio fundido se vertió inmediatamente en agua a fin de conservar su amorficidad. Los polvos de vidrio con tamaños de partícula promedio de 1 – 8  $\mu$ m se obtuvieron mediante tratamientos de molienda en un molino planetario y sedimentación de suspensiones en agua destilada.

Los cementos con base en vidrio/poli(ácido  $\gamma$ -glutámico) se prepararon mezclando uniformemente los componentes (vidrio y polímero) en mortero, depositando la mezcla en un vidrio de reloj enfriado a 4 °C, adicionando la cantidad requerida de una solución de ácido tartárico (Aldrich) al 10 % p/v y mezclando para formar una pasta que se vació en moldes de acrílico de 4 mm de diámetro por 6 mm de longitud. Los cementos se dejaron fraguar en el molde 1 h., se retiraron del mismo y se sometieron a un tratamiento de maduración de 1, 7, 30 y 90 días en cámara a 37 °C y 95 % humedad relativa. Para cada uno de los periodos de maduración se prepararon cementos con el producto comercial (Degussa tipo II) como material de comparación. Los ensayos de resistencia a la compresión, se desarrollaron en una máquina universal Instron 4301, utilizando una celda de carga de 5 kN y velocidad de desplazamiento de cabezal de 0.7 mm/min, de acuerdo a las especificaciones establecidas en la norma ISO-9917 (cementos dentales base agua) [22]. La caracterización por espectroscopia infrarroja (IRFT) de los cementos, se efectuó mediante la preparación de pastillas de polvo de cemento fraguado en KBr.



**Figura 3.** Comportamiento de la resistencia a la compresión de cementos con base en vidrio/poli(ácido  $\gamma$ -glutámico) respecto a la masa molecular y el tiempo de maduración en cámara a 37 °C y 95 % de humedad relativa.



**Figura 4.** Comparación mediante espectroscopia infrarroja de: a) poli(ácido  $\gamma$ -glutámico), b) cemento fraguado del sistema vidrio/ $\gamma$ -PGA c) vidrio de fluoroaluminosilicato.

### 3. Resultados y discusión

La figura 1, muestra una serie de graficas con un comportamiento parabólico de la resistencia a la compresión de los cementos del sistema vidrio/ $\gamma$ -PGA, respecto a la relación P/L, tamaño de partícula estudiado (1,3 y 8  $\mu$ m) y durante un período de maduración de 7 días.

En los cementos preparados con polvo de vidrio de tamaño de partícula de 1 y 3  $\mu$ m, la resistencia máxima se obtuvo con una relación P/L de 2.5 g/mL, registrando valores de resistencia de 112 y 113 MPa respectivamente. Con un tamaño de partícula de 8  $\mu$ m, la máxima resistencia fue de 91 MPa. El comportamiento descrito en este sistema, coincide con el reportado por S. Crisp y colaboradores[12], para cementos de polialquenoato vítreo utilizando poli(ácido acrílico). Su estudio describe el aumento de la resistencia a la compresión con el incremento progresivo de la relación P/L en el intervalo de 1.5 a 3.5 g/mL. Los resultados de nuestro estudio en el mismo intervalo, establecen una máxima resistencia a la compresión cuando se utilizó una relación P/L de 2.5 g/mL.

El efecto de la relación V/P sobre la resistencia a la compresión de cementos del sistema vidrio/ $\gamma$ -PGA, con una relación P/L de 2.5 g/mL, tamaño de partícula de 1, 3 y 8  $\mu$ m y tiempo de maduración de 7 días, se muestra en la figura 2. Los cementos preparados con un tamaño de partícula de 1 y 3  $\mu$ m, mostraron un incremento de la resistencia a medida que la proporción de vidrio con respecto al biopolímero se incrementó en el intervalo de 2:1 a 2.5:1 g/g, disminuyendo gradualmente a partir de este último nivel. La disminución gradual fue más evidente en los cementos con tamaño de partícula de 1  $\mu$ m. Los cementos con tamaño de partícula de 8  $\mu$ m presentaron un declinamiento de la resistencia respecto al incremento de la proporción de vidrio en el cemento. Los valores de máxima resistencia a la compresión obtenidos se registraron con una relación V/P de 2.5:1 g/g y tamaño de partícula de 1 y 3  $\mu$ m, con resistencias de 112 y 100 MPa respectivamente. El establecimiento de un balance en la relación V/P (2.5:1 g/g) puede explicarse debido a que cuando la proporción de vidrio en el cemento es alta, la proporción de poli(ácido) no es suficiente para reaccionar con la totalidad del vidrio, originando por consecuencia resistencias menores. Por otra parte, la proporción alta de polímero con respecto al vidrio, origina cementos con características plásticas y de menor resistencia.

