



# BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



## CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

### COMPARACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE CEPAS DE *Bacillus thuringiensis* PARA LA PREPARACIÓN DE BIOMATERIALES DE HIDROXIAPATITA.

Tesis que para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias con orientación  
en Bioquímica y Genética Microbiana

PRESENTA:

Eric Reyes Cervantes

ASESORES:

**Dr. Candelario Vázquez Cruz**  
**Dr. Ventura Rodríguez Lugo**

Puebla, Pue.

Febrero 2010

## **AGRADECIMIENTOS**

**A DIOS** por permitirme cumplir una meta más en mi vida y por los medios que me brinda para lograrlas.

**A MIS PADRES: JOSEFINA Y LÁZARO;** que siempre me han apoyado y más cuando las cosas se muestran difíciles, gracias por creer en mí, y gracias por la formación que me han dado, pero sobre todo por el amor que siempre me han demostrado.

Y de forma importante gracias a:

**DR. CANDELARIO VÁZQUEZ CRUZ** por brindarme su amistad y estas valiosas oportunidades de aprendizaje, así como su innegable apoyo y colaboración para realizar este trabajo y sobre todo por su paciencia.

**DR. VENTURA RODRÍGUEZ LUGO** por su amistad y por su apoyo incondicional para realizar este trabajo y otras metas personales, que sin su apoyo sería más complicado lograrlas.

**DR. EFRAÍN RUBIO ROSAS** por su amistad, por su apoyo y por ser un ejemplo para mí en lo que al quehacer científico se refiere, por brindarme su conocimiento sin reserva y por los gratos momentos dentro y fuera del trabajo que hemos compartido.

**AL CUERPO ACADÉMICO DEL CICM Y EN ESPECIAL A LA DOCTORA PATRICIA SÁNCHEZ Y AL DOCTOR RICARDO CARREÑO** por tiempo y sus acertados comentarios y correcciones necesarias para encausar mi trabajo.

**AL CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS.** Por ser un recinto en el cual he podido acercarme más a la ciencia y a la investigación, y porque además de conocimientos he ganado nuevos amigos (Dra. Rebeca Martínez, Jaque y Carmen...gracias por lo de los PCR's y principalmente por su amistad).

**AL CONACYT** por su apoyo durante mi estancia en estos estudios, pues me ha beneficiado con la Beca del Padrón Nacional de Posgrados, la cual sin duda es un gran aliciente para promover y apoyar el desarrollo científico y tecnológico en nuestro país, que está por demás decir: es necesario para avanzar como sociedad.

**AL CUV Y A LA BUAP** por haberme brindado la oportunidad de acercarme un poco más a mis sueños y porque aquí he aprendido tanto de todo.

**AL PROYECTO DE CONACYT SEP 2004 CO1 47120**

**AL CONVENIO P.I.F.I. 3.3**

## **DEDICATORIAS**

A ti “GÜERO CHUY” disculpas la irreverencia.

A mi familia (que está creciendo...Champi e Iván), pues no importa a donde vaya o de donde venga, siempre tendré a alguien que me piense y espere con cariño.

A mis hermanos: Gore, Jesús, Auro, Techis y Joselo; por su compañía y por todas esas horas de juegos y travesuras que nunca podría olvidar, por escucharme y por apoyarme siempre que lo necesito.

A todos *mis amigos* por hacer de la vida algo maravilloso; no pongo nombres porque no hay espacio...y no es porque se me olviden, (simplemente no podría olvidarlos) ya que saben brindar tan gratos momentos, y en especial a todos aquellos amigos que gustan de soñar despiertos... pues que sería del mundo sin sueños... es más ¡Qué sería de mí!

A la estrella que más brilla..., por ser musa inspiradora espero que estar juntos sea nuestro destino. (No es necesario que me digas que: ¡¡¡ más me vale!!!)

A todos aquellos maestros (entre ellos mi Padre) y maestras que con paciencia y esmero compartieron sus conocimientos y años en las aulas y en varias ocasiones fuera de ellas sin esperar mención alguna y tal vez su satisfacción fue ver a mis compañeros y a mi pasar un curso más, no me alcanza este esfuerzo compartido, pero aún así se los dedico, no en pago, porque sé que no basta, sino en reconocimiento...muchas gracias.

## **RESUMEN**

En el presente trabajo se propuso sintetizar por el método biomimético el crecimiento de cristales de hidroxiapatita en un soporte microbiano de fácil acceso pero que debería ser sometido a un análisis riguroso de calidad, para certificar que el material cubriría el máximo beneficio de seguridad por estar incluido en la categoría de inocuo para el humano y el ambiente.

La motivación esta tesis tiene que ver con mostrar la aplicación de metodologías innovadoras de síntesis y caracterización de la hidroxiapatita sobre la membrana celular de bacterias Gram positivas de la especie *Bacillus thuringiensis* que en términos prácticos aplicados es inocua para el ser humano.

En cuanto a la mejor cepa para llevar a cabo la nucleación del fosfato de calcio en formas cristalinas, esta se observó clara y profusamente con las cepas 83 y 85 de *B. thuringiensis*. En cuanto a la generación de un certificado molecular de caracterización microbiana los marcadores del tipo MLST (*multilocus sequence typing*) desarrollados por la Universidad de Oslo fueron muy apropiados para la diferenciación entre cepas, ya que usando la base de datos de bacterias del grupo *B. cereus*, se confirmó el uso de *B. thuringiensis* con los marcadores específicos de los genes *ilvd*, *ilvd2*, *glpF*, *pur* y *pta*. Con estos marcadores asignó la identidad de los aislados a la especie *B. thuringiensis* subespecie *kurstaki* y *soto*.

El fluido fisiológico simulado óptimo fue a 1.5 de concentración, además las pruebas de Microscopia Óptica y Microscopia de Fuerza Atómica comprobaron que la morfología de las bacterias es la de *Bacillus* por otra parte la Microscopia Electrónica de Barrido, Espectroscopia de Dispersión de Rayos X, Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier y Difracción de Rayos X, demostraron que el material obtenido tiene la morfología típica de la hidroxiapatita obtenida por el método biomimético, además de que se comprueba que la fase cristalina es precisamente la de la Hidroxiapatita de Calcio.

## **ABSTRACT**

The aim of this work is the growth of hydroxylapatite crystals in a microbial support using the biomimetic method the biological material was subjected to rigorous analysis of quality, certifying that the material would cover the maximum safety benefit by being included in the category of harmless to humans and the environment.

The motivation on this thesis has being the application of innovative methodologies for synthesis and characterization of hydroxylapatite on the surface of cellular membrane of Gram-positive species, specific *Bacillus thuringiensis*, because in practical terms is harmless to humans.

The best strain to perform the nucleation of calcium phosphate crystals was seen clearly and thoroughly in strains 83 and 85 of *B. thuringiensis*. The generation of a certificate microbial molecular characterization of such markers MLST (multilocus sequence typing) developed by the University of Oslo was well suited for differentiating between strains, since using the database of bacteria in group *B. cereus*, confirmed the use of *B. thuringiensis* with specific markers of genes *ilvd*, *ilvd2*, *glpF*, *pur* and *PTA*. With these markers was confirmed the identity of the isolates to the species *B. thuringiensis* subspecies *kurstaki* and *soto*.

The optimum concentration in the simulated body fluid was 1.5, Optical Microscopy and Atomic Force Microscopy found that the bacterial morphology is *Bacillus* moreover Scanning Electron Microscopy, Spectroscopy X-Ray Scattering, Spectroscopy Fourier Transform Infrared and X-ray Diffraction shown that the material obtained has the classic morphology of hydroxylapatite obtained by the biomimetic method, besides the crystalline phase found it is precisely calcium hydroxylapatite.

# ÍNDICE GENERAL

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>i</b>
<b>DEDICATORIAS</b> .....	<b>ii</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>iv</b>
<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	<b>v</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>vi</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>vii</b>
<b>ÍNDICE DE ECUACIONES</b> .....	<b>viii</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>ix</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>2</b>
1.1 ANTECEDENTES .....	2
1.2 MARCO TEÓRICO.....	4
1.3 LOS BIOMATERIALES.....	5
1.4 CLASIFICACIÓN DE LOS BIOMATERIALES .....	7
1.4.1 BIOMATERIALES CERÁMICOS.....	7
1.4.2 BIOMATERIALES NATURALES.....	9
1.4.2.1 COLÁGENO Y SUS DERIVADOS:.....	9
1.4.2.2 CELULOSA:.....	10
1.4.2.3 QUITINA Y QUITOSAN:.....	11
1.4.2.4 PROTEGLUCANOS Y GLUCOSAMINOGLUCANOS: .....	11
1.4.3 MATERIALES COMPÓSITOS.....	12
1.5 FOSFATOS DE CALCIO .....	13
1.6 HIDROXIAPATITA DE CALCIO .....	15
1.6.1 ESTRUCTURA DE LA HIDROXIAPATITA DE CALCIO .....	16
1.6.2 USOS Y APLICACIONES DE LA HAp.....	18
1.7 MÉTODOS DE SÍNTESIS DE HIDROXIAPATITA .....	19
1.7.1 PROCEDIMIENTOS DE SOLUCIÓN.....	19
1.7.2 MÉTODOS EN ESTADO SÓLIDO .....	19
1.7.3 SISTEMA HIDROTÉRMICO .....	20
1.7.4 MÉTODOS A BAJA TEMPERATURA.....	22
1.7.5 MÉTODO SOL GEL.....	22
1.7.6 PRECIPITACIÓN HOMOGÉNEA.....	23
1.7.7 MÉTODO QUÍMICO HÚMEDO .....	24
1.7.8 CONTROL DE NUCLEACIÓN Y CRECIMIENTO DE CRISTALES DE HIDROXIAPATITA SOBRE SOPORTES ORGÁNICOS. ....	24
1.7.9 REACCIÓN DE HIDRÓLISIS.....	25
1.7.10 MÉTODO DE ESPRAY PIRÓLISIS .....	25
1.7.11 MÉTODO BIOMIMÉTICO .....	26
1.8 <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	28
1.8.1 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	30
1.8.2 Diferenciación de cepas de " <i>B. cereus-thuringiensis</i> " .....	31
1.9 HIPÓTESIS.....	33
1.10 OBJETIVOS .....	33
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>34</b>
<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>34</b>
<b>CRECIMIENTO DE HIDROXIAPATITA SOBRE LA MEMBRANA CELULAR DE <i>Bacillus thuringiensis</i></b> .....	<b>34</b>

2.1	MATERIALES, MEDIOS, SOLUCIONES .....	34
2.2	TÉCNICAS PARA LA OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE HIDROXIAPATITA SOBRE LA SUPERFICIE DE <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	36
2.2.1	CULTIVO CELULAR.....	36
2.2.2	ANÁLISIS DE PCR (reacción de la cadena de la polimerasa) .....	36
2.2.3	ANÁLISIS FILOGENÉTICO .....	37
2.2.4	PREPARACIÓN DE LAS MEMBRANAS MILLIPORE™ CON BACTERIAS DE <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	37
2.2.5	IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO BIOMIMÉTICO.....	38
2.2.6	ANÁLISIS POR MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA (AFM) .....	39
2.2.7	ANÁLISIS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO Y ESPECTROSCOPIA POR DISPERSIÓN DE RAYOS X (SEM Y EDS) .....	39
2.2.8	ANÁLISIS POR ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	40
2.2.9	DIFRACCIÓN DE RAYOS X .....	40
<b>CAPÍTULO III .....</b>		<b>41</b>
<b>RESULTADOS.....</b>		<b>41</b>
3.1	CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA POR MICROSCOPIA ÓPTICA .....	41
3.2	CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA POR PCR .....	46
3.3	ANÁLISIS FILOGENÉTICO LAS SECUENCIAS DE <i>B. thuringiensis</i> .....	49
3.4	CARACTERIZACIÓN POR MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA .....	51
3.5	CARACTERIZACIÓN POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO..	58
3.6	DISCUSIÓN .....	75
3.7	CONCLUSIONES .....	82
3.8	REFERENCIAS.....	83
<b>ANEXOS .....</b>		<b>87</b>
<b>MEDIOS Y SOLUCIONES.....</b>		<b>87</b>
<b>RECONOCIMIENTOS.....</b>		<b>90</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>CAPÍTULO I</b>		Págs.
Tabla 1-1	Fosfatos de Calcio de interés biológico .....	14
Tabla 1-2.	Composición del hueso.....	15
Tabla 1-3.	Datos Cristalográficos de la HAp.....	17
Tabla 1-4	Reacciones hidrotermal en materiales sólidos .....	21
<b>CAPÍTULO II</b>		
Tabla 2-	1 reactivos usados en todo el proceso.....	34
<b>CAPÍTULO III</b>		
Tabla 3-1	Análisis fenotípico de las cepas.....	42
Tabla 3-2	productos de amplificación de secuencias de DNA correspondientes a genes usados para el análisis MLST en cepas de " <i>B. thuringiensis-cereus</i> .....	48
Tabla 3-3	se observan los resultados del análisis BLAST .....	49

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Págs.
<b>CAPÍTULO I</b>	
Figura 1-1 Implante meniscal de colágeno.....	10
Figura 1-2 materiales compósitos.....	12
Figura 1-3 Estructuras de los cristales de HAp.....	18
<b>CAPÍTULO II</b>	
Figura 2-1 membrana Millipore™ la de la izquierda es el control y la de la derecha muestra como se observa la HAp que crece sobre Bt.....	39
<b>CAPÍTULO III</b>	
Figura 3-1 microscopias ópticas de las cepas 18, 24, 26, 29, 34, 39 y 40E en donde se observa la morfología típica de <i>Bacillus</i> .....	43
Figura 3.2 micrografías de las cepas 1, 13, 20, 64, 70, 83 y 85 en donde se observa la morfología típica de los <i>Bacillus</i> .....	45
Figura 3-3 fotografía de gel de agarosa.....	47
Figura 3-4 fotografía de gel de agarosa.....	47
Figura 3-5. Árbol filogenético circular basado en <i>locus pur</i> .....	50
Figura 3-6. Árbol filogenético circular basado en <i>locus glpF</i> .....	51
Figura 3-7 micrografías de topografía y análisis de la rugosidad de la cepa 70.....	52
Figura 3-8 micrografías de la cepa 70 en modo fase.....	53
Figura 3-9 micrografías de la cepa 83 en modo topografía y análisis de rugosidad....	54
Figura 3-10 micrografías de la cepa 83 en modo fase.....	55
Figura 3-11 micrografías de AFM de la cepa 85 en modo topografía y análisis de rugosidad.....	56
Figura 3-12 micrografías de fase de la cepa 85.....	57
Figura 3-13 micrografía donde se observa la morfología de la membrana Millipore™ y su estructura 3D.....	58
Figura 3-14 micrografías de la membrana millipore™ y su análisis EDS.....	59
Figura 3-15 micrografías de la cepa 70 con su análisis EDS.....	60
Figura 3-16 micrografías de la cepa 83 y su análisis EDS.....	61
Figura 3-17 micrografías y EDS de la cepa 85.....	62
Figura 3-18 micrografías donde se muestra el material obtenido en la membrana de la cepa 70.....	64
Figura 3-19 micrografías del material obtenido sobre la cepa 83.....	66
Figura 3-20 micrografías donde se muestra el material obtenido sobre la cepa 85....	68
Figura 3-21 espectro EDS de HAp.....	69
Figura 3-22. Micrografía de la cepa 39.....	70
Figura 3-23. Micrografías del material obtenido sobre la cepa 39.....	70
Figura 3-24 espectrograma infrarrojo de las muestras de HAp y la membrana millipore™.....	71
Figura 3-25 difractograma de la membrana millipore™.....	72
Figura 3-26 difractograma del material obtenido en la cepa 70.....	73
Figura 3-27 difractograma del material obtenido en la cepa 83.....	73
Figura 3-28 difractograma del material obtenido en la cepa 83.....	74

## ÍNDICE DE ECUACIONES

<b>CAPÍTULO I</b>		Págs.
$M_{10} (RO_4)_6(X)_2$ ..... (Ec.1-1).....		16
$HCONH_2 + H_2O$ $H_2O + NH_3$ ..... (Ec. 1-2) .....		23
$10 Ca (OH)_2 + 6H_3PO_4$ $Ca_{10} (PO_4)_6(OH)_2 + 18 H_2O$ .....(ec. 1-3).....		24
$10Ca(NO_3)_2 + 6Na_3HPO_4 + 2H_2O$ $Ca_{10} (PO_4)_6 (OH)_2 + 12NH_4 NO_3 +$ $8HNO_3$ ....(ec. 1-4).....		24
$10Ca(NO_3) + 6H_3PO_4 + 20NH_4OH$ $Ca_{10} (PO_4)_6 (OH)_2 + 20NH_4NO_3 +$ $18H_2O$ ....(ec. 1-5) .....		24
$10CaCl_2 + 6K_2HPO_4 + 20 NH_4OH$ $Ca_{10} (PO_4)_6 (OH)_2 + 20NH_4Cl + 12KOH + 6H_2O$ .....(ec. 1-6).....		24

## Abreviaturas

AFM	MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA - ATOMIC FORCE MICROSCOPY
DRX	DIFRACCIÓN DE RAYOS X - X-RAY DIFFRACTION
EDS	ESPECTROSCOPIA POR DISPERSIÓN DE RAYOS X - SPECTROSCOPY X-RAY SCATTERING
FTIR	ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER - FOURIER TRANSFORM INFRARED
HAp	HIDROXIAPATITA
MLST	MULTILOCUS SEQUENCE TYPING
PCR	POLIMERASE CHAIN REACTION
SEM	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO - SCANNING ELECTRON MICROSCOPY

## INTRODUCCIÓN

Las huellas más antiguas que se pueden identificar de los seres humanos y su actividad transformadora son precisamente sus “restos materiales”. Los historiadores clasifican las grandes edades de la civilización humana según los materiales usados y las tecnologías adoptadas. Así, el *Paleolítico* es la fase de la evolución en la que los seres humanos utilizaron principalmente la *piedra tallada*, mientras que en el *Neolítico* emplearon la *piedra pulida*. (Raquejo, 2007)

Diferentes clases de materiales se han usado en épocas modernas, unos de ellos son los llamados biomateriales, y su investigación ha sido uno de los retos de la ciencia de los materiales durante los últimos años. Según Clemson University Advisory Board for Biomaterials: un biomaterial es una sustancia sistemática y farmacológicamente inerte diseñada para ser implantada o incorporada dentro de sistemas vivos. La disponibilidad de estos no habría sido posible sin la unión de varias disciplinas para su estudio, tales como la Física, Química y Biología como ciencias básicas que han constituido disciplinas como la Bioingeniería, se han aportado adelantos tecnológicos dirigidos a solventar problemas en el área de la salud, enfocándose en aplicaciones biomédicas, como ejemplo podemos mencionar el uso de polímeros biodegradables como sistemas de aplicación temporal en el cuerpo humano. (Alberto *et al.*, 1999)

Un biomaterial mineral muy útil es la hidroxiapatita sintética [HAP,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ], la cual ha ganado importancia por su similaridad química con el mineral de fosfato de calcio natural presente en los tejidos biológicos duros. En base a este conocimiento numerosas aplicaciones de los componentes de fosfato de calcio se han desarrollado en campos de la biomédica, así como diversas técnicas de síntesis. (Thamaraiselvi T.V., 2006).

El presente trabajo consta de 3 capítulos, el primero se enfoca a los antecedentes, y objetivos de esta tesis, el siguiente capítulo describe las metodologías utilizadas para lograr los objetivos y el último capítulo describe los resultados y discusión de estos para finalmente llegar a las conclusiones de este proyecto.

# CAPÍTULO I

## 1.1 ANTECEDENTES

Con relación al tema de los biomateriales cabe destacar que según los demógrafos de Naciones Unidas, dentro de unos 5 años es muy probable que haya más personas de más de 60 años que niños de menos de 15. Hoy en día una de cada diez personas tiene 60 años o más, pero en el año 2050 se prevé que será una de cada cinco. Y se prevé también que el número de los que tienen unos 80 años se multiplicará por cinco. (Regí, 2004). De lo anterior se determina que las necesidades del ser humano serán mayores al llegar a una edad avanzada y ese es un motivo más para desarrollar tecnologías que hagan que la calidad de vida sea la mejor posible, pero también hay que tener en cuenta que se tiene que aprender a usar y reutilizar mejor los materiales porque de eso depende el éxito como sociedad.

La posibilidad de combinar propiedades bio-orgánicas y componentes inorgánicos en un solo material ha sido un antiguo reto que tuvo su origen con el comienzo de la era industrial. Algunos de los más antiguos, representativos y conocidos productos orgánico-inorgánicos derivados de la industria de los polímeros y las pinturas son ciertamente los pigmentos y rellenos inorgánicos dispersos en componentes orgánicos (solventes, surfactantes, polímeros...) para aumentar o mejorar las propiedades ópticas y mecánicas.(Sánchez *et al.*, 2003)

Entre las diferentes aplicaciones de los biomateriales, se encuentran las asociadas a la restauración de los tejidos duros del ser humano como resultado de diversas patologías y traumatologías, y una de las vías correctivas empleadas recurre a implantes con materiales sintéticos o semisintéticos que cumplan funciones de relleno, y que puedan dar origen a la reconstitución ósea. En la actualidad, se estudia la posibilidad de usar materiales inorgánicos similares a la matriz ósea.

Entre los materiales usados en la restauración ósea se encuentran diversas hidroxiapatitas, obtenidas por síntesis inorgánica, o por transformaciones de biomateriales naturales como la coralina (carbonato de calcio) que proviene de

formaciones de corales. La hidroxiapatita es un material altamente insoluble en medios biológicos normales, por lo que es común usar también precursores que se transforman en hidroxiapatita; de esta forma se facilita la integración del material implantado a través de transformaciones de fase y reacciones superficiales. (Palacios *et al.*, 2001)

## **1.2 MARCO TEÓRICO**

Para la elaboración de un biomaterial se pretende utilizar el principio de los moldes orgánicos, a fin de obtener un tipo de cerámica que pueda ser usada para sustituir a la producida en forma natural, controlando la morfología, orientación y crecimiento de cristales, que son características importantes para decidir si una cerámica reúne los requisitos adecuados para ser usada como material de implante, - dichos requisitos se describen posteriormente en la sección 1.3-. (Palmer *et al.*, 2008)

La integración de la biología dentro de la investigación en materiales está proyectada para brindar avances significativos en la microfabricación y microensamble de nuevos materiales y productos. (Mogul *et al.*, 2006). Un campo emergente en la nanotecnología es el uso de microorganismos y sus componentes, entre ellos virus, bacterias, ADN etc., como nanomoldes para fabricar materiales o dispositivos orgánicos-inorgánicos a nanoescala. (Liu *et al.*, 2005). El tema central de estos desarrollos ha sido la “bio-inspiración” en la cual los conceptos biológicos, funciones y diseño de caracteres han captado la atención por sus aplicaciones como puntos de inicio en el camino hacia nuevos materiales sintéticos y dispositivos con estructuras y funciones avanzadas. La remarcada habilidad de los organismos biológicos para reconocer, ordenar y procesar diversas y complejas fuentes de información continúa motivando novedosas formas de fabricación de superficies e interfaces orgánica-inorgánicas inteligentes. (Dujardin y Mann, 2002)

### **1.3 LOS BIOMATERIALES**

Existen materiales de origen biológico como huesos, madera, tejidos, etc. que se usan en implantes, de naturaleza diversa; pueden elaborarse con tejidos de los mismos pacientes (implantes autógenos o autoinjerto), con tejidos de algún donante humano (homoinjerto) o de otras especies (heteroinjerto), así como a partir de materiales hechos por el propio hombre (aloinjertos); que son los llamados biomateriales y pueden ser de origen sintético o natural (Morejón-A *et al.*, 1999).

Un biomaterial puede ser definido como un material usado para fabricar dispositivos para reemplazar una parte o función del cuerpo, de una forma segura, confiable, económica y fisiológicamente aceptable. Algunas personas se refieren a materiales de origen biológico como madera y hueso como biomateriales, pero en realidad esos son “materiales biológicos”. Una variedad de dispositivos y materiales son usados en tratamientos de enfermedades y heridas, ejemplos comunes de estos son hilos de sutura, rellenos dentales, agujas, catéteres, revestimientos óseos, etc. Un biomaterial, es un material sintético utilizado para reemplazar parte de un sistema vivo, o una función, el cual estará en íntimo contacto con tejido vivo. Por otra parte el Consejo Directivo sobre Biomateriales de la Universidad de Clemson ha formalmente definido un biomaterial como una “sustancia sistemática y farmacológicamente inerte diseñada para ser implantada o incorporada dentro de un sistema vivo”. En contraste un material biológico es un material tal como hueso, piel o una arteria, producida por un sistema biológico. Materiales artificiales como una prótesis auditiva, o una prótesis de alguna extremidad no se incluyen en la definición de biomaterial, pues aunque están en contacto con la piel, ésta a su vez actúa como barrera ante la prótesis.

En este aspecto tiene relevancia entender diferentes términos relacionados con los biomateriales, se ha hecho un gran esfuerzo para generar un consenso referente a la definición de biocompatibilidad entre los investigadores, en 1986 se llevó a cabo una reunión en la Sociedad Europea de Biomateriales, (European Society for Biomaterials) con la finalidad de llegar a un acuerdo, a continuación se nombran 2 de los más importantes puntos discutidos:

Respuesta del huésped: “es la reacción de un sistema vivo en presencia de un material.”

Biocompatibilidad: es la habilidad de un material para generar una apropiada respuesta del huésped en una situación específica.(Black, 2006)

Teniendo en cuenta los puntos anteriores se puede afirmar que las características que debe cumplir un biomaterial son:

1. Ser biocompatible.
2. No ser tóxico, no carcinógeno, no irritable, y no alergénico
3. Ser químicamente estable (no presentar degradación en el tiempo) e inerte.
4. Tener una resistencia mecánica adecuada.
5. Tener un tiempo de fatiga adecuado.
6. Tener densidad y peso adecuados.
7. Tener un diseño de ingeniería perfecto; esto es, el tamaño y la forma del implante deben ser los adecuados.
8. Ser relativamente barato, reproducible y fácil de fabricar y procesar para su producción en gran escala.(Black, 2006; Lavernia y Schoenung, 1991; Park y Lakes, 2007)

## **1.4 CLASIFICACIÓN DE LOS BIOMATERIALES**

Sobre la base de la duración y la forma del contacto que se establece con el organismo, los biomateriales suelen clasificarse como de uso temporal o permanente y de localización intra o extracorpórea. (Abraham *et al.*, 1998) Desde el punto de vista de su función se pueden distinguir entre ellos los dispositivos destinados al soporte, al diagnóstico o al tratamiento. Algunos biomateriales contienen drogas y son considerados medicamentos, otros pueden incluir células vivas y construir los llamados biomateriales híbridos. También hay biomateriales que incluyen compuestos capaces de responder a señales provenientes del medio biológico que reciben el nombre de materiales inteligentes. (Abraham *et al.*, 1998) Los biomateriales se pueden clasificar en: metales, polímeros, materiales cerámicos, compósitos y biomateriales naturales con base en su origen. (Lemons, 1986)

### **1.4.1 BIOMATERIALES CERÁMICOS**

Tienen aplicación en cirugía e incluyen óxidos de aluminio, hidroxiapatita, fosfatos tricálcicos, aluminatos de calcio, vidrios (bioglass) y carbón, los materiales cerámicos muestran buena biocompatibilidad pero tienen el inconveniente de ser materiales quebradizos. (Joon *et al.*, 1992)

Los cerámicos son materiales inorgánicos formados por elementos metálicos y no metálicos unidos principalmente por enlaces iónicos (electrostáticos) y uniones covalentes (electrones compartidos). Los cerámicos suelen tener gran estabilidad química frente al oxígeno, el agua, los medios ácidos, alcalinos y salinos, y los solventes orgánicos. Son muy resistentes al desgaste y generalmente se comportan como buenos aislantes térmicos y eléctricos. Todas estas propiedades son ventajosas para su aplicación como biomateriales.

Los materiales cerámicos han adquirido recientemente una gran importancia como candidatos para la fabricación de implantes. Los principales dentro de esta categoría son la alúmina (monocristal de óxido de aluminio), el carbón pirolítico, la hidroxiapatita (fosfato de calcio hidratado) y los vitrocerámicos basados en  $\text{SiO}_2$  -  $\text{CaO}$  -  $\text{Na}_2\text{O}$  -  $\text{P}_2\text{O}_5$

y algunos en MgO y K<sub>2</sub>O, (Si= Silicio, Ca= Calcio, Na= Sodio, P= Fósforo, Mg= Magnesio y K= Potasio). (Abraham *et al.*, 1998)

En materiales porosos para aplicaciones médicas, se desarrollan dos grandes líneas de biocerámicas, según su grado de actividad una vez implantadas son: las inertes y las bioactivas. Ambas pueden aplicarse como cerámicas, vidrios, vitrocerámicas o cementos, dependiendo de la función que vayan a realizar.

El esqueleto humano es muy complejo y cada hueso que lo forma tiene una misión específica. Por ello hay muchos tipos de implantes distintos, tanto en materiales de fabricación, diseño, forma externa, y tamaño. Así, las biocerámicas inertes son muy poco reactivas, por lo que tienen una influencia casi nula en los tejidos del organismo que rodean al implante. El organismo nunca va a confundir este material con un tejido vivo o con algo propio pero tampoco lo va a rechazar. Hay muchas cerámicas con esas características de baja reactividad y no toxicidad, como la Alúmina o la Zirconia. Una de las aplicaciones más usadas con este tipo de cerámicas es la fabricación de cabezas de fémur en las prótesis de cadera. (Regí, 2004) Los tipos densos de hidroxiapatita y fosfato tricálcico son relativamente inertes a la biodegradación mientras que los fosfatos tricálcicos porosos o estructuralmente modificados y los aluminatos de calcio pueden ser completamente biodegradables.

Sin embargo los fosfatos de calcio son quebradizos, tienen bajas resistencias al impacto y fuerzas de tensión. Por lo tanto como materiales individuales tienen limitaciones en reemplazos de tejido duro. Sin embargo, como material intermediario, de aumento y de implantes quísticos, donde las cargas mecánicas no son excesivas, sus usos potenciales como implantes de huesos son prácticamente ilimitados.

Los fosfatos porosos se han investigado como sustitutos óseos, con esperanza de que puedan servir como plataformas para reparar los huesos y después sean absorbidos. En odontología se han empleado cerámicas de fosfato de calcio para reparar defectos periodontales, raíces y aumentar crestas alveolares reducidas.(Barba, 1987). En la práctica quirúrgica utilizan bloques de hidroxiapatita porosa en cirugías de nariz y garganta. La forma densa de hidroxiapatita se ha usado para reemplazar los huesecillos del oído.

El principal interés en cerámicas para fijación biológica, no se ha ampliado a extensas pruebas clínicas, en parte por sus moderadas fuerzas de fatiga encontradas in-vivo.

El bioglass es una cerámica constituida por  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{O}$ ,  $\text{CaO}$ ,  $\text{P}_2\text{O}_5$  y algunas veces  $\text{CaF}_2$  ó  $\text{B}_2\text{O}_3$  en varias proporciones. Se han empleado algunas veces como capas superficiales en aleaciones y otras cerámicas como la alúmina. Dichas superficies reactivas han sido diseñadas para establecer unión con las superficies de hueso.

El grafito, el carbón vítreo y los compuestos de carbón-silicio se han utilizado para varios tipos de dispositivos para implantes quirúrgicos. Las aplicaciones más amplias han sido las de compuestos carbón-silicio para válvulas de corazón. En general los biomateriales de carbón poseen un módulo de elasticidad similar al del hueso compacto, y pueden tener fuerza y resistencia altas, pero son sustancias quebradizas. Las características de biocompatibilidad de dichos materiales han sido excelentes, a menudo proporcionan un estándar para las comparaciones con otras sustancias nuevas a prueba. (Lemons, 1986)

#### **1.4.2 BIOMATERIALES NATURALES**

Debido a su carácter "natural" los polímeros naturales son los más compatibles, y por lo mismo las reacciones de toxicidad son más reducidas, tienen la garantía de que serán degradados y metabolizados por el organismo, gracias a las enzimas naturales. (Alberto *et al.*, 1999) En esta área la fabricación de válvulas de corazón, colágeno, e hialuronato de sodio y tienen aplicaciones en reemplazo de tejidos suaves, injertos vasculares, ligamentos tendones etc.(Joon *et al.*, 1992) Dentro de los principales o más comunes destacan:

##### **1.4.2.1 COLÁGENO Y SUS DERIVADOS:**

El término colágeno no designa una especie molecular única, sino que engloba una familia de moléculas sintetizadas por los fibroplastos a partir de un precursor, el

Procolágeno. Estas macromoléculas poseen características estructurales comunes entre sí. (Borsntein y Sage, 1980)

El Colágeno juega un papel muy importante en la estructura de ciertos órganos como la piel, tendones, cartílagos, en las interacciones célula matriz durante el desarrollo de patologías (poliartritis, fibrosis hepática, etc). (Baldrich, 1983) Es muy utilizado en el área de suturas absorbibles, aunque se han conseguido mejores sistemas estos son muy populares aun por su bajo costo, se obtienen de la mucosa intestinal de los bovinos y en su forma natural es absorbido por el ser humano en 14 días aproximadamente.(Alberto *et al.*, 1999) se puede observar una muestra de colágeno utilizado para implantes en la **figura 1-1**.



**Figura 1-1** Implante meniscal de colágeno.

#### **1.4.2.2 CELULOSA:**

Es el más abundante de todos los materiales orgánicos, forma parte de los tejidos fibrosos de las plantas. Además está presente en vegetales y otros alimentos, la Celulosa es soluble al agua, su solubilidad aumenta mediante tratamiento con álcalis que hincha la estructura, seguida por la reacción con ácido tricloro acético, cloruro de metilo u Óxido de Propileno produciendo la carboxi-metil-celulosa, hidroxipropil-celulosa, hidroxipropilmetil-celulosa. (Reyes-Cervantes, 2006) Son estructuras de polisacáridos también empleadas en el área de las suturas bioestables, son el principal componente del algodón. Se están realizando estudios de oxidación para emplearlo como biodegradable.(Alberto *et al.*, 1999)

### **1.4.2.3 QUITINA Y QUITOSAN:**

La Quitina es un polisacárido, permite la formación de fibras y películas biodegradables, su estructura molecular es muy similar a la de la celulosa y posee excelentes propiedades mecánicas. Se encuentra en los organismos vivos en forma de fibrillas y el Quitosan se puede obtener de la Quitina a su vez. (Alberto *et al.*, 1999) El Quitosan es un producido comercialmente de la Quitina, obtenida por los desechos de mariscos y es biodegradable.

Las películas de Quitosan son claras, fuertes y flexibles además de ser una buena barrera al oxígeno y se forma por modelo de solución acuosa. Las películas de éste protegen los alimentos de la degradación por hongos y modifican la atmósfera de frutos frescos. (Reyes-Cervantes, 2006)

### **1.4.2.4 PROTEGLUCANOS Y GLUCOSAMINOGLUCANOS:**

Condroitín Sulfato, se extrae actualmente del cartílago de pescados. Una reciente novedad de los proveedores cosméticos es la obtención de aceites de pescado ricos en ácidos grasos polinsaturados de la serie omega-3, como el Ácido Eicosapentanoico (EPA) y el Ácido Docosahexanoico (DHA) para aplicación tópica. (ALCALDE-PÉREZ, 2004)

También, son empleados experimentalmente en funciones ortopédicas en humanos, principalmente en articulaciones. Son polisacáridos unidos lateralmente por cadenas proteicas. La molécula ramificada se conoce como Poliglucano. La alta viscosidad de este polímero permite la formación de geles, los cuales han sido muy empleados en el área de oftalmología facilitando la cirugía de cataratas y desprendimiento de retinas. (Reyes-Cervantes, 2006)

### 1.4.3 MATERIALES COMPÓSITOS.

Un compuesto es una combinación tridimensional de por lo menos dos materiales químicamente distintos, con una interfaz distinta separando los componentes, creados para obtener características específicas, que no se pueden alcanzar por uno solo de los componentes, siendo generalmente de origen artificial.

En la combinación de dos materiales uno de los materiales es llamado la fase que refuerza, y puede estar en forma de fibras, hojuelas, o de partículas, y se encajan en otro material llamado fase de la matriz. Como se muestra en la **figura 1-2**

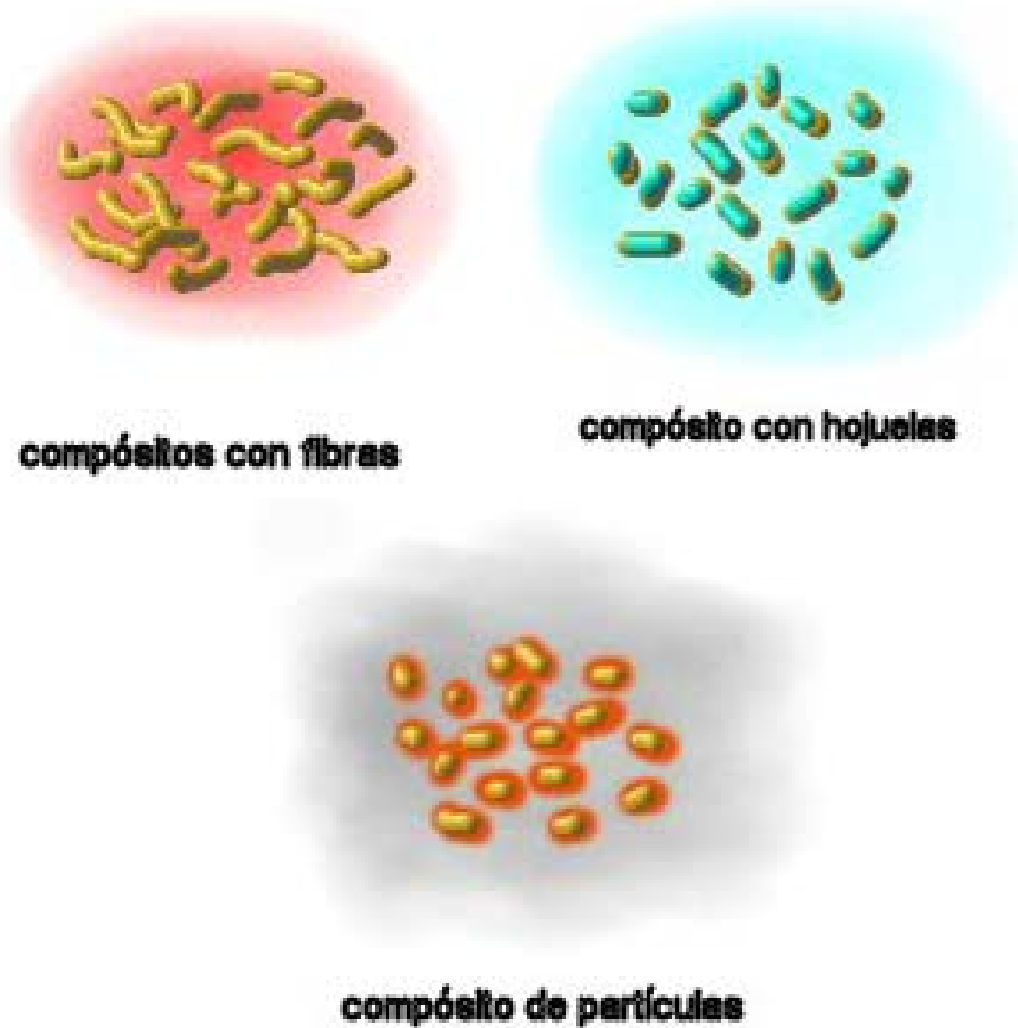


Figura 1-2 materiales compósitos

El material de la matriz y el material que refuerza pueden ser metal, cerámica, o polímero. Típicamente el material reforzante será fuerte con bajas densidades mientras que la matriz es dúctil o resistente. Si el compuesto se diseña y se fabrica correctamente, combina las propiedades del refuerzo con la dureza de la matriz para alcanzar las características deseables no disponibles en cualquier material convencional. (Rios-Hernández *et al.*, 2001; Schaffer *et al.*, 1999)

En los últimos años, los materiales compósitos han incluido combinaciones de partículas de HAp bioactiva con polímeros orgánicos, tales como HAp/PMMA (polimetilmetacrilato), HAp /PLA (ácido poliláctico). (Wang *et al.*, 2002)

## **1.5 FOSFATOS DE CALCIO**

Los fosfatos son el producto de la sustitución de parte o todo el hidrógeno del ácido fosfórico por metales. Según el número de átomos de hidrógeno sustituidos, el compuesto obtenido se define como fosfato primario, secundario o terciario. Así,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , con un átomo de hidrógeno sustituido, se denomina fosfato primario de sodio (también dihidrogenofosfato de sodio), y  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , con tres átomos de hidrógeno sustituidos, fosfato terciario de sodio. También conocido como fosfato de sodio. Los fosfatos primarios y secundarios contienen hidrógeno y son sales ácidas. Los fosfatos secundarios y terciarios son insolubles en agua, a excepción de los de sodio, potasio y amonio; los primarios son más solubles.

Los fosfatos son importantes para el metabolismo de animales y plantas. Los huesos contienen fosfato de calcio,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , y el primer paso en la oxidación de la glucosa en el cuerpo es la formación de un éster de fosfato. Para aportar fosfatos al ganado, se usa el hidrogenofosfato de calcio hidratado,  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , como suplemento alimenticio. El fosfato primario de calcio,  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ , se emplea como ingrediente en fertilizantes para plantas.

Los Fosfatos de Calcio están ampliamente dispersos en el ambiente, y ocurre que son constituyentes en todas las clases de rocas; las apatitas también se encuentran

naturalmente en pegmatitas y otras venas de origen hidrotérmico.(Brown, 1973 ; Yaffee y Bulkley, 1973)

Las fases de los fosfatos, presentes en la naturaleza forman rápidamente escenarios de reacciones de precipitación como consecuencia de la supersaturación, pH, y temperatura.(Nancollas y Tomazzie, 1974) Hay seis sales de calcio, del ácido ortofosfórico que son de interés biológico. Se pueden obtener por precipitación de solución acuosa a presión normal, por tratamiento térmico ó reacción. En la tabla 1-1, se muestran algunos compuestos de fosfato de calcio de interés biológico. (Naka y Chujo, 2001)

**Tabla 1-1 Fosfatos de Calcio de interés biológico**

Nombre mineral	Nombre químico	Abreviatura	Fórmula química	Razón atómica Ca/P	Solubilidad del producto
Brushita	Fosfato dicálcico Dihidratado	DCPD	$\text{Ca}(\text{HPO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.0	$1.87 \times 10^{-7}$
Monetita	Fosfato dicálcico	DCPA	$\text{Ca}(\text{HPO}_4)$	1.00	$1.26 \times 10^{-7}$
Whitlockita	Fosfato octacálcico	OCP	$\text{Ca}_8\text{H}(\text{PO}_4)_6 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$	1.33	$5.01 \times 10^{-30}$
	Fosfato $\beta$ tricálcico	TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.5	$2.83 \times 10^{-30}$
Hidroxiapatita	Hidroxiapatita	HA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1.67	$5.5 \times 10^{-118}$
Hillinstockita	Fosfato tricálcico monóxido	TCPM	$\text{Ca}_3\text{P}_2\text{O}_7$	2	

El mayor interés en la Hidroxiapatita viene del hecho de que desde el punto de vista químico, son muy cercanos a la parte mineral de los tejidos calcificados (huesos y dientes) pero difieren de ellos en la composición, estequiometría, y propiedades físicas y mecánicas. Las apatitas biológicas son usualmente deficientes en calcio como resultado de varias sustituciones en puntos regulares de la red de la hidroxiapatita. (Ascencio-Gutierrez *et al.*, 2002)

La Hidroxiapatita es un excelente material biocerámico pero no sirve para hacer una prótesis pues su condición de cerámica la hace muy quebradiza y podría ocasionar una fractura en la zona del implante y por lo que usualmente se utiliza como recubrimiento o relleno y también se puede ocupar para ayudar a sanar de forma acelerada la zona afectada porque ayuda a producir el propio tejido óseo en poco tiempo.