El efecto de la masa molecular de poli(ácido  $\gamma$ -glutámico) sobre la resistencia a la compresión de cementos, aplicando los parámetros óptimos correspondientes a una relación polvo/líquido (P/L) de 2.5 g/mL, vidrio/polímero (V/P) de 2.5:1 g/g, polvo de vidrio con tamaño de partícula promedio de 1  $\mu$ m e intervalos de maduración de 1, 7, 30 y 90 días, se muestra en la figura 3. En la gráfica correspondiente a un periodo de 1 día de maduración de los cementos, no se aprecian diferencias marcadas en los valores de resistencia con respecto a la masa molecular del

biopolímero, registrando valores de 66, 74, 76 y 56 MPa con masas moleculares ( $M_w$ ) de 35000, 62000, 115000 y 150000 respectivamente. Sin embargo, el efecto de la masa molecular sobre la resistencia a la compresión es más evidente a partir de 7 días de maduración y hasta el término de la prueba (90 días). En las graficas correspondientes a periodos de maduración de 7, 30 y 90 días, se aprecia un comportamiento parabólico de la resistencia a la compresión con respecto a los niveles de masa molecular estudiados. Este comportamiento mostró un incremento en la resistencia a medida que la masa molecular aumentó de 35000 a 115000 y disminuyendo a partir de este último nivel. Los valores de máxima resistencia a la compresión obtenidos, se presentaron cuando se utilizó en la preparación de los cementos una masa molecular del biopolímero ( $M_w$ ) de 115000, registrando valores de resistencia de 121, 125 y 129 MPa a periodos de maduración de 7, 30 y 90 días respectivamente. El establecimiento de un balance respecto a la masa molecular del biopolímero, se puede explicar de la siguiente manera: a medida que la longitud de la cadena de polímero se incrementa, el grado de entrecruzamiento iónico de las polisales formadas también incrementa por la presencia en la cadena de una mayor densidad de grupos reaccionables, lo cual se refleja en un incremento de la resistencia. Sin embargo, hasta cierto límite, el incremento en la masa molecular, provoca interacciones de puentes de hidrógeno entre cadenas así como aumento en la viscosidad del polímero en solución que pueden afectar la resistencia en el cemento.

La figura 4, muestra la caracterización por espectroscopia infrarroja (FTIR) del cemento del sistema vidrio/ $\gamma$ -PGA, con una relación P/L de 2.5 g/mL, V/P de 2.5:1 g/g y vidrio con tamaño de partícula promedio de 1  $\mu$ m (4b). Además, se muestra como referencia el espectro del poli(ácido  $\gamma$ -glutámico) (4a) y del vidrio de fluoroaluminosilicato utilizado en el estudio (4c). En el espectro del poli(ácido  $\gamma$ -glutámico) (4a), se muestra la presencia de una banda a 1730  $\text{cm}^{-1}$  debida a la vibración ( $\nu$ ) del enlace C=O del grupo ácido, así como otra banda de vibración ( $\nu$ ) del enlace C-O a 1,223  $\text{cm}^{-1}$ . La vibración ( $\nu$ ) del enlace N-H del grupo amino se aprecia a 1,630  $\text{cm}^{-1}$  y la torsión ( $\delta$ ) N-H aparece a 1,546  $\text{cm}^{-1}$ . En el espectro del vidrio (4c), se muestra la vibración ( $\nu$ ) a 1,070  $\text{cm}^{-1}$ , característico del enlace Si-O del vidrio. La comparación de las bandas del cemento fraguado (4b), con respecto al poli(ácido  $\gamma$ -glutámico) (4a), muestra que las bandas correspondientes a la vibración ( $\nu$ ) del enlace C=O y C-O del grupo ácido del polímero, desaparecen en su totalidad en el cemento fraguado. Esto es un indicio de que la totalidad de los grupos ácido reaccionó con las partículas del vidrio. Por otra parte, en el cemento fraguado, la intensidad de la banda de la torsión ( $\delta$ ) del grupo N-H, localizada a 1546  $\text{cm}^{-1}$  disminuye significativamente, mientras que la vibración ( $\nu$ ) del enlace N-H a 1630  $\text{cm}^{-1}$  queda cubierta por la presencia de una banda que aparece a 1641  $\text{cm}^{-1}$ . Esto permite establecer que tanto los grupos funcionales

ácido como los grupos amino, presentes en la estructura del biopolímero, actúan como agentes quelatantes en la reacción de formación del cemento. Se observan también en el espectro del cemento fraguado (4b), bandas localizadas a 1641 y 1447  $\text{cm}^{-1}$ . De acuerdo a estudios de espectroscopia infrarroja de cementos de polialquenoato vítreo [7, 23], estas bandas corresponden a la formación de sales de policarboxilato de aluminio, mientras que las bandas observadas a 1544 y 1415  $\text{cm}^{-1}$  se atribuyen a la formación de sales de policarboxilato de calcio durante la reacción de formación del cemento.