## 1.6 HIDROXIAPATITA DE CALCIO

La síntesis y caracterización de materiales biocompatibles que se usan en medicina han adquirido mucha importancia debido a sus características físicas, químicas y biológicas entre ellos la Hidroxiapatita ha destacado desde que se sabe que es un componente natural en varios tejidos humanos y de animales. De hecho, en los humanos, 69% del peso del tejido óseo es Hidroxiapatita, así como lo es en el 75% de la dentina y 95% del esmalte dental. (Rodríguez-Lugo *et al.*, 2001)

Es a partir de los años 70's cuando se comenzó a investigar el uso de la Hidroxiapatita como un material osteoinductor, es decir, un biomaterial que induce la formación de hueso nuevo. (LeGeros y Zapanta, 2002)

Los huesos que forman el esqueleto humano están formados por dos componentes fundamentales: la componente orgánica que está integrada por fibras de colágeno en su mayor parte y la componente inorgánica compuesta de hidroxiapatita que comprende aproximadamente el 70% en peso del hueso y es de la que depende la dureza y la rigidez del hueso (Hernández *et al.*) Véase **tabla 1-2**.

**Tabla 1-2. Composición del hueso**

COMPONENTE	PORCENTAJE
Mineral	70
Orgánica de la cual el colágeno es el 90 ó 96% y otros el 4 ó 10%	22
Agua	8

Las células óseas están vivas y secretan una matriz ósea en toda la vida del organismo, ésta matriz tiene fosfatos de calcio (el mineral llamado Hidroxiapatita) y proteínas, principalmente colágeno. (Villem, 1997)

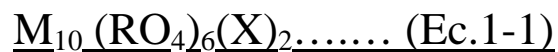
Este material recibe atención concerniente a la biomineralización porque es el principal componente de los huesos y dientes de los animales vertebrados. Cabe mencionar que es el colágeno quien le proporciona fuerza al hueso. El colágeno

recibe especial atención debido a los diferentes mecanismos que han impactado los procesos de síntesis los cuales definen las características del producto final así como la morfología, tamaño de la partícula, composición química homogénea y estructura cristalina. Es importante mencionar que la síntesis de HAp ha generado un creciente interés en el área de las biocerámicas desde que se pudo usar como un adsorbente para biomateriales y como un intercambiador iónico, sensor químico, y en catálisis. Sin embargo, las propiedades fisicoquímicas de este componente dependen estrechamente de la estequiometría del cristal y del estado de la superficie. Por ejemplo, la Hidroxiapatita biogénica esta a menudo asociada con una variedad de constituyentes en trazas tales como  $Mg^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $CO_3^{2-}$ ,  $Cl^-$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $F^-$  y  $P_2O_4^{4-}$ . Por lo tanto, estos materiales son estructuralmente y composicionalmente complejos.

La presencia de iones externos puede jugar un importante rol en la determinación en el proceso de nucleación, crecimiento de cristales, morfología, agregación, intercambio de iones, adsorción y disolución de las propiedades biológicas y sintéticas de la HAp. Los iones inorgánicos han mostrado que producen efectos morfológicos. Estos efectos no son sorpresa, ya que la morfología de la HAp puede ser significativamente diferente en los tejidos biológicos tales como el hueso y el esmalte debido a que este último posee una forma de prisma hexagonal. Es más, muchas de las propiedades de la HAp sintética pueden estar influenciadas por el tamaño del cristal, la forma y superficie del área. (Reyes-Cervantes, 2006)

### **1.6.1 ESTRUCTURA DE LA HIDROXIAPATITA DE CALCIO**

Las apatitas son fosfatos metálicos y la fórmula general es:



**En donde:**

**M:** Ca, Sr, Pb, Mn, Zn, Mg, Fe, Cd, etc.

**R:** p, AS, v, S, si, etc.

**X:** OH, F, Cl, Br, etc.

La más típica es la Hidroxiapatita de Calcio,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , conocida también como HAp. (Abraham *et al.*, 1998)

La hidroxiapatita tiene una razón molar Ca/P de 1.67, su densidad teórica es 3.156 g/cm<sup>3</sup>, cristaliza en el sistema hexagonal (excepcionalmente en el sistema monoclinico) (Kay *et al.*, 1964) con un grupo espacial P6<sub>3</sub>/m. Los datos cristalográficos de la HAp se resumen en la **tabla 1-3** y la estructura el cristal se muestra en la **figura 1-3**

**Tabla 1-3. Datos Cristalográficos de la HAp**

Sistema cristalino	Hexagonal
Grupo espacial	P6 <sub>3</sub> /m
Constantes de la red	$a = 0.9432 \text{ nm}, c = 0.6881 \text{ nm}$
Número de unidades qu	$Z = 1$
Peso molecular	$M = 1004.8$

Hay dos tipos de iones de Calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ):  $\text{Ca}_I$  se alinean a lo largo del eje “c” como indican las flechas, en tanto que el  $\text{Ca}_{II}$  circunda el  $\text{OH}^-$ , por lo cual  $\text{Ca}_I$  es más fácil de disolverlo en solución acuosa que el  $\text{Ca}_{II}$ . (Suzuki *et al.*, 1981)

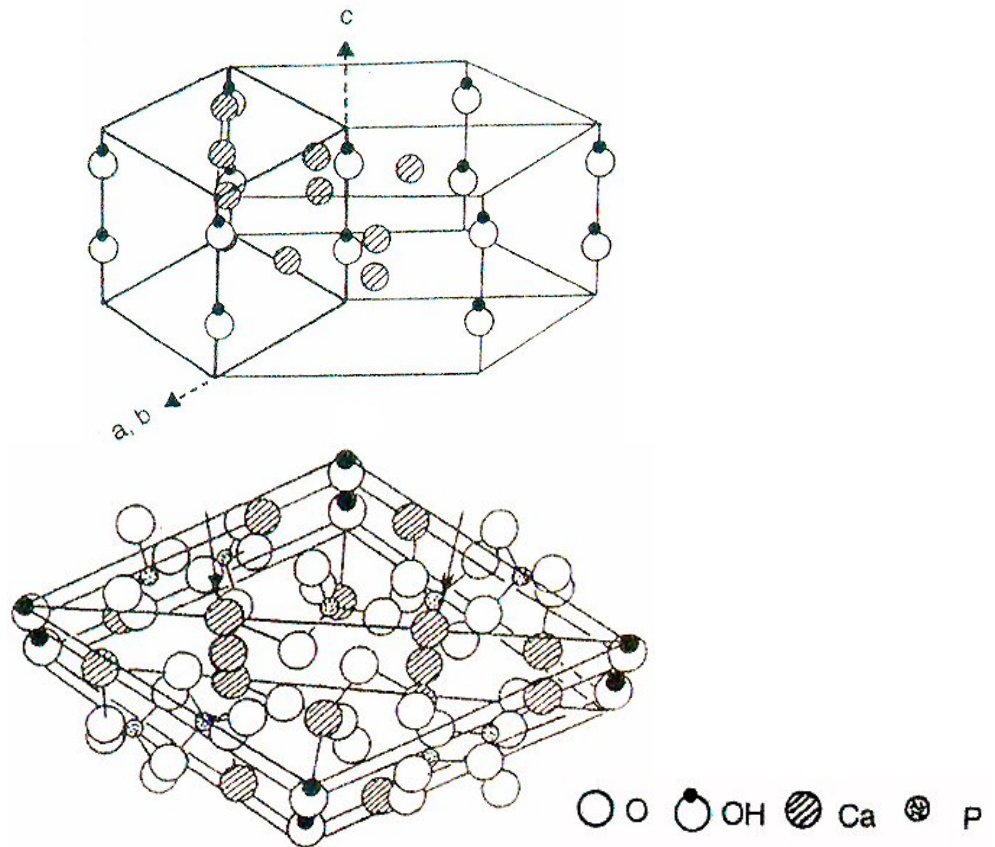


Figura 1-3 Estructuras de los cristales de HAp

### 1.6.2 USOS Y APLICACIONES DE LA HAp

Algunas posibles aplicaciones que puede tener la HAp como material de implante son:

1. Preservación del reborde alveolar.
2. Fracturas mandibulares.
3. Reconstrucción de huesos faciales.
4. Prótesis ortopédicas. Cuando se ha extraído un tumor óseo o existe una fractura de un hueso el defecto se rellena con HA, o bien para recubrir prótesis metálicas.
5. Artrodesis: fijación de una articulación por medio de cirugía, por ejemplo, la rodilla, dos vértebras, el codo, etc.
6. Implantes dentales.
7. En la otorrinolaringología para construir prótesis de oído medio.(Hernández *et al.*)

## **1.7 MÉTODOS DE SÍNTESIS DE HIDROXIAPATITA**

La primera síntesis de hidroxiapatita fue realizada por Daubré en 1851, quien obtuvo Hidroxiapatita al hacer pasar Tricloruro de Fósforo sobre cal al rojo vivo. Desde entonces un número importante de métodos de preparación han sido reportados. (Daubrée, 1851)

### **1.7.1 PROCEDIMIENTOS DE SOLUCIÓN**

Soluciones de varias fuentes de fosfato y calcio son empleadas normalmente durante la precipitación y así se producen los cristales de HAp. El método es muy simple y requiere equipo barato. Sin embargo, el control del tamaño del cristal es un problema y la presencia de fases meta-estables en el producto final de la reacción es tal vez la principal desventaja. En general, los métodos de solución están entre los más importantes métodos para la producción de HAp como biomaterial en escala industrial o semi-industrial. (Fang y Agrawal, 1992)

### **1.7.2 MÉTODOS EN ESTADO SÓLIDO**

Estos métodos tienen la conveniencia de poder evitar fases de fosfato de calcio indeseables y producir HAp de buena calidad con materias primas baratas.

La principal desventaja en este caso es la energía de consumo que se involucra en el proceso. La posibilidad de producir compósitos por reacciones *in-situ* también muestra un gran e interesante potencial en el área de los biomateriales. (Rodríguez-Lugo *et al.*, 2003)

Este método puede producir partículas de hidroxiapatita estequiométrica y tomar la forma de las partículas del precursor de fosfato. Este proceso generalmente se ha usado para el procesamiento de polvos cerámicos y para el estudiar la estabilidad de las fases. Los polvos preparados por este método, sin embargo, tienen formas irregulares y un tamaño de grano grande y exhiben heterogeneidad en su composición debido a una reacción incompleta resultado de pequeños coeficientes de difusión de iones dentro de los sólidos. (Rodríguez-Lugo *et al.*, 2003)

### **1.7.3 SISTEMA HIDROTHERMAL**

Este método proporciona polvos bien cristalizados, uniformes y homogéneos, pero tiene el inconveniente de que las reacciones se llevan a cabo en soluciones acuosas en condiciones de alta temperatura y alta presión ( $>100^{\circ}\text{C}$ ,  $>1\text{ atm}$ ), en sistemas cerrados (Rodríguez-Lugo *et al.*, 2003)

Estos procesos se han empleado para producir cerámicas y materiales industriales y otros que son componentes biocompatibles debido a su fabricación en base a fosfatos. En un sistema hidrotermal hay muy pocas variables por lo que se obtiene como resultado la producción única de partículas relativamente largas lo cual puede considerarse una desventaja. Sin embargo, la tecnología actual permite el control preciso de los parámetros termodinámicos involucrados en donde se ha reportado la posibilidad de producir fosfatos de calcio de tamaño Nanométrico. (Lavernia y Schoenung, 1991; Yoshimura y Suda, 1994)

Las soluciones acuosas bajo condiciones hidrotermales tienen un importante papel en la aparición y formación de muchos minerales en la naturaleza. Las soluciones acuosas que se encuentran bajo condiciones de alta temperatura y presión son fluidos supercríticos por encima del punto crítico ( $T_c = 374.2^{\circ}\text{C}$ ,  $P_c = 22.1\text{ MPa}$ ,  $\rho_c = 0.32\text{ g/cm}^3$  para agua pura) y tienen acción directa sobre la formación de minerales al reaccionar con sólidos para formar otros productos sólidos tales como hidratos, óxidos, etc.

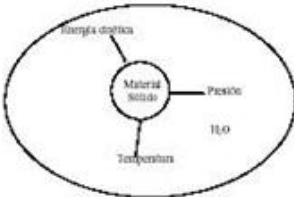
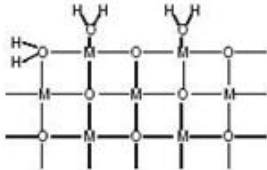
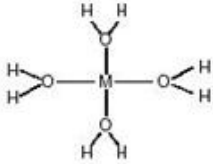
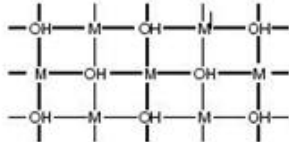
Es importante hacer notar que los polvos hidrotermales obtenidos generalmente presentan una microestructura, morfología y composición de fase bien definidas, variando parámetros tales como la temperatura, presión, duración del proceso, concentración química de las especies, concentración de un soluto, y pH de la solución. Las ventajas importantes de la síntesis hidrotermal son: un solo paso para la producción, versatilidad, y bajo costo.

Este método es amigable con el ambiente porque ocurre en un sistema cerrado con temperaturas relativamente bajas, eso lo hace menos caro porque la reacción

requiere menos cantidad de energía lo que a diferencia de tecnologías que ocupan altas temperaturas, permite controlar la estequiometría. (Rodríguez-Lugo *et al.*, 2005)

Las reacciones hidrotermales se clasifican en cuatro clases que corresponden al grado de interacción física y química entre los precursores, ver **tabla 1-4**.

**Tabla 1-4 Reacciones hidrotermales en materiales sólidos**

	Clasificación	Esquema
1	<p>Medio de transferencia. El fluido hidrotermal transfiere físicamente calor, presión y energía mecánica al material sólido.</p>	
2	<p>Adsorbente. El fluido hidrotermal ó uno de sus componentes es adsorbido y/o desorbido sobre la superficie del sólido acelerando la difusión y la reacción en la superficie.  M=(material sólido), H=(hidrógeno), O=(oxígeno).</p>	
3	<p>Disolvente. El fluido hidrotermal puede disolver uno ó más de los materiales sólidos para formar agregados moleculares, y/o especies iónicas incluyendo complejos, los cuales pueden transportar los componentes a grandes distancias. Esta acción provoca el rearrreglo de las especies iónicas a través de la disolución y precipitación. M=(material sólido), H=(hidrógeno), O=(oxígeno).</p>	
4	<p>Reactante. Los fluidos hidrotermales pueden reaccionar con sólidos para formar otros productos sólidos tales como hidratos, hidróxidos.  M=(material sólido), H=(hidrógeno), O=(oxígeno).</p>	

### **1.7.4 MÉTODOS A BAJA TEMPERATURA**

Ha sido reportado que los métodos de baja temperatura -parecidas a las del cuerpo humano- son buenos, y en fluidos simulados del cuerpo, colocados sobre un gel inorgánico –Sílice - se ha logrado la producción de partículas de Fosfato de Calcio –incluida la HAp- esta ruta abre maravillosas posibilidades para descubrir cómo se producen los materiales cerámicos que están en la naturaleza a temperatura ambiente. (Rivera *et al.*, 1997)

### **1.7.5 MÉTODO SOL GEL**

Esta técnica ha recibido relativamente poca atención. Se ha publicado que se han usando sales de Calcio, Esteres y Ácido Fosfórico, sin embargo la HAp es obtenida solo a temperaturas mayores a los 500 °C. Se necesita más énfasis en esta área.(Bres y Hardouin, 1998)

Las ventajas del método sol-gel son las siguientes: baja temperatura del proceso comparada con otros métodos de síntesis de cerámicas, obtención de productos de reacción homogéneos y obtención de producto altamente puro.

El método sol-gel es el resultado de la transformación física y química de un estado de sol a gel, de ahí el nombre de método, entendiéndose como “sol” a la dispersión de partículas coloidales en un líquido. Los coloides son partículas sólidas con diámetros entre 1-100 nm., que forman una red interconectada y rígida ó cadenas poliméricas, estas pueden formar cavidades con dimensiones en micrómetros. El término “gel” abarca una diversidad de combinaciones, y se han clasificado según la distribución y forma.

En el método sol-gel destacan tres formas de prepararse que son:

- a) Gelar una solución de polvos coloidales.
- b) Hidrólisis y policondensación de alcóxidos o nitratos como precursores con un secado hiper crítico del gel.

c) Hidrólisis y policondensación con precursores de tipo alcóxido con un envejecimiento y secado bajo un ambiente atmosférico.

Los alcóxidos pertenecen a la familia de compuestos metal-orgánicos, su fórmula general es  $M(OR)_x$ , donde M es un metal o metaloide, OR es un grupo alcoxi y X el grado de valencia del metal. (Saenz *et al.*, 2003)

La química del método sol-gel puede generar monolitos bajo presiones ambientales y obtener compuestos densos o con porosidades controladas, químicamente estables. Los procesos subsecuentes tales como envejecimiento, secado, estabilización química y densificación dependen de la estructura del gel.

### 1.7.6 PRECIPITACIÓN HOMOGÉNEA

Es ampliamente usada para la síntesis de partículas puras y con control en su morfología. La Urea es empleada como agente de precipitación homogénea para la síntesis de HAp (Moortier *et al.*, 1989)

La Urea agregada a soluciones que contienen  $Ca^{2+}$  Y  $PO_4^{3-}$  descompone el rendimiento de  $CO_2$  y  $NH_4^+$  en calor e incrementa el pH, encabezando la producción de Fosfato de Octacalcio,  $Ca_8H_2(PO_4)_6 \cdot 5H_2O$  (OCP), o Fosfato Dicálcico,  $CaHPO_4$  (DCP), los cuales finalmente se transforman en HAp. Sin embargo, la HAp preparada con Urea contiene una apreciable cantidad de  $CO_3^{2-}$ , porque el  $CO_2$  envuelto con Urea es disuelto como  $CO_3^{2-}$  en la solución y es fácilmente incorporado a la HAp.

En orden de sintetizar HAp libre de  $CO_3^{2-}$  puede ser por otro agente. Las Amidas son viables para este propósito. Yasukawa sintetizó HAp usando Formamida y Acetamida como agente de precipitación en lugar de la Urea.

La Formamida es hidrolizada elevando la temperatura como se muestra en la ec. 1-2:

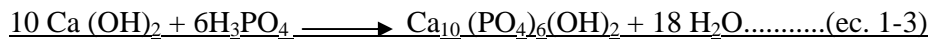


La  $NH_3$  resultante incrementa el pH tan bien como la Urea.

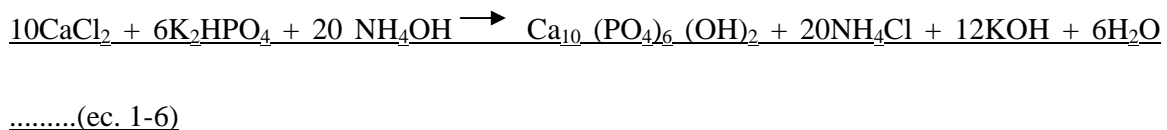
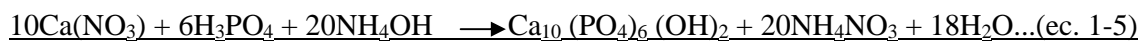
### 1.7.7 MÉTODO QUÍMICO HÚMEDO

El método húmedo puede ser usado para la producción en masa de hidroxiapatita cristalina ó de polvos nanocristalinos de fosfato de calcio. Típicamente hay dos tipos de proceso en el método húmedo. Las reacciones químicas se muestran abajo en las ecuaciones: ec.1-3 ~ 1-6 (Reyes-Cervantes, 2006)

#### a) Reacción neutral de soluciones alcalinas y ácidas



#### b) Reacción de sales de calcio y fosfato



Este proceso se basa en la precipitación a baja temperatura y se realiza en soluciones acuosas, muchos experimentos sobre la preparación de hidroxiapatita se han realizado para investigar los mecanismos de formación de fosfatos de calcio *in Vitro* e *in vivo*. Sin embargo, los polvos preparados por este método, proporcionan polvos de HA con pobre cristalización, los cristales obtenidos son de forma irregular, no homogéneos y no son apropiados para usarse como biocerámicas.

### 1.7.8 CONTROL DE NUCLEACIÓN Y CRECIMIENTO DE CRISTALES DE HIDROXIAPATITA SOBRE SOPORTES ORGÁNICOS.

En la actualidad, la construcción de materiales híbridos orgánicos-inorgánicos con mineralización controlada similar a la que se produce en la naturaleza, es de gran interés para los químicos orgánicos e inorgánicos con el fin de comprender los mecanismos del proceso natural de biomineralización y buscar aplicaciones industriales y tecnológicas.

Para la nucleación de materiales inorgánicos orientados se usan monocapas comprimidas en la interfase aire-agua y monocapas auto ensambladas sobre una superficie sólida. Con este proceso se pueden obtener cerámicas sintéticas controlando la morfología, tamaño, orientación y crecimiento de los cristales, que son características importantes para decidir si una cerámica reúne los requisitos adecuados para ser usada como material de implante. (VARELA-CASELIS, 2005)

### **1.7.9 REACCIÓN DE HIDRÓLISIS**

Las partículas de HAp pueden ser preparadas por conversión de un poco de fosfato de Calcio, como es el  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y  $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , en medio acuoso por debajo de  $100^\circ\text{C}$ . La característica de este método es que se obtienen partículas que conservan la forma del precursor.

El  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  es transformado a HAp por hidrólisis a 8 pH y  $40^\circ\text{C}$  por 3 hrs. La forma no estequiométrica de HAp (Ca/P= 1.50) es transformada a estequiométrica (Ca/P= 1.67) antes de adicionar el tratamiento a  $40^\circ\text{C}$  y a pH > 9 por 3 hrs. Por otra parte la hidrólisis de  $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , a pH de 5-10 Y A  $80^\circ\text{C}$  por 2 hrs. Da HAp con rango Ca/P de 1.50 a 1.67, dependiendo de la solución de pH. (Young y Holcomb, 1982)

### **1.7.10 MÉTODO DE ESPRAY PIRÓLISIS**

Las partículas esféricas de HAp son sintetizadas por spray pirólisis. Las partículas esféricas son adecuadas para un alto rendimiento en cromatografía líquida (HPLC). La solución atomizada disuelve  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  y  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  evaporándolos dentro de un horno, para ser descompuestos a  $600^\circ\text{C}$ . Las partículas formadas de HAp son aglomeradas huecos con fina partículas. (Moortier *et al.*, 1989)

Otros métodos utilizados para obtener HAp incluyen la **deposición química**, **electro deposición**, **método de gel de agar**, **micro emersión** etc. (Ishikawa, 2000) Pero un problema común con estos métodos es la dificultad para obtener partículas

homogéneas en tamaño, en ambos casos como estructura y composición de la HAp depende mucho de las condiciones de reacción.

Así que es típico tener baja cristalinidad y la presencia de otras fases de Fosfato de Calcio no es extraña. Además, la mayoría de estos métodos requieren altas temperaturas o largos tiempos de reacción. (Ducheyne *et al.*, 1990)

#### 1.7.11 **MÉTODO BIOMIMÉTICO**

Uno de los procesos más fascinantes de la naturaleza es la formación de tejido óseo, el cual está compuesto básicamente por una fase orgánica y una fase inorgánica, ésta última está constituida de fosfatos de calcio casi en su totalidad siendo su fase principal la Hidroxiapatita (HAp). El proceso de mineralización del tejido óseo es muy complejo y en gran parte sigue siendo desconocido.

Se han obtenido resultados interesantes en estudios recientes sobre procesos de biomineralización los cuales indican que la cristalización de HAp puede ser regulada a nivel molecular por una matriz orgánica preorganizada que determina la nucleación, crecimiento y morfología final de las especies inorgánicas.

Este proceso de reconocimiento molecular se lleva a cabo en la interfase entre los grupos funcionales de la macromolécula orgánica y los iones en la superficie de un núcleo cristalino.

Se ha postulado que los aspectos de reconocimiento en la interfase orgánico-inorgánico son de carácter electrostático, estructurales, polares, y de topografía local entre otros.

El Método Biomimético lo que persigue es copiar o simular un proceso biológico de la naturaleza o de un organismo de modo que se puedan controlar características de nucleación, crecimiento, morfología, cristalización, desarrollo o cualquier otra característica pero en condiciones de laboratorio.

El conocimiento de estos mecanismos abre la posibilidad de diseñar materiales compuestos orgánicos-inorgánicos con propiedades físicas y químicas deseadas, lo

cual es de gran atractivo para la síntesis de materiales con propiedades específicas, sobre todo en el área de biomateriales.

Se han utilizado diferentes tipos de soporte sobre los cuales se ha crecido HAp sobre su superficie a partir de soluciones sobresaturadas de fosfato de calcio; estos incluyen sílice precipitada, sílice precipitada sintetizada utilizando diferentes tipos de aditivos; sobre polímeros y sobre polímeros modificados a nivel superficial con grupos carbonilo, y con grupos fosfatos entre otros; en todos los casos anteriores se observa una diferencia en la cinética de crecimiento.

Se ha demostrado que la interacción molecular específica entre interfaces orgánica-inorgánica puede resultar en el control de nucleación y el crecimiento de cristales inorgánicos el cual es factor clave para la preparación de materiales biomineralizados y biomiméticos.

La fase cristalina, hábito, morfología y distribución del tamaño de los biominerales puede ser muy diferente a aquellos que ocurrirían en una precipitación espontánea de iones en una solución supersaturada.

El reconocimiento de la interfase orgánica-inorgánica ha sido explicado como una acumulación electrostática, con correspondencia estructural, con requerimientos estereoquímicos, polaridad y polaridad local. Estas conclusiones han promovido en crecimiento de fosfato de calcio sobre matrices apropiadas con miras a diseñar nuevos materiales basados en componentes híbridos (orgánicos-inorgánicos.)

La composición química de los fosfatos de calcio precipitados depende decisivamente de las especies en la concentración, así como del pH de la solución y temperatura; las condiciones para la precipitación de Hidroxiapatita son críticas, pues una pequeña variación puede ocasionar la precipitación de otro fosfato distinto a la HAp. (RECILLAS *et al.*, 2004)

## 1.8 **Bacillus thuringiensis**

*Bacillus thuringiensis* es una bacteria Gram-positiva, aerobia estricta, morfológicamente relacionada con *Bacillus cereus* y *Bacillus anthracis*.

Estas tres especies bacterianas, durante su ciclo de vida, presentan dos fases principales, la fase de crecimiento vegetativo en donde las bacterias se duplican por bipartición cada 30-90 min dependiendo del medio de cultivo y la fase de esporulación, la cual es un programa de diferenciación de bacteria a espora. El programa de diferenciación consta de siete estadios, éste se dispara cuando la bacteria se encuentra en limitación de nutrientes. La espora es una forma de vida latente que puede permanecer en el ambiente por periodos de tiempo muy largos (años) en ausencia de humedad y nutrientes. Cuando la espora se encuentra de nuevo en un medio rico que contenga los nutrientes necesarios puede germinar para comenzar de nuevo el crecimiento vegetativo.

*Bacillus thuringiensis* es considerada una bacteria ubicua ya que se ha aislado de todas partes del mundo y de muy diversos sistemas como suelo, agua, hojas de plantas, insectos muertos, telarañas, etc. A *Bacillus thuringiensis* se le diferencia de *B. cereus* y *B. anthracis* por contener un cuerpo paraesporal conocido como cristal, el cual es de naturaleza protéica y tiene propiedades insecticidas. Está constituido por proteínas denominadas  $\delta$ -endotoxinas también conocidas como proteínas Cry y Cyt. Se han encontrado  $\delta$ -endotoxinas activas contra insectos lepidópteros (mariposas), coleópteros (escarabajos), dípteros (mosquitos), himenópteros (hormigas), ácaros y también contra otros invertebrados como nematodos, gusanos planos y protozoarios. La primera bacteria fue aislada del gusano de seda en 1902. Durante muchos años se pensó que *Bacillus thuringiensis* era un patógeno de lepidópteros porque solo se aislaron cepas activas contra este tipo de insectos. En 1978, se encontró una bacteria *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* capaz de matar mosquitos y en 1983 una *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* activa contra insectos coleópteros. Fue a partir de entonces que un gran número de investigadores en todo el mundo se dedicó a buscar más de estas bacterias y se han encontrado una gran diversidad de estas, las cuales se han caracterizado por su serotipo H-flagelar, en base a las proteínas presentes en el flagelo en más de 45 serotipos y 58 serovariedades diferentes.

En especies de *Bacillus*, la endospora se desarrolla en un esporangio que consiste de dos compartimentos celulares conocidos como la célula madre y la espora. Las proteínas insecticidas se acumulan en la célula madre durante el proceso de esporulación. Este programa de diferenciación involucra la regulación de muchos genes en el tiempo y en el espacio a través de la utilización de múltiples factores sigma que se expresan a diferentes tiempos en los dos compartimentos celulares.

La bacteria *Bacillus thuringiensis* está ampliamente distribuida en el agua, superficie de plantas y principalmente en el suelo. También se ha aislado de cadáveres de insectos y polvo de productos agrícolas almacenados. Las células vegetativas de *Bacillus thuringiensis* tienen forma de bacilo con un tamaño promedio de 2 a 5  $\mu\text{m}$  por 1  $\mu\text{m}$ , poseen flagelos peritricos y se reproducen por fisión binaria.

Las proteínas cristalinas insecticidas ( $\delta$ -endotoxina) son tóxicas para larvas de insectos de los órdenes: Lepidóptera, Díptera y Coleóptera. En años recientes se han reportado aislamientos de *Bacillus thuringiensis* que tienen actividad contra otros órdenes de insectos (Himenóptera, Homóptera, Orthóptera, y Mallophaga) y contra nemátodos, ácaros y protozoarios. Las formulaciones comerciales de los bioinsecticidas hechos a base de *Bacillus thuringiensis* son los más utilizados para el control de plagas, reportándose una distribución anual de 2.3 toneladas. A principios de 1998 se conocían cerca de 200 productos de *Bacillus thuringiensis* registrados. La Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH) en 1989 estimó una demanda potencial de 1718 toneladas anuales de *Bacillus thuringiensis* para México, en base a su utilización para combatir las principales plagas que atacan los cultivos agrícolas, considerando la aplicación de solo el 10% en campo.

Algunas de las ventajas que tienen los bioinsecticidas de *Bacillus thuringiensis* y que les permite tener éxito sobre los insecticidas orgánicos sintéticos son: Inocuidad, Selectividad y especificidad, Compatibilidad, Biodegradable, además de económicos (bajo costo). Sus costos de producción se reducen, debido al avance tecnológico en las áreas de fermentaciones, microbiología y genética, haciéndolos más competitivos en el mercado.

### **1.8.1 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Bacillus thuringiensis***

El género *Bacillus* incluye 51 especies. La heterogeneidad dentro del género se refleja en la composición de bases de DNA, cuyo rango va de 32 a 69 mol % G+C, lo que resulta en la necesidad de una subdivisión del género en varios subgéneros. Son bacilos Gram positivos, aeróbicos, anaerobios facultativos, formadores de esporas, varían en tamaño desde 3 x 0,4 µm de diámetro hasta 9 x 2 µm de largo y aparecen solos, en una forma diplobacilar o en cadenas. Las colonias únicas suelen tener de dos a varios milímetros de diámetro y presentan un aspecto harinoso y finamente granular; otras son membranosas y rugosas. La temperatura óptima para el crecimiento varía entre 25°C a 37°C. En la forma vegetativa, los bacilos son destruidos en 1 hora por el calor húmedo a una temperatura de 55°C (Sanz Ana María, *et al.*, 2001).

El concepto “Grupo *Bacillus cereus*” es un término no taxonómico que ha sido comúnmente usado para referirse a un grupo de bacterias cuya taxonomía ha sido ampliamente discutida. Este grupo está tradicionalmente compuesto por seis especies: *B. cereus* (considerado la especie modelo dentro del grupo), *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* y *B. weihenstephanens*. (Vilain Sebastien, *et al.*, 2006). Mediante extensos estudios genómicos probados en cepas de *B. anthracis*, *B. cereus* y *B. thuringiensis* usando diferentes técnicas, como electroforesis de enzima multilocus (MLEE) (Helgason *et al.* 1998), secuenciación de genes codificantes de enzimas del metabolismo central (Helgason *et al.* 2000b), o AFLPs entre otros, se ha propuesto que pertenecen a la misma especie (*Bacillus cereus sensu lato*). Mientras *B. anthracis*, *B. cereus* y *B. thuringiensis* son miembros del grupo *B. cereus* cercanamente relacionados, también existen aislados individuales que exhiben diferencias en términos de rango de hospedero y virulencia. (Cliff S. Han, *et al.*, 2006). Ha sido propuesto que *B. anthracis* deriva de *B. cereus*-*B. thuringiensis* por la adquisición de los plásmidos de virulencia pXO y la sucesiva adaptación del genoma. (Daffonchio Daniele, *et al.*, 2006). La comparación de la secuencia nucleotídica 16S rRNA, revela menos del 1% de divergencia entre ellos. Juntos, la secuencia del 16S rDNA y las características fenotípicas son algunos de los principales factores que dan realce a la discusión acerca de la clasificación de esas especies. Las cepas de *B. anthracis* son capaces de formar cápsula y de producir

toxinas que conducen al carbunco en animales y humanos, causando la enfermedad conocida como ántrax. *B. thuringiensis* forma un cristal parasporal que es activo en larvas de una variedad de insectos, identificándose patotipos específicos. *B. cereus* carece de ambas características y puede causar intoxicación alimentaria (Helgason Erlendur, *et al.*, 2000).

### **1.8.2 Diferenciación de cepas de “*B. cereus-thuringiensis*”**

Con los métodos moleculares es relativamente fácil probar la existencia de los genes por PCR o hibridación DNA-DNA o DNA-RNA. Estas metodologías han sido hechas claramente para *B. thuringiensis* a nivel de laboratorio y a nivel de campo para seguir genes de tipo plasmidico y cromosomales (Navez González 2000, Rojas Ruíz 2004). En un trabajo previo en el laboratorio MIMOCE-CICM-ICUAP se analizó la distribución del marcador *ihr* (*integration by homologous recombination*) en “*B. cereus-thuringiensis*” provenientes de 103 muestras de las que se aislaron bacterias que presentaron morfología colonial característica del grupo “*cereus*”, 88 aislados (85%) tuvieron actividad de lecitinasa positiva y fermentación de manitol negativo, mientras que 15 aislados (14%) presentaron nula actividad de lecitinasa y resultaron manitol positivo. En ese análisis se considero “*B. cereus*” a aquellas cepas que mostraran actividad de lecitinasa positiva y fermentación de manitol negativa, sin embargo, todavía podrían estar aquí incluidos los aislados de la especie *B. thuringiensis*, y de *B. megaterium-like* a aquellas que fueron lecitinasa negativa y manitol positivo (Rodríguez Rodríguez E. 2009).

En base a una muestra representativa sin sesgo se seleccionaron 30 cepas representativas para realizar el análisis molecular, de éstas 18 fueron consideradas como *B. cereus* por carecer de cristales en adición a las diversas características encontradas en las muestras, 8 cepas se clasificaron como *B. thuringiensis* debido a la presencia de cristales en el análisis microscópico y 4 muestras que no presentaban las características para pertenecer al grupo “*cereus*” también fueron seleccionadas. De las 30 cepas analizadas 13 cepas amplificaron por PCR el locus *ihr* que parece ser variable en secuencia y un hot-spot y todas mostraron amplificación con un componente toxigénico Nhe-L1, 29 para otro marcador Nhe-L2 y 22 para el gen de

una enterotoxina cromosomal. Una cepa presentó una banda de amplificación de mayor peso molecular con el locus *ihr*. De los 8 *B. thuringiensis* 3 amplificaron para *ihr*, 8 para NHe-2, 8 para Nhe1 y 7 para la enterotoxina. De 18 cepas consideradas como *B. cereus*, 8 tuvieron amplificado para *ihr*, 17 para NHe-2, 18 para Nhe1 y 12 para la enterotoxina. De las 4 clasificadas como otros *Bacilli* 2 dieron amplificación para *ihr*, 4 para NHe-2, 4 para Nhe1 y 3 para la enterotoxina. Se observó que 22 cepas (73%) poseen los tres locus que codifican toxinas y amplia distribución de *ihr*. El análisis de la región ITS del rDNA revela un patrón de amplificación con características similares en todas las cepas independientemente de la especie, por lo que este marcador se confirmó como poco fiable, ya se esperaba que hubiera amplificación solamente en las bacterias de la especie *B. cereus* (Rodríguez Rodríguez E. 2009).

Inicialmente se había considerado que el locus *ihr* era de tipo clonal, pero había inconsistencia con la habilidad de transformación y recombinación hacia el cromosoma (Sansinenea Royano 2005). El marcador de toxinas fue muy frecuente aunque no se tiene evidencia de expresión que manifieste peligrosidad aparente. No se pudieron apreciar diferencias muy claras entre *B. thuringiensis var israelensis* y *B. cereus* 14579, tampoco aportaron resultados para diferenciar variaciones en el la región intergénica del rDNA 16S, aparentemente porque esa secuencia intergénica tampoco varía. Entre los elementos que se deberían considerar para discriminar entre cepas están las diferencias por MLST y la presencia de los elementos genéticos móviles como plásmidos o los fagos/profagos albergados en el cromosoma bacteriano.

## 1.9 HIPÓTESIS

Es posible aprovechar la estructura y grupos funcionales presentes en las glicoproteínas de la cubierta celular de la bacteria *B. thuringiensis* para favorecer la nucleación de cristales de Hidroxiapatita de Calcio, utilizando el método biomimético, de manera que se simule un proceso natural y quizás pueda utilizarse como material bio-util.

## 1.10 OBJETIVOS

### General

- Análisis del desarrollo de cristales de Hidroxiapatita de Calcio en nitrocelulosa recubierta con células de *Bacillus thuringiensis*.

### Particulares

1. Caracterización fenotípica y genotípica de cepas de *B. thuringiensis*.
2. Obtención de un molde a partir de células de *B. thuringiensis* para la síntesis de Hidroxiapatita
3. Caracterización microestructural de Hidroxiapatita de calcio por microscopía electrónica de barrido (SEM), Espectroscopia de difracción de rayos X (EDS), Difracción de Rayos X (DRX), Espectroscopia Infrarroja (FTIR).

## CAPÍTULO II METODOLOGÍA

### CRECIMIENTO DE HIDROXIAPATITA SOBRE LA MEMBRANA CELULAR DE *Bacillus thuringiensis*

En la presente sección se describen los materiales y métodos que se usaron en el crecimiento de hidroxapatita (HAp) sobre la membrana celular de *Bacillus thuringiensis*.

#### 2.1 MATERIALES, MEDIOS, SOLUCIONES

Tabla 2- 1 reactivos usados en todo el proceso

NOMBRE DE REACTIVO	DATOS GENERALES DEL PRODUCTO
HCl FUMANTE 37%	Pro análisis MERCK
Etanol absoluto	J.T. Baker., ACS
H <sub>2</sub> O DESIONIZADA	H <sub>2</sub> O PM. 18.02 Para uso como aditivo en el laboratorio (preparados), limpieza de material y equipo. HYCEL DE MÉXICO
CaCl <sub>2</sub>	J.T. Baker. CaCl <sub>2</sub> PM. 110.99
NaCl	Cristal ACS NaCl PM. 58.44 g/mol
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> polvo.	J.T. Baker., ACS. K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> PM. 174.18
TRIS (HIDROXIMETIL AMINOMETANO)	C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> PM. 121.14 Ensayo mín. 98% HYCEL DE MÉXICO
FeSO <sub>4</sub>	J.T. Baker., ACS
CuSO <sub>4</sub>	J.T. Baker., ACS
ZnSO <sub>4</sub>	J.T. Baker., ACS
MnSO <sub>4</sub>	J.T. Baker., ACS
MgSO <sub>4</sub>	J.T. Baker., ACS
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	J.T. Baker., ACS
Glucosa	J.T. Baker., ACS
Tris pH 7.5	Invirogen
Extracto de levadura	Bioxon
Bromuro de Etidio	Invirogen
Peptona de caseína	Bioxon
Agar bacteriológico	Bioxon
H <sub>2</sub> O PISA	AGUA INYECTABLE PISA, DILUYENTE REG. NO. 75592 SSA IV 1010310

<b>BUFFER</b>	<b>Invirogen</b>
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	<b>J.T. Baker., ACS</b>
<b>dNTP's</b>	<b>Invirogen</b>
<b>polimerasa Taq</b>	<b>Invirogen</b>
<b>Oligonucleótido bglpFc1</b>	<b>GCG TTT GTG CTG GTG TAA GT</b> <b>Integrated DNA Technologies 100nmole DNA oligo, 20</b> <b>bases</b>
<b>Oligonucleótido bglpFc2</b>	<b>CTG CAA TCG GAA GGA AGA AG</b> <b>Integrated DNA Technologies 100nmole DNA oligo, 20</b> <b>bases</b>
<b>Oligonucleótido bilvdc1</b>	<b>CGG GGC AAA CAT TAA GAG AA</b> <b>Integrated DNA Technologies 100nmole DNA oligo, 20</b> <b>bases</b>
<b>Oligonucleótido bilvdc2</b>	<b>GGT TCT GGT CGT TTC CAT TC</b> <b>Integrated DNA Technologies 100nmole DNA oligo, 20</b> <b>bases</b>
<b>Oligonucleótido bilvd2c1</b>	<b>AGA TCG TAT TAC TGC TAC GG</b> <b>Integrated DNA Technologies 100nmole DNA oligo, 20</b> <b>bases</b>
<b>Oligonucleótido bilvd2c2</b>	<b>GTT ACC ATT TGT GCA TAA CGC</b> <b>Integrated DNA Technologies 100nmole DNA oligo, 21</b> <b>bases</b>
<b>Oligonucleótido bptac1</b>	<b>GCA GAG CGT TTA GCA AAA GAA</b> <b>Integrated DNA Technologies 100nmole DNA oligo, 21</b> <b>bases</b>
<b>Oligonucleótido bptac2</b>	<b>TGC AAT GCG AGT TGC TTC TA</b> <b>Integrated DNA Technologies 100nmole DNA oligo, 20</b> <b>bases</b>
<b>Oligonucleótido bpurc1</b>	<b>CTG CTG CGA AAA ATC ACA AA</b> <b>Integrated DNA Technologies 100nmole DNA oligo, 20</b> <b>bases</b>
<b>Oligonucleótido bpurc2</b>	<b>CTC ACG ATT CGC TGC AAT AA</b> <b>Integrated DNA Technologies 100nmole DNA oligo, 20</b> <b>bases</b>

## **2.2 TÉCNICAS PARA LA OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE HIDROXIAPATITA SOBRE LA SUPERFICIE DE *Bacillus thuringiensis***

### **2.2.1 CULTIVO CELULAR**

Del cepario del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas (CICM) se obtuvieron 76 cepas de *Bacillus*, gentilmente donadas por las estudiantes del posgrado, Erika Rodríguez y Daría Hernández, dichas cepas se donaron en cultivos de LB- agar, se sembraron en cajas petri nuevas con LB-agar para tener células vegetativas exclusivamente dicho ensayo se hizo a 12 hrs de incubación a 28°C, después se tomo una sola colonia y se inoculó en un tubo falcon, que contenía LB-caldo a un volumen de 3 ml. Estos tubos se sometieron por seis horas a 28°C en agitación constante, transcurrido este lapso, se observaron en microscopio óptico en el modo de contraste de fases, para determinar su morfología y corroborar la presencia de *Bacillus*. Una vez catalogada la morfología se procedió a inocular cada cepa en medio TRIS-G, con la finalidad de hacerlas esporular, dicho experimento se dejo por 72 horas a 28°C en agitación constante, alcanzado este periodo de tiempo se observaron nuevamente por microscopio óptico en modo de contraste de fases, con la finalidad de identificar si esporulan y/o generan cristales. (Ver la sección de resultados)

### **2.2.2 ANÁLISIS DE PCR (reacción de la cadena de la polimerasa)**

De las cepas seleccionadas (ver sección de resultados) se extrajo el DNA total como se describe en líneas anteriores, dichas extracciones se sometieron a la prueba de PCR, en la cual se ocuparon 10 oligonucleótidos (ver tabla 2-1) los cuales son un consenso MLST para identificar genes conservados en *Bacillus*, (<http://pubmlst.org/bcereus/info/primers.shtml>) se ocupó un programa para el termociclador de acuerdo a las hojas de especificación de los oligonucleótidos, (Integrated DNA Technologies 100nmole DNA oligo) con los siguientes parámetros:

- Desnaturalización 91°C por 1 minuto
- Alineamiento 53°C por 30 segundos
- Extensión a 72° por 30 segundos
- Refrigeración a 4°C t = ∞
- Número de ciclos 30

Una vez obtenidos los amplificadores se corrieron en geles de agarosa y se tiñeron en Bromuro de Etidio (ver sección de materiales y soluciones) para su posterior análisis en el fotodocumentador (ver sección de resultados). Si se requiere más información sobre la técnica revisar la sección de anexos.