En la figura 5, se presenta un análisis comparativo de la resistencia a la compresión de los cementos evaluados en el estudio. En esta figura se puede apreciar que el comportamiento de la resistencia en ambos materiales es similar. La resistencia máxima alcanzada a 90 días fue de 130 MPa para los cementos con base en vidrio/ $\gamma$ -PGA y de 140 MPa en el cemento comercial. Estos resultados permiten considerar al poli(ácido  $\gamma$ -glutámico) como un biopolímero con potencial en la preparación de cementos de polialquenoato vítreo.

#### 4. Conclusiones

La optimización de las variables polvo/líquido (P/L), vidrio/polímero (V/P), tamaño de partícula y masa molecular del biopolímero permitió el desarrollo de cementos con base en vidrio/poli(ácido  $\gamma$ -glutámico) con un desempeño de resistencia a la compresión semejante a la de un cemento comercial (130 y 140 MPa respectivamente). El análisis mediante espectroscopia infrarroja (FTIR), permitió establecer que tanto los grupos amino y carboxilo de la estructura del biopolímero actúan como agentes quelatantes en la reacción de formación del cemento. Con estos resultados, se establece el potencial del poli(ácido  $\gamma$ -glutámico) en la preparación de cementos de polialquenoato vítreo.

#### Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo financiero de este estudio a través del proyecto G-31196U y la beca (65111) de A. Ledezma-Pérez.

#### Referencias

- [1] A.D. Wilson and J.W. Mclean, Chicago, IL: Quintessence Int. Publishing, 57, (1988).
- [2] D.C. Smith, Biomaterials, **19**, 467 (1998).
- [3] I.M. Brook, P.V. Hatton, Biomaterials, **19**, 565 (1998).
- [4] R.T. Ramsden, R.C. Herdman and R.H. Lye, J. Laringol. Otho., **106**, 949 (1992).
- [5] J.A. Thomas, U.S. Patent No. 5622552 (1997).
- [6] A.D. Wilson, Chemical Soc. Rev., **7**, 265 (1978).
- [7] S. Crisp and A.D. Wilson, J. Dental Research, **53**, 1420 (1974).

- [8] A.D. Wilson, H.J. Prosser, S. Crisp, B.G. Lewis and S.A. Merson, *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Development.* **19**, 263 (1980).
- [9] S.G. Griffin and R.G. Hill, *Biomaterials.* **20**, 1579 (1999).
- [10] S.G. Griffin and R.G. Hill, *Biomaterials.* **21**, 399 (2000).
- [11] E. De Barra and R.G. Hill, *Biomaterials.* **21**, 563 (2000).
- [12] S. Crisp, B.G. Lewis and A.D. Wilson, *J. of Dentistry.* **4**, 287 (1976).
- [13] S. Crisp, B.G. Lewis and A.D. Wilson, *J. of Dentistry.* **5**, 51 (1977).
- [14] A.D. Wilson, S. Crisp and G. Abel, *J. of Dentistry.* **5**, 117 (1977).
- [15] C. Elvira, A. Gallardo, J. San Román, J. y A. López-Bravo, *Revista de Plásticos Modernos.* **77**, 49 (1999).
- [16] M.A. Benavides-Cuellar, *Revista Informador Técnico (SENA CDT-ASTIN. Cali, Colombia.* **62**, 24 (2001).
- [17] L. Gomez, R.D. Housewright, C. Thorne, *J. Bacteriol.*, **76**, 499 (1958).
- [18] G.A. Birrer, A.M. Cromwick, R.A. Gross, *Int. J. Biol. Macromol.*, **16**, 265 (1994).
- [19] A.S. Ledezma-Pérez. Tesis de Doctorado, CINVESTAV-IPN, Saltillo Coahuila, 2005.
- [20] Atsuo Goto and Masao Kunioka., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1031 (1992).
- [21] H. Kubata, Y. Nambu, T. Endo, *J. Polym Sci Part A: Polym Chem*, **34**, 1347 (1996).
- [22] International Organization for Standardization. ISO-9917, (1991).
- [23] *J. Biomed. Mat. Res.*, **48**, 700 (1999).