### **2.2.3 ANÁLISIS FILOGENÉTICO**

Los amplificadores de las cepas seleccionadas (ver sección de resultados) se mandaron a secuenciar, los resultados se analizaron con la herramienta BLAST comparando así su homología con otros microorganismos y haciendo el posterior análisis filogenético representado finalmente en un árbol filogenético.

### **2.2.4 PREPARACIÓN DE LAS MEMBRANAS MILLIPORE™ CON BACTERIAS DE *Bacillus thuringiensis***

Una vez obtenido el cultivo celular de *Bacillus thuringiensis* en medio LB-caldo (ver sección de cultivo celular) se inactiva con 3 ml de etanol al 70% con el fin de evitar la lisis celular posterior en el plasma utilizado en el método biomimético que posteriormente se describe. Esta mezcla de bacterias, medio LB-caldo y etanol al 70% se centrifuga a 3000 rpm en un lapso de 5 min, con la finalidad de obtener los paquetes celulares y desechar el resto de la mezcla, hecho esto se resuspende el producto de la centrifugación en agua destilada y se filtra a través de una membrana Millipore™ con un diámetro de poro de 0.22 μm, con la ayuda del aparato de filtración destinado para este proceso. Una vez obtenidas las membranas con las células depositadas en una de sus caras se deja secar por 5 hrs. Para evitar que se resuspendan las células al ponerse inmediatamente en contacto con el Plasma.

## 2.2.5 IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO BIOMIMÉTICO

Se prepara el plasma a una concentración de 1.5 FFS (fluido fisiológico simulado) como puede verse en la tabla 2-3, esta concentración demostró ser más eficiente para crecer HAp (ver la sección de resultados), se utiliza agua desionizada en todo el proceso, se recomienda disolver cada uno de los reactivos por separado en frascos Erlenmeyer, una vez disueltos se procede a agregar  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{NaCl}$  en un vaso de precipitados se afora aproximadamente a la mitad del volumen final con agua desionizada y se procede a agregar el  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y posteriormente el TRIS (Hidroximetil Aminometano), en este punto, agregados todos los reactivos, se observa que la solución se torna blanquecina, inmediatamente se afora hasta llegar al volumen final y se estabiliza el pH del plasma a 7.4 aproximadamente con unas gotas de HCl disuelto previamente en agua en una proporción 2:10, en caso de que el pH baje de 7.4 se pueden agregar unos granos de TRIS (Hidroximetil Aminometano) para ajustarlo, si se observan precipitaciones en este paso se deberá repetir todo el proceso.

Una vez estabilizado el plasma se procede a la cuidadosa inmersión de las membranas Millipore™ impregnadas con las células de *Bacillus thuringiensis* en un tubo de ensayo aforado a 40 ml con el plasma, el plasma se cambia diariamente para simular parcialmente el recambio del plasma sanguíneo humano.

A continuación se muestra una membrana Millipore™ de 0.22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro, la figura 2-1 muestra del lado izquierdo a la membrana Millipore™ usada como control, es decir se sometió a la inmersión del FFS pero no está impregnada con *Bacillus*, en el lado derecho se demuestra como se ve a nivel macro la formación de Hidroxiapatita lo cual a simple vista son pequeños conglomerados de forma esférica menores a 1 mm de diámetro cuando la membrana está impregnada con *Bacillus* esta imagen corresponde a la cepa 83 (derecha).



Figura 2-1 membrana Millipore™ la de la izquierda es el control y la de la derecha muestra como se observa la HAp que crece sobre *Bacillus thuringiensis*

### **2.2.6 ANÁLISIS POR MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA (AFM)**

Las cepas seleccionadas (ver sección de resultados) se analizaron por microscopia de fuerza atómica (AFM) con un cantiléver de nitruro de silicio en el modo de tapping (contacto intermitente) a una velocidad de escaneo de  $666.67 \mu s$ , una retroalimentación de filtro de 1.6 y una ganancia de 2.0, el equipo utilizado es un JEOL JSPM5200, cabe mencionar que solo se analizó la morfología de la membrana celular del *Bacillus*, dado que la técnica solo permite analizar morfologías de escasa topografía (no mayor a 3 micras), por lo que los cristales de HAp se analizaron por otras técnicas (ver sección de resultados). Si se requiere más información sobre la técnica revisar la sección de anexos.

### **2.2.7 ANÁLISIS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO Y ESPECTROSCOPIA POR DISPERSIÓN DE RAYOS X (SEM Y EDS)**

Las cepas seleccionadas (ver sección de resultados) se analizaron por microscopia electrónica de barrido (SEM) se utilizaron electrones retrodispersados en modo de bajo vacío a 10keV y un spot size de 50, el análisis EDS se efectuó con un spot size de 60 el equipo utilizado es un JEOL JSM-6610 LV equipado con una sonda de Rayos X marca Oxford, el análisis se hizo a distintas ampliaciones y con muestras a diferentes intervalos de tiempo de inmersión con la finalidad de analizar el crecimiento de cristales sobre las membranas celulares del *Bacillus*. Si se requiere más información sobre la técnica revisar la sección de anexos.

## **2.2.8 ANÁLISIS POR ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)**

De las cepas seleccionadas (ver sección de resultados) se analizaron por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) con el accesorio ATR con el cual prácticamente se elimina la preparación “exhaustiva” de la muestra, se hizo un análisis de “background” para restarlo a la muestra y eliminar la interferencia de fondo, se procedió con el análisis de las muestras para determinar los grupos funcionales y compuestos presentes en estas; el equipo utilizado es un Bruker Vertex 70 equipado con ATR.

## **2.2.9 DIFRACCIÓN DE RAYOS X**

Se analizaron por difracción de Rayos X (DRX) las cepas seleccionadas (ver sección de resultados) se utilizó el accesorio conocido como “ojo de lince” o linx eye el cual es un potente detector que permite obtener una gran cantidad de cuentas en menor tiempo con respecto al detector de centelleo, las muestras se analizaron desde el grado 5 hasta el 90, obteniendo así los patrones de difracción para el material que creció sobre la membrana de *Bacillus thuringiensis* después de 10 días de inmersión. Si se requiere más información sobre la técnica revisar la sección de anexos.

## **CAPÍTULO III**

En este capítulo se muestran los resultados y discusión de los estudios hechos a las bacterias y al material obtenido sobre su superficie, después de haber sido sometidos al método biomimético.

### **RESULTADOS**

En esta sección se presentan los resultados obtenidos en la caracterización fenotípica de *Bacillus* se hizo por medio de microscopía óptica y la caracterización genotípica se realizó por la técnica de PCR; por otra parte el crecimiento de HAP sobre la superficie de la membrana celular de *Bacillus* se realizó a partir de su caracterización microestructural, mediante microscopía de fuerza atómica (AFM), microscopía electrónica de barrido (SEM), espectroscopia por dispersión de rayos X (EDS) espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y difracción de rayos X (DRX).

#### **3.1 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA POR MICROSCOPIA ÓPTICA**

Para obtener dichos resultados se analizaron fenotípicamente un total de 76 cepas obtenidas del cepario del CICM, las cuales se muestran en la **tabla 3.1**, en donde se muestran los resultados obtenidos de la observación en microscopio óptico en el modo de contraste de fases, en donde se clasificó si esporulaban, el porcentaje de esporulación y el tiempo que necesitaron para hacerlo. De lo anterior se sabe que:

- 77.77% de las 76 cepas esporulan en menos de 72 hrs
- 22.22% de las 76 cepas esporulan en más de 72hrs
- 18.05% de las 76 cepas presentan buena esporulación en menos de 72hrs
- 2.07% de las 76 cepas presentaron formación de cristales en forma notable
-

**Tabla 3-1 Análisis fenotípico de las cepas**

CEPAS-ERIKA	ESPORULAN (HRS)	CANTIDAD DE ESP.	CEPAS DARÍA	ESPORULAN (HRS)	CANTIDAD DE ESP.	CEPAS DARÍA	ESPORULAN (HRS)	CANTIDAD DE ESP.
1	72	BC	4	72	GC	84	72+	BC
11	72	GC	6	72+	CR	85	72	GC
13	72	BC	7	72	GC	86	72	PC
17	72+	GC	14	72	GC	87	72	BC
18	72+	BC	21	72	BC	88	72	BC
20	72	BC	27	72	BC	90	72	GC
25	72+	BC	28	72	EC	91	72	BC
26	72	BC	33	72	EC	93	72	GC
27	72+	CR	51	72	CR	94	72	MPC
28	72+	PC	54	72	BC	96	72	GC
29	72	EC	57	72	CR	97	72	EC
31	72+	MPC	63	72	GC	98	72	BC
34	72	BC	64	72	BC	98	72	BC
35	72	EC	65	72	PC	99	72	EC
37	72	GC	66	72+	MPC	101	72	CR
38	72	BC	67	72+	CR	102	72	BC
39	72	GC	69	72	EC	104	72	CR
41	72	MPC	70	72	CR	105	72	BC
42	72	BC+CRY	71	72+	BC	106	72+	CR
45	72	EC	77	72	PC	116	72	BC
24E	72	GC	78	72	BC	123	72	MPC
36E	72+	CR	82	72	EC	134	72	BC
40E	72+	VEGETATIVA	83	72	EC	141	72	BC
			149	72	EC-CRY	20B	72	CR
			152	72	CR	24D	72	EC
			195	72	CR	36D	72	MPC
						40D	72	BC

En la figura 3-1 se observan algunos de los resultados obtenidos por microscopia óptica a 100x en donde se aprecia la morfología típica de *Bacillus*, todas las cepas están en estado vegetativo dado que este análisis se hizo después de obtener los cultivos en medio LB-Caldo. Cada recuadro esta marcado con el número de cepa correspondiente, la cantidad de *Bacillus* varia de una cepa a otra como se puede observar por ejemplo el caso de la cepa 26 con respecto a la 18, o existen células que no se dividieron y están formando largos filamentos como se observa en la imagen marcada con el numero de cepa 24E.

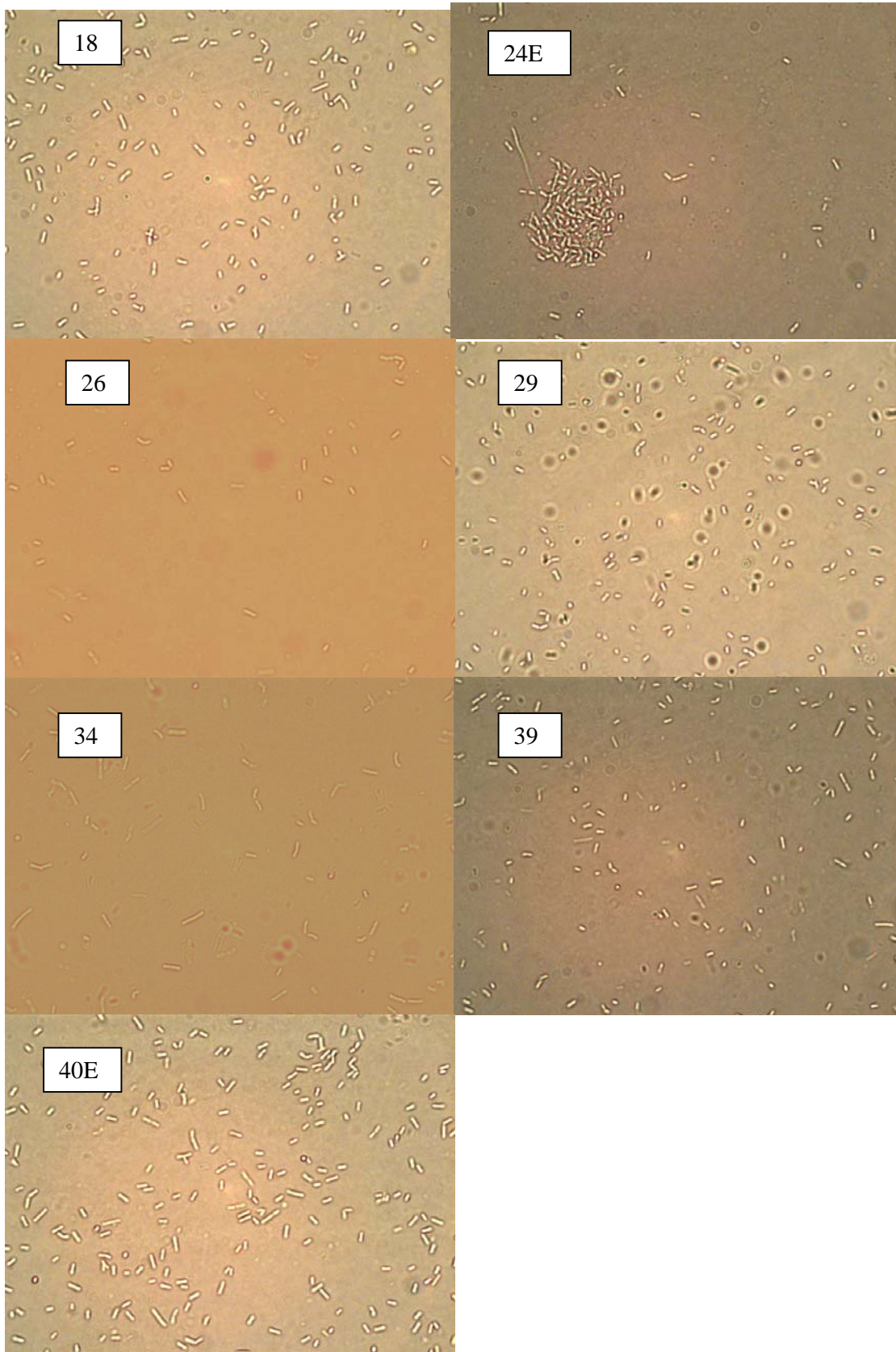
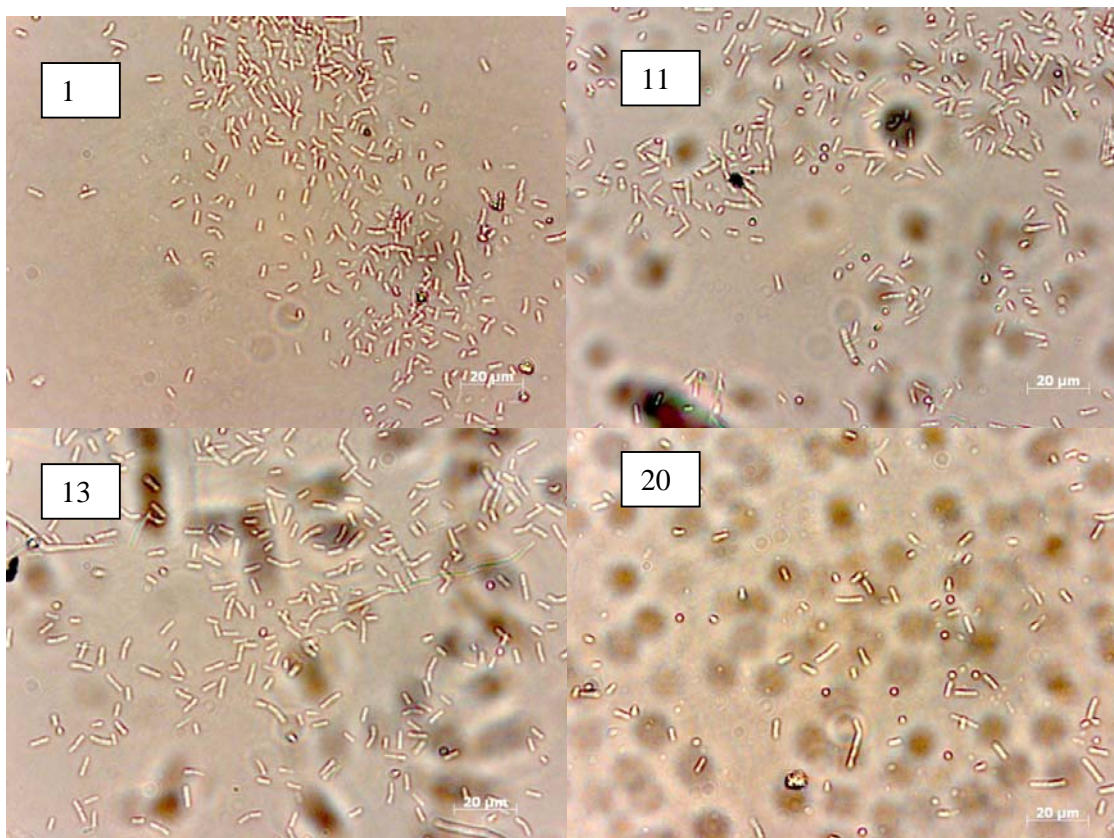


Figura 3-1 microscopias ópticas de las cepas 18, 24, 26, 29, 34, 39 y 40E en donde se observa la morfología típica de *Bacillus*

En la imagen 3.2 se muestran varios recuadros con las cepas seleccionadas para el análisis y pruebas finales de caracterización de HAp, en esta sección solo se muestra la microscopía óptica realizada a estas cepas, es decir la 1, 11, 13, 20, 64, 70 83 y 85, todas las micrografías se tomaron a una amplificación de 1000x con luz transmitida, para mayor precisión se colocó una escala que marca los 20  $\mu\text{m}$  en cada micrografía; se aprecia en ellas la morfología característica de los *Bacillus*, el largo de las bacterias va del orden de las 4  $\mu\text{m}$  a 2  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  de diámetro,

Es importante destacar que la cepa 64 aunque presenta la forma típica de *Bacillus*, las células presentan cierto ordenamiento pues como se observa en la micrografía se encuentran unas tras otra dando la apariencia de fibras.



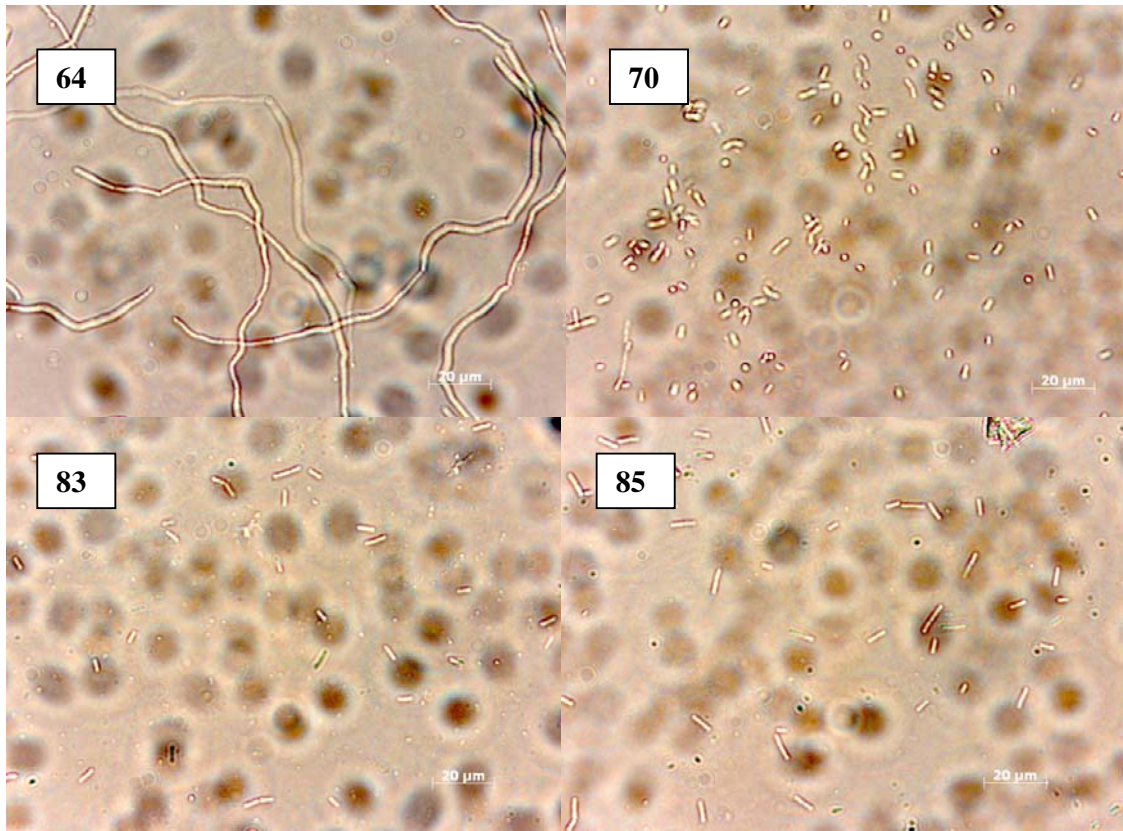


Figura 3.2 micrografías de las cepas 1, 13, 20, 64, 70, 83 y 85 en donde se observa la morfología típica de los *Bacillus*.

### **3.2 CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA POR PCR**

Los siguientes resultados muestran 2 ejemplos de los geles obtenidos después del análisis de PCR, para cada gel una tabla en donde cada columna corresponde a un carril particular del gel de agarosa el cual está debidamente identificado con el número de la cepa y el oligo que se utilizó en dicho carril, además se indica la cantidad de señal del amplificado, todos los geles tienen un marcador el cual sirve para identificar el peso molecular de los amplificados para los oligos utilizados, los cuales se encuentran en un rango de 400 a 600 en estos casos. Este análisis corresponde al esquema conocido como MLST (Multi Locus Sequence Typing (Daffonchio *et al.*, 2006)

#### **EN DONDE:**

 = MARCADOR

i1 = primer bilvdc1-2

i2 = primer bilvd2c1-2

g = primer bglpFc1-2

pta= primer bptac1-2

pur= primer bpurc1-2

\*\* = buen amplificado

\* = amplificado regular

Nulo= sin amplificado

 =MÚLTIPLE AMPLIFICADO

En la imagen 3-3 y en su tabla se observan las cepas 70, 82, 83, 85, 86 y 87, se observan amplificadas en prácticamente todas las cepas, pero en ciertos casos se observan amplificadas múltiples principalmente en las cepas 83, 85 y 87, no hubo amplificadas para las cepas 82 con el oligo i1 y 87 con el oligo pta. El orden en los carriles y los oligos es:

M	70	70	70	70	70	82	82	82	82	82	83	83	83	83	83	85	85	85	M	85	85	86	86	86	86	86	87	87	87	87	87	M	
	i1	i2	g	pt a	pu r	i1	i2	g	pt a	pu r	i1	i2	g	pt a	pu r	i1	i2	g		pt a	pu r	i1	i2	g	pt a	pu r	i1	i2	g	pt a	pu r		
	*	**	**	**	**		**	**	*	**	**	**	**	**	*	**	**	**		*	**	**	*	**	**	**	**	**	**	**	*	**	**

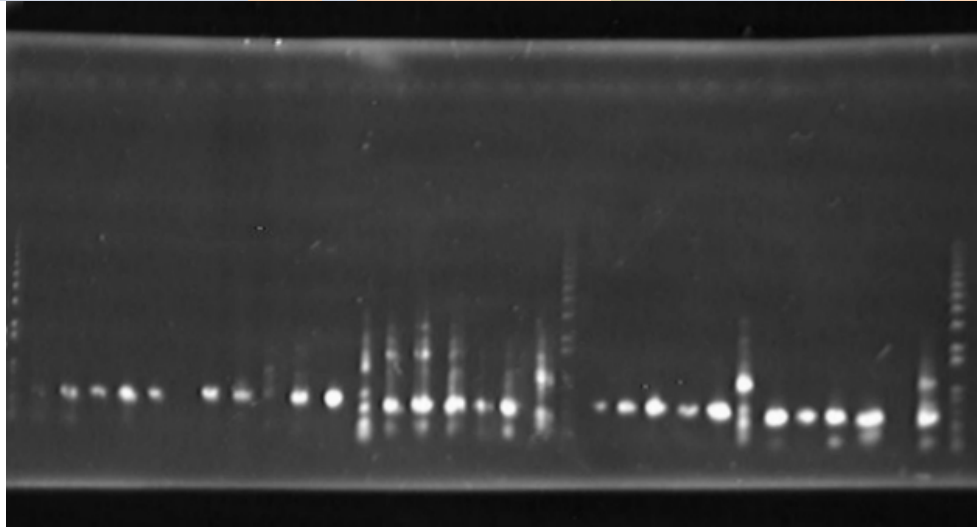


Figura 3-3 fotografía de gel de agarosa

En la imagen 3-4 y su tabla se observan los amplificados para las cepas 4, 20, 21 y 26 en donde prácticamente se observan amplificadas para todos los oligos excepto el i2 de la cepa 26. El orden en los carriles y los oligos es:

M	4	4	4	4	4	20	20	20	20	20	M	21	21	21	21	21	26	26	26	26	26
	i1	i2	g	pta	pur	i1	i2	g	pta	pur		i1	i2	g	pta	pur	i1	i2	g	pta	pur
	**	*	**	**	**	**	*	**	**	**		**	*	**	**	*	**		**	*	*

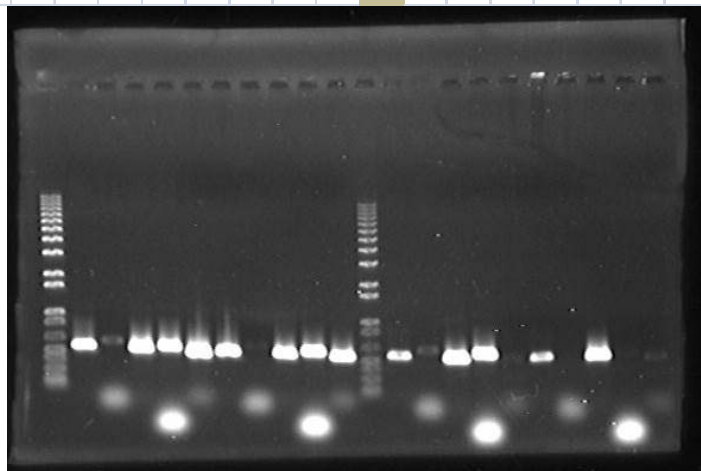


Figura 3-4 fotografía de gel de agarosa

A continuación se muestra en la tabla 3-2 el resumen de resultados de los productos de amplificación de secuencias de DNA correspondientes a genes usados para el análisis MLST en cepas de “*B. thuringiensis-cereus*”. En donde:

- ++ = excelente amplificado
- + = buen amplificado
- = no amplificó
- +’-’ = se obtuvo un pobre amplificado
- Nd = no determinado

Tabla 3-2 productos de amplificación de secuencias de DNA correspondientes a genes usados para el análisis MLST en cepas de “*B. thuringiensis-cereus*”

Cepa	<i>ihr</i> *	<i>its</i> *	<i>ilvd1</i>	<i>ilvd2</i>	<i>glpF</i>	<i>pta</i>	<i>pur</i>
1	++	+	+	-	+	-	+
4	+	+	+	+’-’	+	+	+
11	nd	+	+’-’	+’-’	+	+’-’	+
13	+	+	+	-	+	-	-
20	-	+	+	+’-’	+	+	+
21	-	+	+	+’-’	+	+	+’-’
24	+	+	+’-’	+	+	-	+’-’
26		+	+	-	+	-	+’-’
64	-	+	-	+	+	+	-
82	+	+	-	+	+	+’-’	+
83	-	+	+	+	+	+	+
86	+	+	+	+	+	+	+
87		+	+	+	+	-	+
96	-	+	-	-	-	-	-
24D		+	+	-	-	+	+
70D			+’-’	+	+	+	+
85D			+	+	+	+	+
88D	+	+	+	+	+	-	-
93D	-	+	-	+	+	+’-’	+

\*La información de los loci *ihr* e *its* corresponden a datos obtenidos por Erika Rodríguez y Daria Hernández (Rodríguez Rodríguez E., 2009)

### 3.3 ANÁLISIS FILOGENÉTICO LAS SECUENCIAS DE *B. thuringiensis*

En la tabla 3-3 se observan los resultados del análisis BLAST de las secuencias usadas para el estudio MLST obtenidas de las cepas 1, 11, 64, 70, 83 y 85 de *B. thuringiensis*.

Tabla 3-3 se observan los resultados del análisis BLAST

Locus	Gen	Máxima longitud				Longitud de 393 bases	
		Identidad (%)	Tamaño	Secuencia con score más alto	No de acceso	Secuencia de máxima identidad	No de acceso
1lpfc1	<i>glpF</i>	98	477	<i>Bacillus cereus</i> G9842	CP001186	<i>B. thuringiensis</i> serovar sotto	AY729749
1lpfc2	<i>glpF</i>	98	488	<i>Bacillus cereus</i> B4264	CP001176	<i>B. thuringiensis</i> serovar sotto	AY729749
1purpp				<i>Bacillus cereus</i>			
urc1	<i>pur</i>	99	477	<i>Bacillus cereus</i> B4264	CP001176	<i>B. thuringiensis</i> kurstaki T03a001	AY729782
1purpp				<i>Bacillus cereus</i>			
urc2	<i>pur</i>	97	468	<i>Bacillus cereus</i> B4264	CP001176	<i>B. thuringiensis</i> kurstaki T03a001	AY729782
11lpfc1	<i>glpF</i>	99	489	<i>Bacillus cereus</i> Q1	CP000227	<i>Bacillus cereus</i> AH187	CP001177
11lpfc2	<i>glpF</i>	99	490	<i>Bacillus cereus</i> Q1	CP000227	<i>Bacillus cereus</i> AH187	CP001177
11purp				<i>B. thuringiensis</i> konkukian str.		<i>Bacillus cereus</i> isolate	
purc1	<i>pur</i>	98	477	<i>B. thuringiensis</i> konkukian str. 97-27	AE017355	34	EF421122
11purp				<i>B. thuringiensis</i> konkukian str.		<i>Bacillus cereus</i> isolate	
purc2	<i>pur</i>	99	469	<i>B. thuringiensis</i> konkukian str. 97-27	AE017355	34	EF421122
64i2pvd				<i>Bacillus cereus</i>		<i>Bacillus cereus</i>	
2c1	<i>ilvD-2</i>	76	508	ATCC 14579	AE016877	BFDA96161	EU480564
64i2pvd				<i>Bacillus cereus</i>		<i>Bacillus</i>	
2c2	<i>ilvD-2</i>	97	547	ATCC 14579	AE016877	<i>weihenstephanensis</i> strain WSBC 10364	AY729768
70ptap				<i>Bacillus</i>		<i>Brevibacillus brevis</i>	
ptac1	<i>pta</i>	65	658	<i>halodurans</i> C-125	BA000004	NBRC 100599	AP008955
70ptap				<i>Lysinibacillus</i>		<i>Bacillus halodurans</i> C-	
ptac2	<i>pta</i>	75	731	<i>sphaericus</i> C3-41	CP000817	125	BA000004
83ilvdc				<i>Bacillus cereus</i>			
1	<i>ilvD</i>	97	489	<i>Bacillus cereus</i> B4264	CP001176	<i>B. thuringiensis</i> kurstaki	AY729766
83ilvdc				<i>Bacillus cereus</i>			
2	<i>ilvD</i>	97	701	<i>Bacillus cereus</i> B4264	CP001176	<i>B. thuringiensis</i> kurstaki	AY729766
83glpLp				<i>Bacillus cereus</i>			
fc1	<i>glpF</i>	97	490	<i>Bacillus cereus</i> B4264	CP001176	<i>B. thuringiensis</i> kurstaki T03a001	AY729750
83glpLp				<i>Bacillus cereus</i>			
fc2	<i>glpF</i>	98, 90	872	ATCC 10987	AE017194	<i>B. thuringiensis</i> kurstaki T03a001	AY729750
85gLpL				<i>Bacillus cereus</i>			
pfc1	<i>glpF</i>	98	479	<i>Bacillus cereus</i> B4264	CP001176	<i>B. thuringiensis</i> kurstaki T03a001	AY729750
85gLpL				<i>Bacillus cereus</i>			
pfc2	<i>glpF</i>	98	488	ATCC 10987	AE017194	<i>B. thuringiensis</i> kurstaki T03a001	AY729750

En la tabla 3-3 se muestran dos parámetros importantes de comparación; uno sobre la longitud máxima de la secuencia y el otro sobre la longitud estándar de comparación (393 bases). En este análisis se obtiene alto score para *B. thuringiensis* y la secuencia estándar de comparación porque no hay desviación del cálculo del score por secuencias no apareadas.

En las siguientes figuras se observan los árboles filogenéticos obtenidos al comparar las secuencias obtenidas contra la base de datos MLST, la figura 3-5 corresponde al marcador *pur* en las cepas 1 y 11 y la figura 3-6 corresponde al marcador *glpF* en las cepas 1, 11, 83 y 85

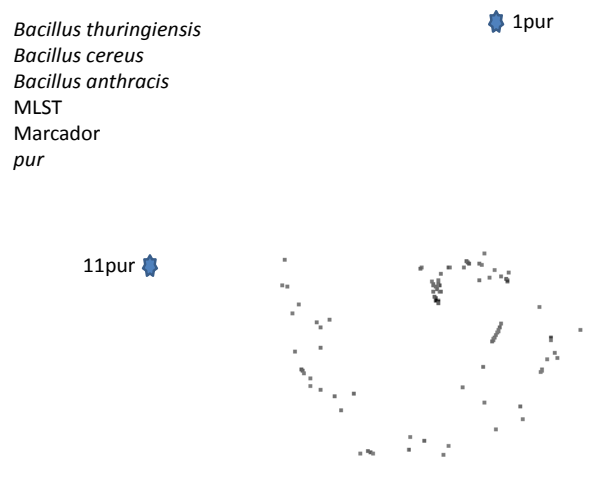


Figura 3-5. Árbol filogenético circular basado en *locus pur* construido con 142 secuencias que incluyen dos de las cepas estudiadas en este trabajo, *B. thuringiensis* 1 y 11.

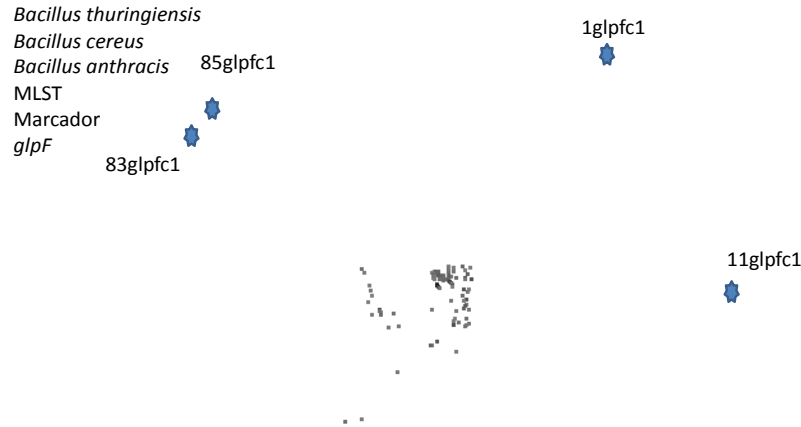


Figura 3-6. Árbol filogenético circular basado en *locus glpF* construido con 142 secuencias que incluyen cuatro de las cepas estudiadas en este trabajo, *B. thuringiensis* 1, 11, 83 y 85.

### **3.4 CARACTERIZACIÓN POR MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA**

Los siguientes resultados muestran las micrografías obtenidas por microscopia de fuerza atómica, para las cepas 70, 83 y 85, en los tres casos se hizo el análisis por modo tapping, también conocido como contacto intermitente; la señal obtenida en cada ensayo se trata de topografía y fase, la primera nos permite conocer la morfología respecto a sus características topográficas, es decir las alturas y depresiones que se localicen en la superficie de la muestra, y la modalidad de análisis de fase, nos permite conocer la diferencias importantes en la superficie con respecto a la fuerza con que oscila la punta sobre cierto punto de la muestra en donde una imagen brillante indica una mayor dureza en la superficie.

En la figura 3-7 se observa la cepa 70 con la señal de topografía en donde se muestra la morfología típica de *Bacillus*, es decir 1  $\mu\text{m}$  de diámetro y 3  $\mu\text{m}$  aproximadamente de longitud, en la imagen de la derecha se observa la imagen 3D y también se observa en la grafica inferior la rugosidad de la membrana, la cual se observa prácticamente lisa.

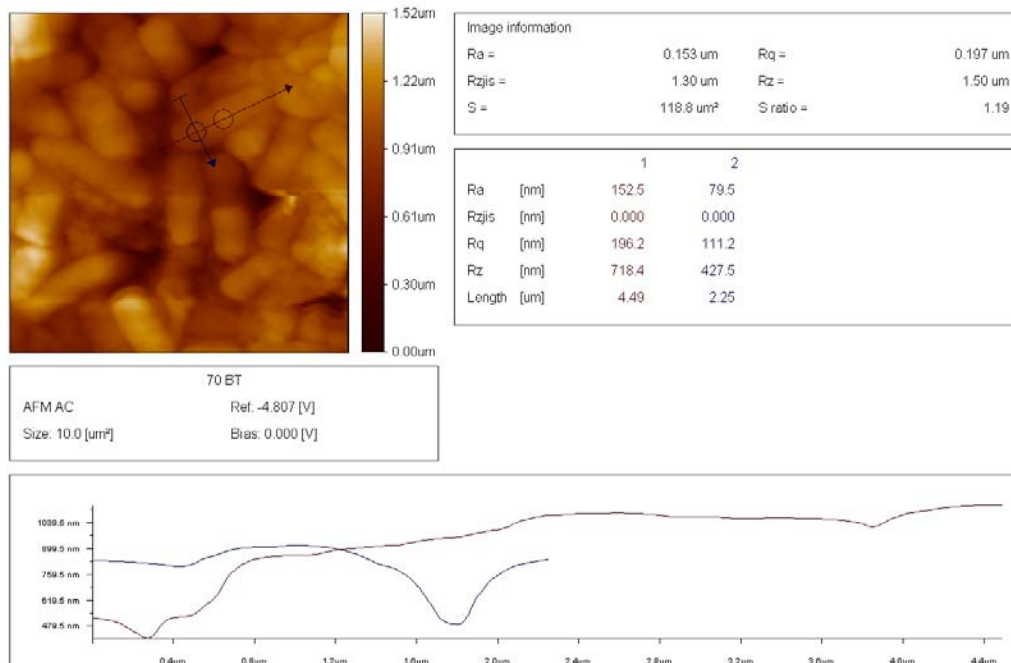
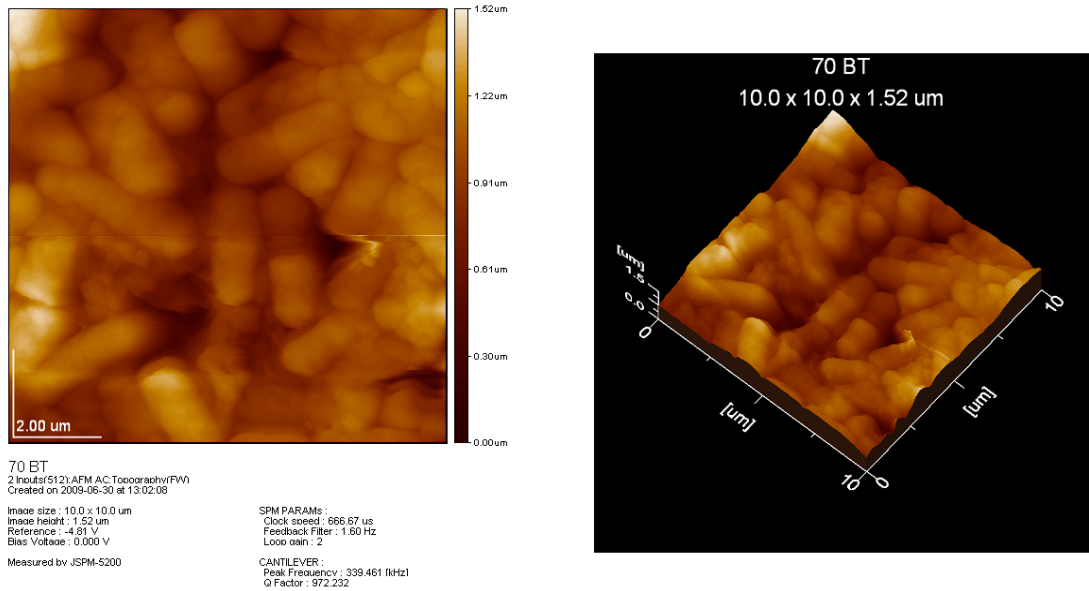


FIGURA 3-7 MICROGRAFÍAS DE TOPOGRAFÍA Y ANÁLISIS DE LA RUGOSIDAD DE LA CEPA 70

En la figura 3-8 se observa la cepa 70 en el modo de análisis de fase en donde al igual que en la figura anterior se observa la morfología típica de *Bacillus*, pero esta técnica nos permite identificar la textura de la membrana con respecto a su dureza, en donde se observa prácticamente que la membrana de *Bacillus* posee una dureza homogénea por toda su superficie.

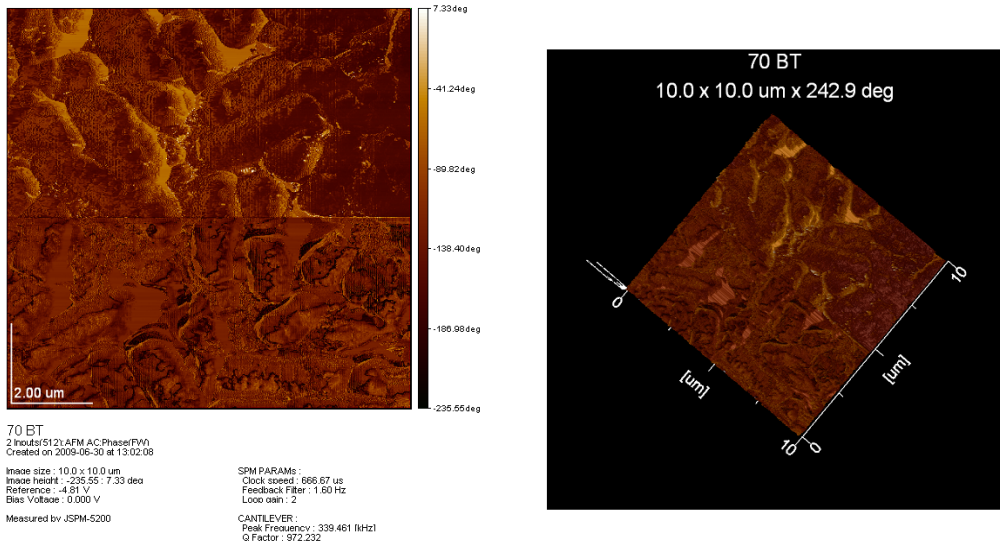


FIGURA 3-8 MICROGRAFÍAS DE LA CEPA 70 EN MODO FASE

En la figura 3-9 se muestra la morfología de *Bacillus* correspondiente a la cepa 83 en donde se observa la imagen tridimensional (izquierda), se observa claramente cierta rugosidad en la membrana de esta cepa las dimensiones son en promedio 1  $\mu\text{m}$  de diámetro por 3  $\mu\text{m}$  de largo en la grafica inferior a la imagen tridimensional se observa el análisis de la rugosidad de la membrana de una bacteria.

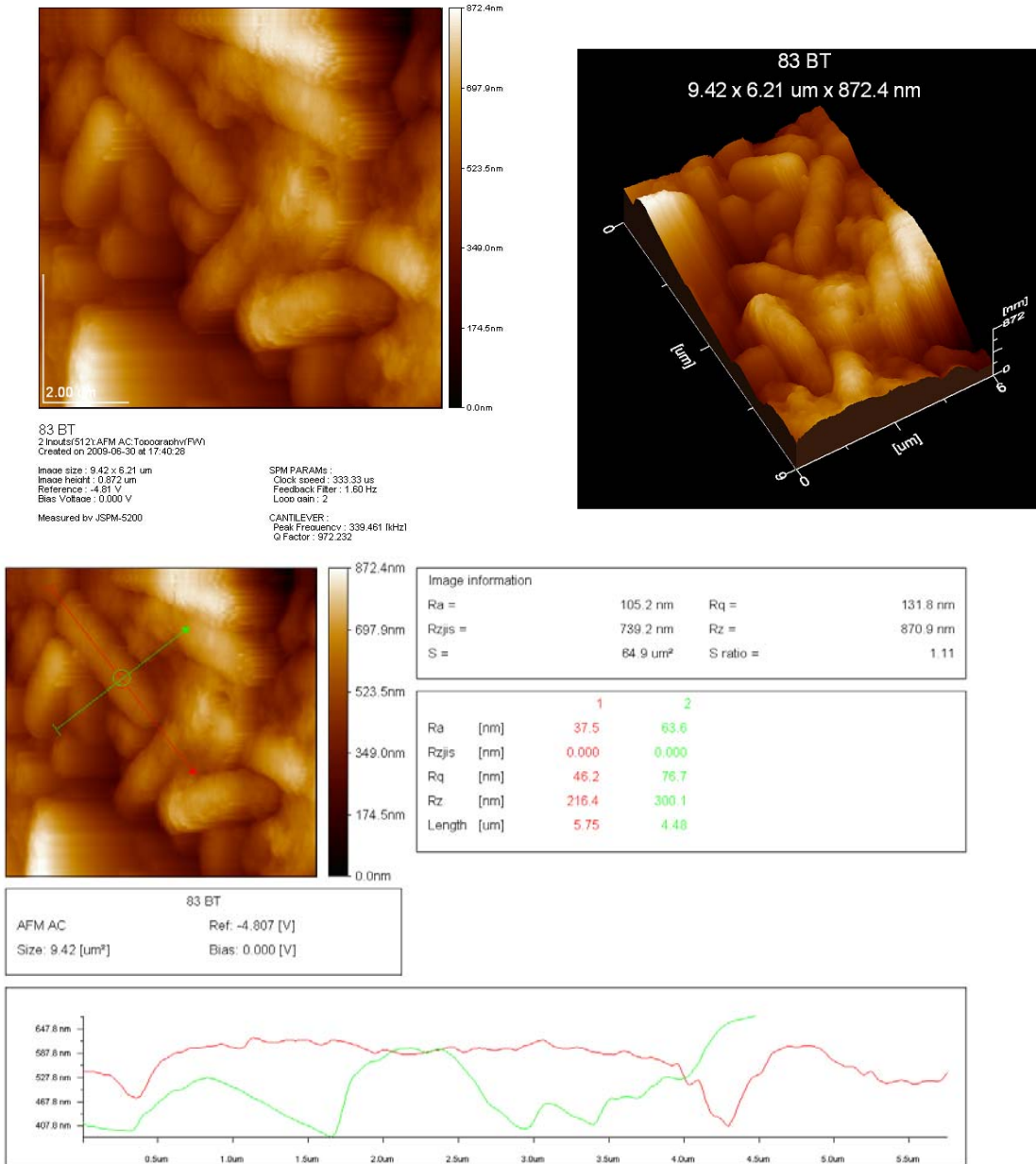


FIGURA 3-9 MICROGRAFÍAS DE LA CEPA 83 EN MODO TOPOGRAFÍA Y ANÁLISIS DE RUGOSIDAD

En el análisis de fase que se observa en la figura 3-10 corresponde a la cepa 83, en esta se puede apreciar que en los límites de la membrana hay un cambio en la dureza de la membrana esto se aprecia en las zonas más brillantes, aunque el resto de la superficie es homogénea.

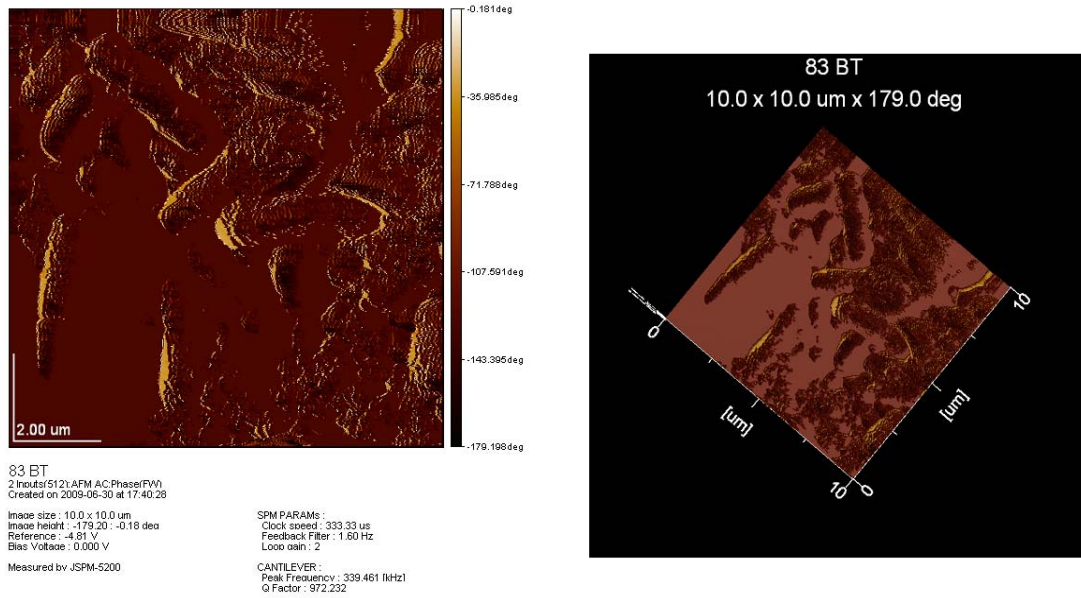


FIGURA 3-10 MICROGRAFÍAS DE LA CEPA 83 EN MODO FASE

En la figura 3-11 se observa a la cepa 85 con la morfología típica de *Bacillus*, se puede observar que las dimensiones promedio son de 3  $\mu\text{m}$  de largo por 1  $\mu\text{m}$  de diámetro, también se observa cierta rugosidad en la membrana celular, del lado derecho se observa la imagen 3D. En la grafica inferior se observa el análisis de la rugosidad de la membrana celular

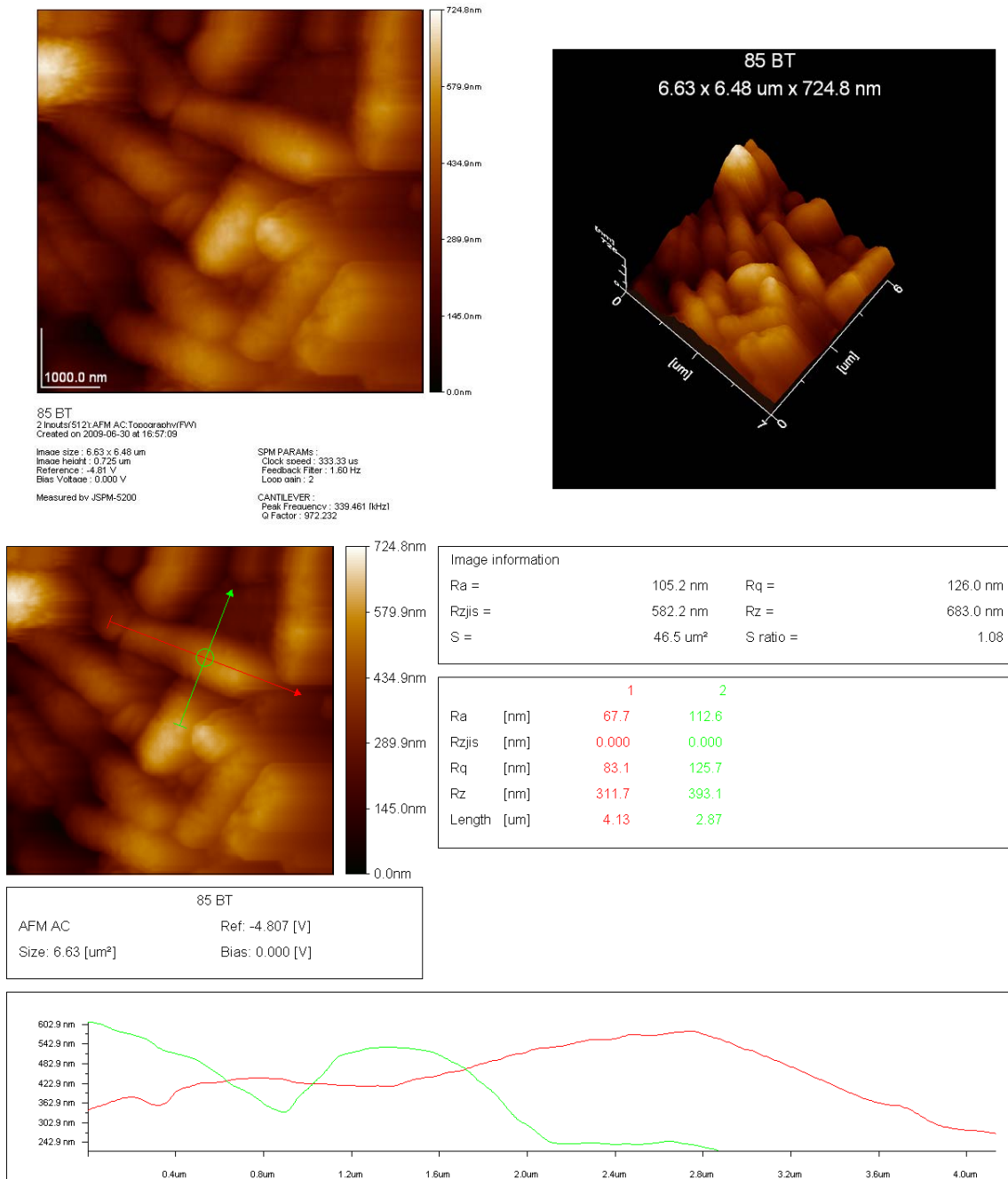


FIGURA 3-11 MICROGRAFÍAS DE AFM DE LA CEPA 85 EN MODO TOPOGRAFÍA Y ANÁLISIS DE RUGOSIDAD

En la figura 3-12 se observa el análisis de fase correspondiente a la cepa 85 en donde la rugosidad que se observa en la imagen de topografía tiene cierta correspondencia con lo observado en esta micrografía de fase, en donde los puntos más brillantes corresponden a la zona más dura en la membrana celular de esta cepa de *Bacillus*.

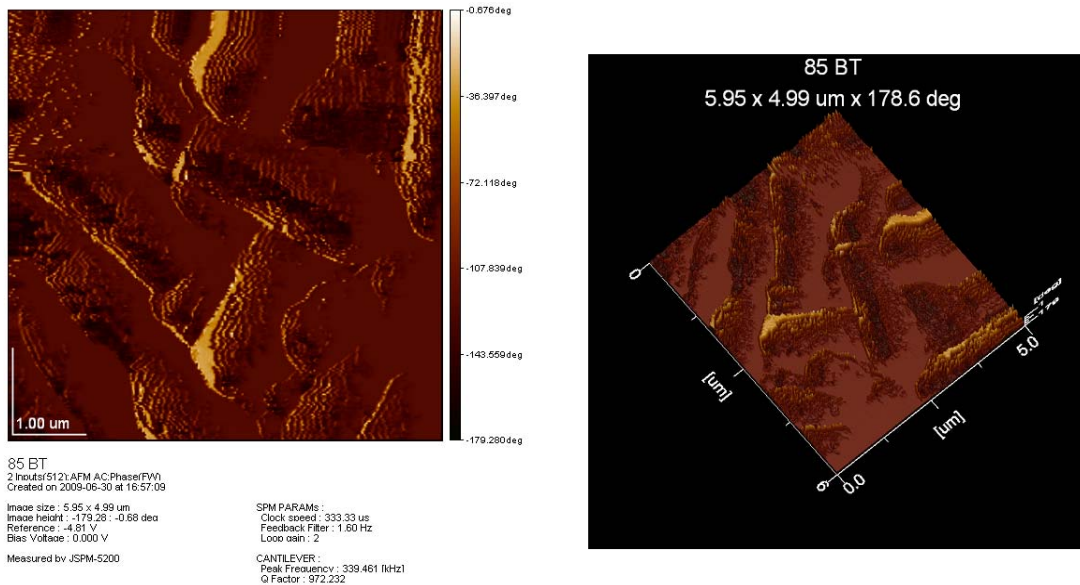


FIGURA 3-12 MICROGRAFÍA DE FASE DE LA CEPA 85

Cabe mencionar que las cepas observadas por la técnica de AFM están colocadas sobre una membrana Millipore™, la cual se fijo a un porta muestras, aunque en el fondo de las micrografías anteriores no se observa la estructura se hizo un escaneo de la superficie de la membrana para observar la porosidad y su estructura, para considerar si afectaba los resultados obtenidos con las bacterias, sin embargo su morfología está muy bien definida y no genera ninguna interferencia, como se puede apreciar en la figura 3-13.

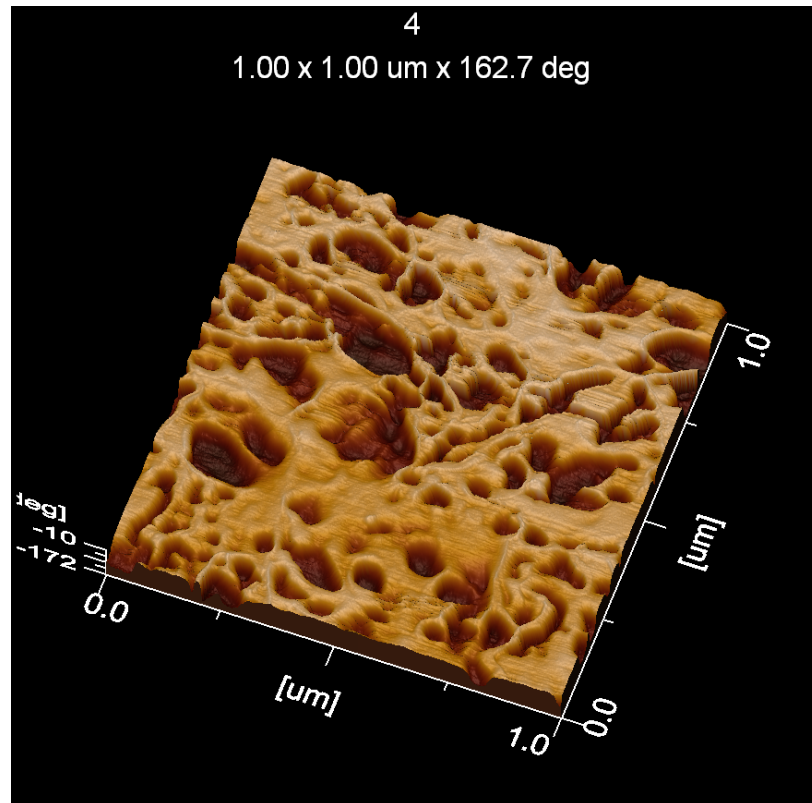
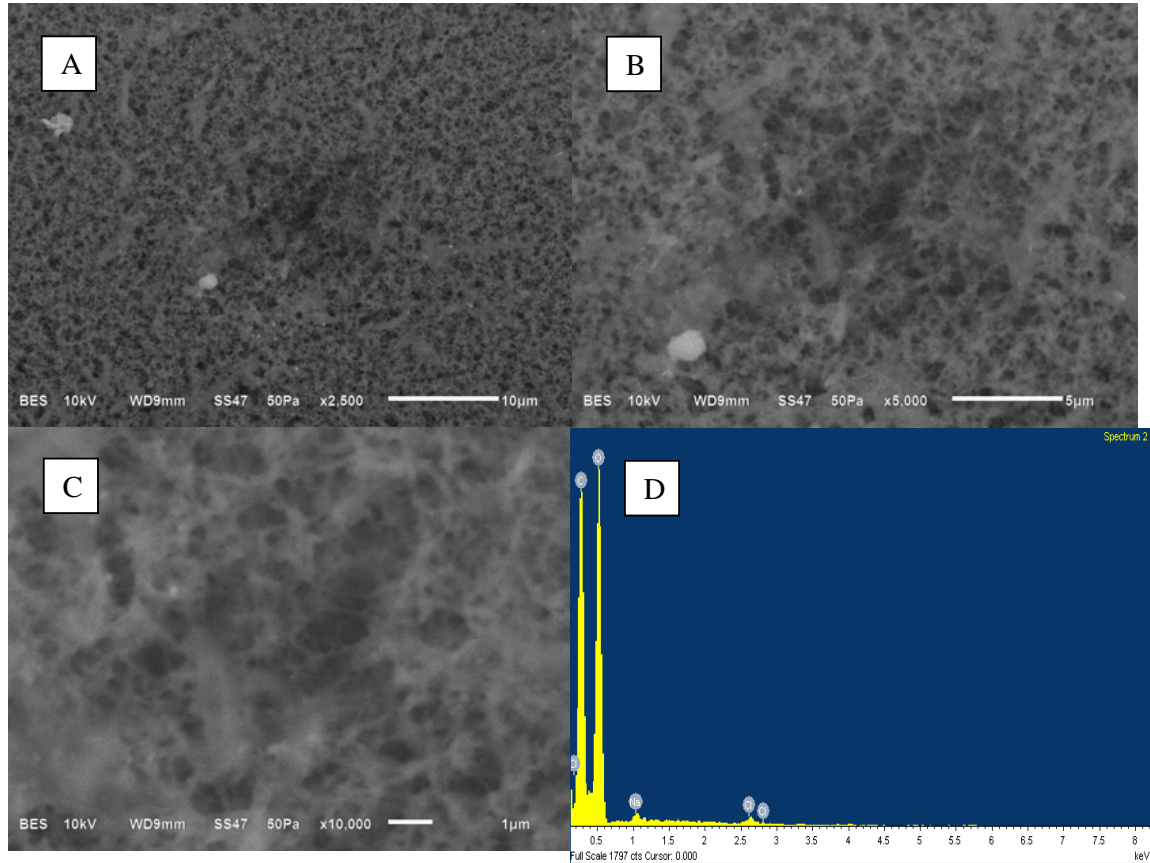


Figura 3-13 micrografía donde se observa la morfología de la membrana Millipore™ y su estructura 3D.

### **3.5 CARACTERIZACIÓN POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO**

En la figura 3-14 se observan las micrografías de una membrana Millipore™ , en los recuadros A y B se observa una morfología porosa el análisis se hizo con electrones retrodispersos a 10kV en bajo vacío en donde se observa la porosidad de la membrana, la cual tiene en promedio un diámetro que mide  $0.22\mu\text{m}$  hasta  $0.5\mu\text{m}$  como se observa en la imagen marcada con el recuadro C, en el recuadro D se observa el análisis químico elemental de la membrana correspondiente al área del

recuadro C en donde se aprecia que los elementos principales son el carbón y el oxígeno lo cual es razonable si se contempla su naturaleza orgánica, se observa en menor proporción los elementos de cloro y sodio los cuales se forman por causa de la inmersión en el FFS el cual contiene cloruro de sodio. Los porcentajes presentes se observan en la tabla inferior marcada con la letra E.

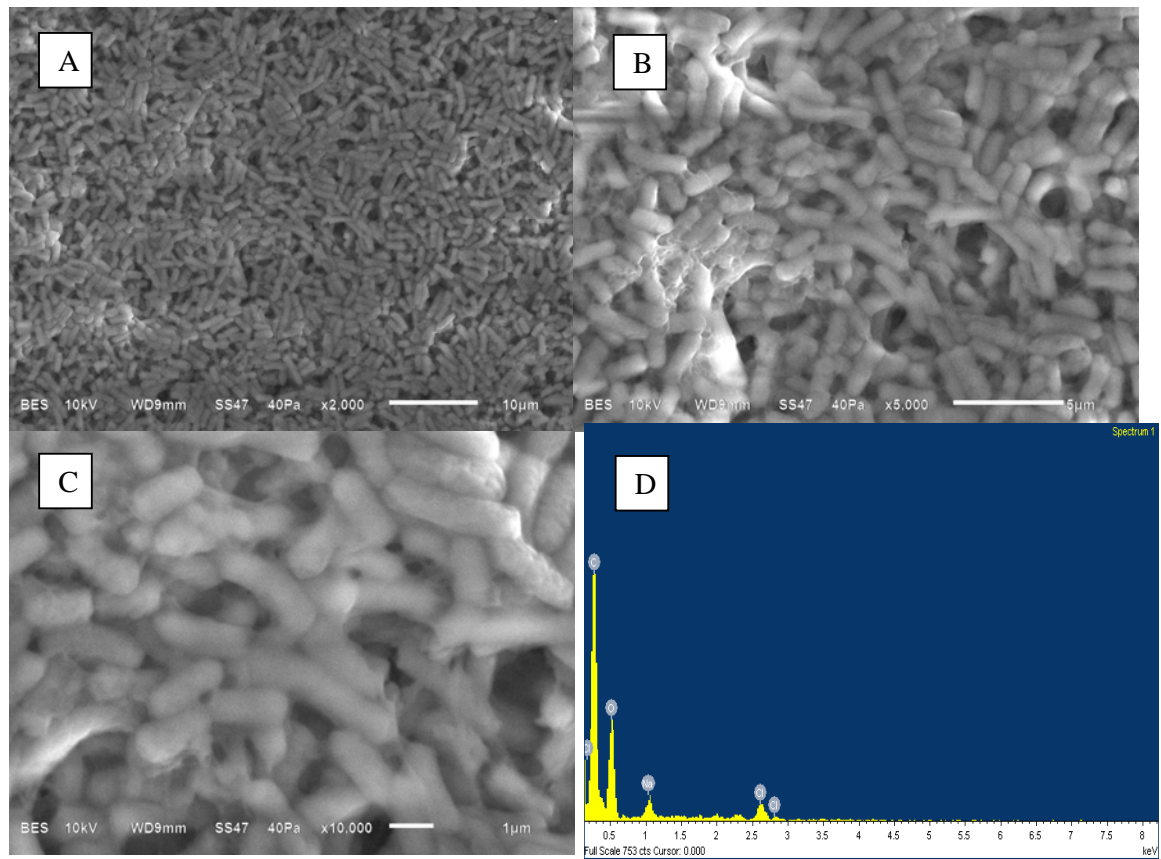


Element	Weight%	Atomic%
C K	38.95	46.22
O K	59.54	53.04
Na K	0.65	0.40
Cl K	0.86	0.35
Totals	100.00	

FIGURA 3-14 MICROGRAFÍAS DE LA MEMBRANA MILLIPORE™ Y SU ANÁLISIS EDS

En la figura 3-15 se observa una serie de ampliaciones en los recuadros A, B y C de la cepa 70 en donde se muestra la morfología típica de *Bacillus*, esta muestra no se ha sometido aun a la inmersión en el FFS solo se ha filtrado a través de la

membrana Millipore™, se ocupo bajo vacio y bajo kilovoltaje para poder analizar el material biológico sin destruirlo por la misma técnica, para obtener la señal se ocupan los electrones retrodispersados. Y en el recuadro D se muestra el análisis EDS de la muestra en donde predomina el C y el O en la muestra esto debido a la naturaleza orgánica de la muestra, en la tabla marcada con la letra E se observan los porcentajes de los elementos presentes en la muestra. Se observa una cantidad de cloro y sodio perteneciente a los restos del medio de cultivo.

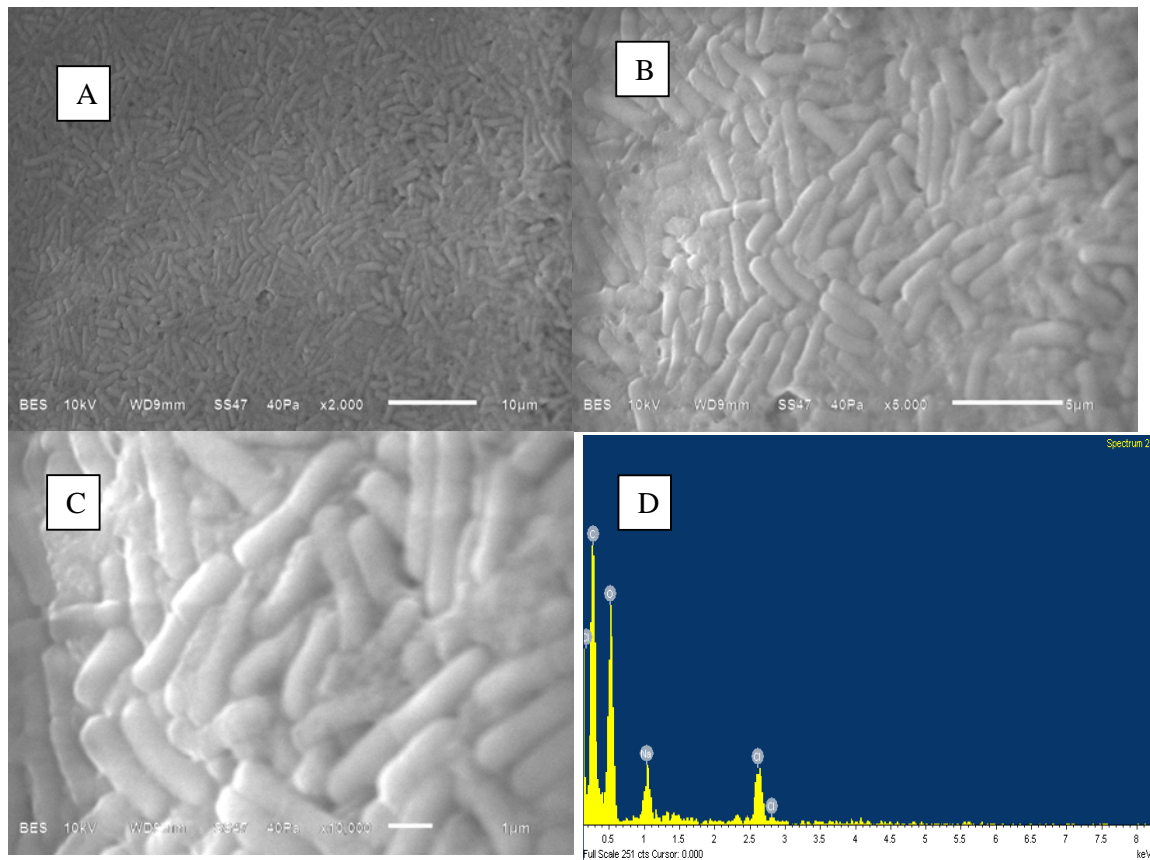


Element	Weight%	Atomic%
C K	10.97	15.52
O K	68.30	72.56
Na K	7.65	5.65
Cl K	13.08	6.27
Totals	100.00	

E

FIGURA 3-15 MICROGRAFÍAS DE LA CEPA 70 CON SU ANÁLISIS EDS

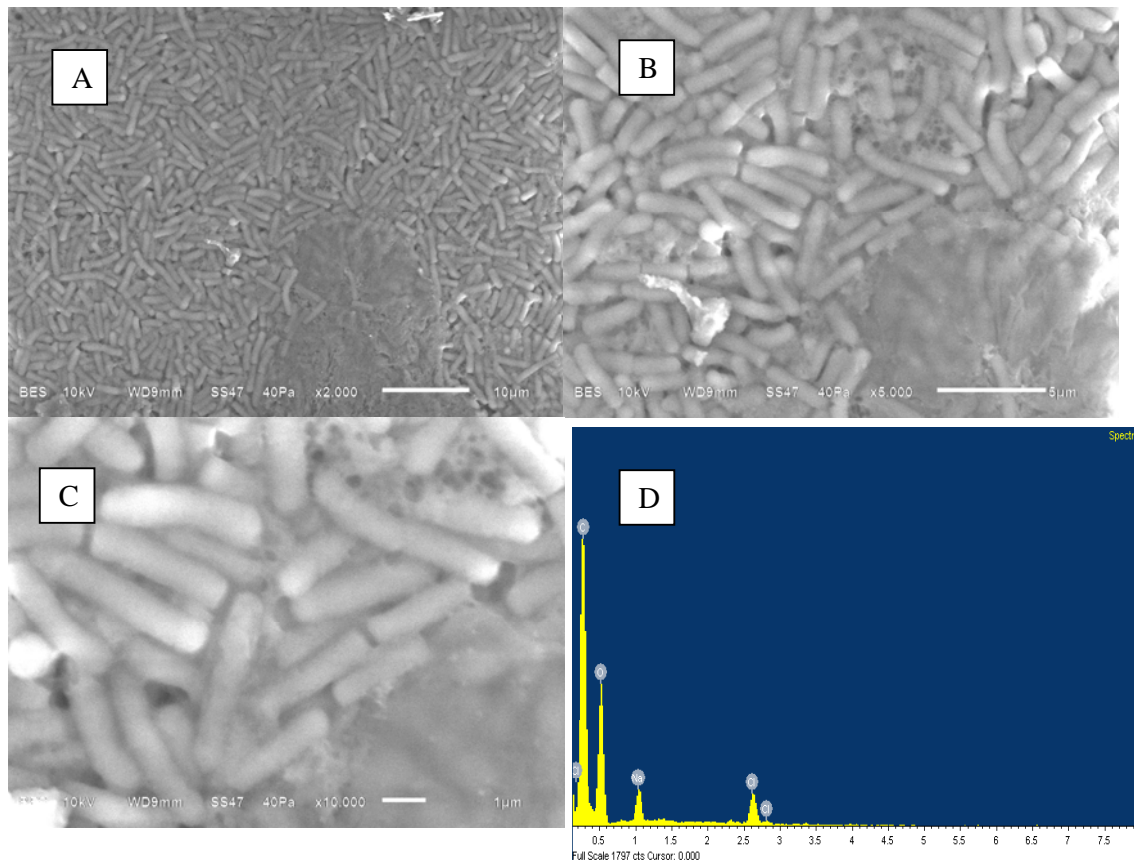
En la figura 3-16 se observa una serie de ampliaciones en los recuadros A, B y C de la cepa 83 en donde se muestra la morfología típica de *Bacillus*, esta muestra no se ha sometido aun a la inmersión en el FFS solo se ha filtrado a través de la membrana Millipore™, se ocupo bajo vacio y bajo kilovoltaje para poder analizar el material biológico sin destruirlo por la misma técnica, para obtener la señal se ocupan los electrones retrodispersados. Y en el recuadro D se muestra el análisis EDS de la muestra en donde predomina el C y el O en la muestra esto debido a la naturaleza orgánica de la muestra, en la tabla marcada con la letra E se observan los porcentajes de los elementos presentes en la muestra. Se observa una cantidad de cloro y sodio perteneciente a los restos del medio de cultivo.



Element	Weight%	Atomic%
C K	123.51	113.87
O K	-16.22	-11.23
Na K	-2.16	-1.04
Cl K	-5.14	-1.60
Totals	100.00	

FIGURA 3-16 MICROGRAFÍAS DE LA CEPA 83 Y SU ANÁLISIS EDS

En la figura 3-17 se observa una serie de ampliaciones en los recuadros A, B y C de la cepa 85 en donde se muestra la morfología típica de *Bacillus*, esta muestra no se ha sometido aun a la inmersión en el FFS solo se ha filtrado a través de la membrana Millipore™, se ocupo bajo vacio y bajo kilovoltaje para poder analizar el material biológico sin destruirlo por la misma técnica, para obtener la señal se ocupan los electrones retrodispersados. Y en el recuadro D se muestra el análisis EDS de la muestra en donde predomina el C y el O en la muestra esto debido a la naturaleza orgánica de la muestra, en la tabla marcada con la letra E se observan los porcentajes de los elementos presentes en la muestra. Se observa una cantidad de cloro y sodio perteneciente a los restos del medio de cultivo.



Element	Weight%	Atomic%
C K	53.23	62.67
O K	37.04	32.74
Na K	3.26	2.01
Cl K	6.47	2.58
Totals	100.00	

FIGURA 3-17 MICROGRAFÍAS Y EDS DE LA CEPA 85

En la figura 3-18 se observa el material obtenido después de someter a las bacterias inactivas de la cepa 70 a una concentración de 1.5 FFS, en donde se aprecia un material con forma de conglomerados esféricos, el aglomerado no está uniformemente distribuido en la membrana Millipore™ la cual se observa en el fondo de la imagen A, el aglomerado tiene un ancho de unas 50  $\mu\text{m}$  y es tan largo que no cabe en esta amplificación. Esta resolución no permite identificar mayores características, sin embargo en el recuadro B se aprecian mejor estas formas esféricas similares a esponjas, se logran apreciar pequeños poros que probablemente se deben a las cavidades dejadas por los cuerpos de las bacterias, en la imagen marcada con la letra C se observa una magnificación de 2500x la cual permite distinguir ciertas estructuras aciculares que dan forma a los conglomerados esféricos los cuales van desde las 8 hasta las 2  $\mu\text{m}$  de diámetro en promedio, también se observan a mayor detalle los poros que probablemente dejaron los cuerpos del *Bacillus*. En el recuadro marcado con la letra d se observa una amplificación de 5000x lo cual permite apreciar con mayor detalle las estructuras aciculares que forman a las estructuras esféricas la cuales a su vez conforman a los aglomerados en esta micrografía se aprecia con mayor detalle las dimensiones de dichas esferas, en donde se determina que en promedio miden 10 a 8  $\mu\text{m}$  de diámetro, entre las esferas se observan unas estructuras que por su morfología y sus dimensiones probablemente sean *Bacillus* y los poros que se aprecian perforando a las esferas probablemente sean los espacios que ocupaban los cuerpos de los *Bacillus*, dichos poros tienen un diámetro 1  $\mu\text{m}$ . esta medida se corrobora en el recuadro marcado con la letra E en donde se observa un poro en la parte central de la micrografía y de igual forma se observa la estructura típica de la HAp conformada con estructuras aciculares y pequeñas hojuelas menores a 1  $\mu\text{m}$  de largo y sumamente delgadas.

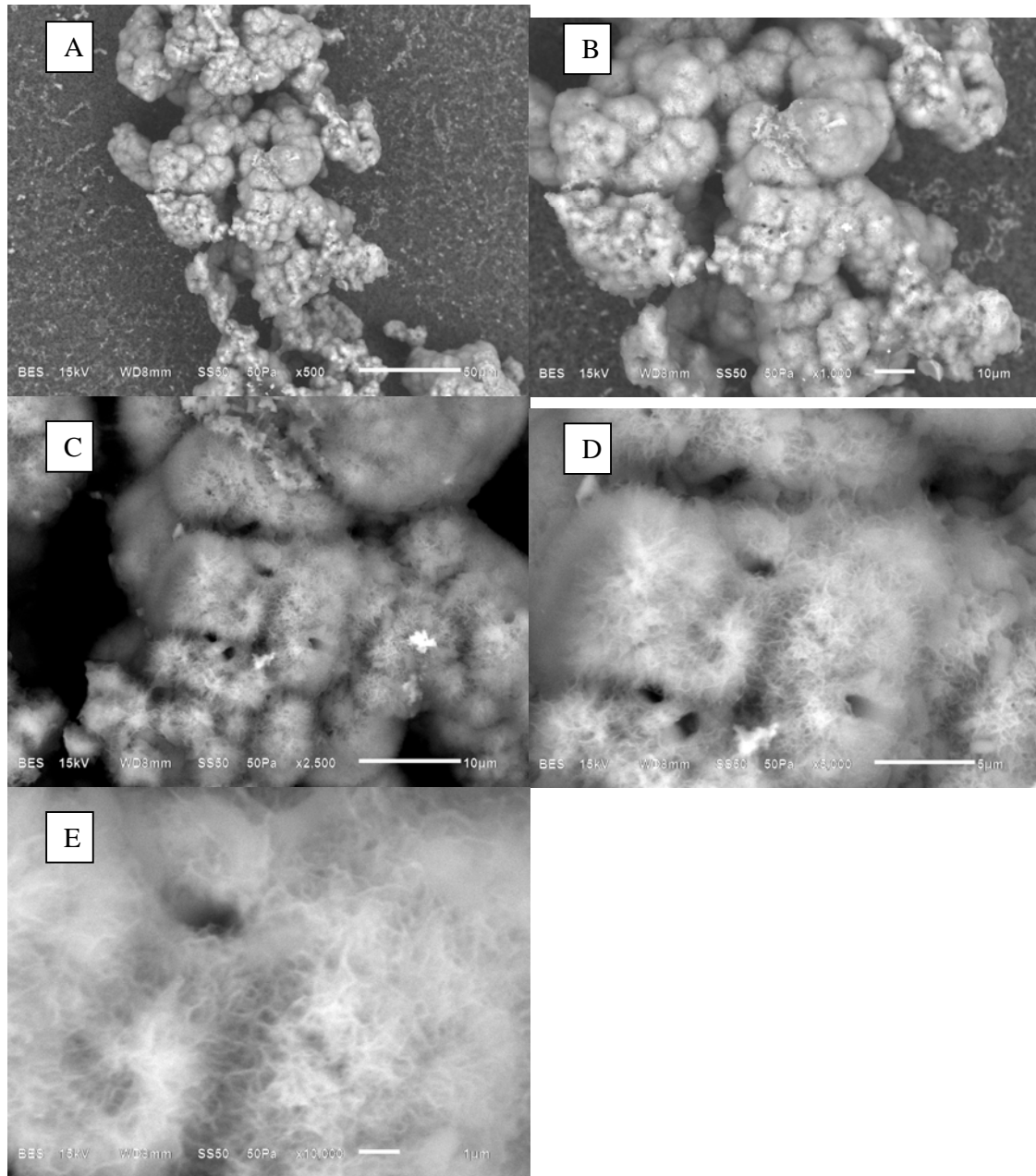


FIGURA 3-18 MICROGRAFÍAS DONDE SE MUESTRA EL MATERIAL OBTENIDO EN LA MEMBRANA DE LA CEPA 70

El material obtenido en la cepa 83 se observa en la figura 3-19 la cual muestra en el recuadro marcado con la letra A un aglomerado de partículas semiesféricas con más de 50  $\mu\text{m}$  de diámetro las cuales están compuestas a su vez por esferas más pequeñas del orden de las 5  $\mu\text{m}$  aproximadamente, se observa en el fondo de la imagen la membrana Millipore™ en la imagen marcada con la letra B se observa una mayor amplificación en la cual se aprecia que existen otras partículas pequeñas sobre los conglomerados los cuales a juzgar por la morfología y los precursores empleados se pueden identificar cristales de cloruro de sodio, en la imagen marcada con la letra C se observa una sección de la muestra anterior en donde se aprecian las estructuras semiesféricas con dimensiones que van de los 8 a 12  $\mu\text{m}$  de diámetro aproximadamente aunque se nota también mucho la contaminación del NaCl.

En la imagen marcada con la letra D se observan a mayor detalle las estructuras esféricas que constituyen a los aglomerados, las estructuras esféricas tienen un diámetro de 6 a 10  $\mu\text{m}$  en esta micrografía se observan estructuras aciculares que conforman a las formas esféricas, se observan nuevamente las formas cúbicas características de la morfología de NaCl y otras estructuras que parecen nuevos centros de nucleación de HAp. En la imagen marcada como E se observa una mayor amplificación la cual permite observar la forma de estructuras aciculares menores a 1mm de igual manera se constata la presencia d estructuras cristalinas cúbicas las cuales son seguramente de NaCl.

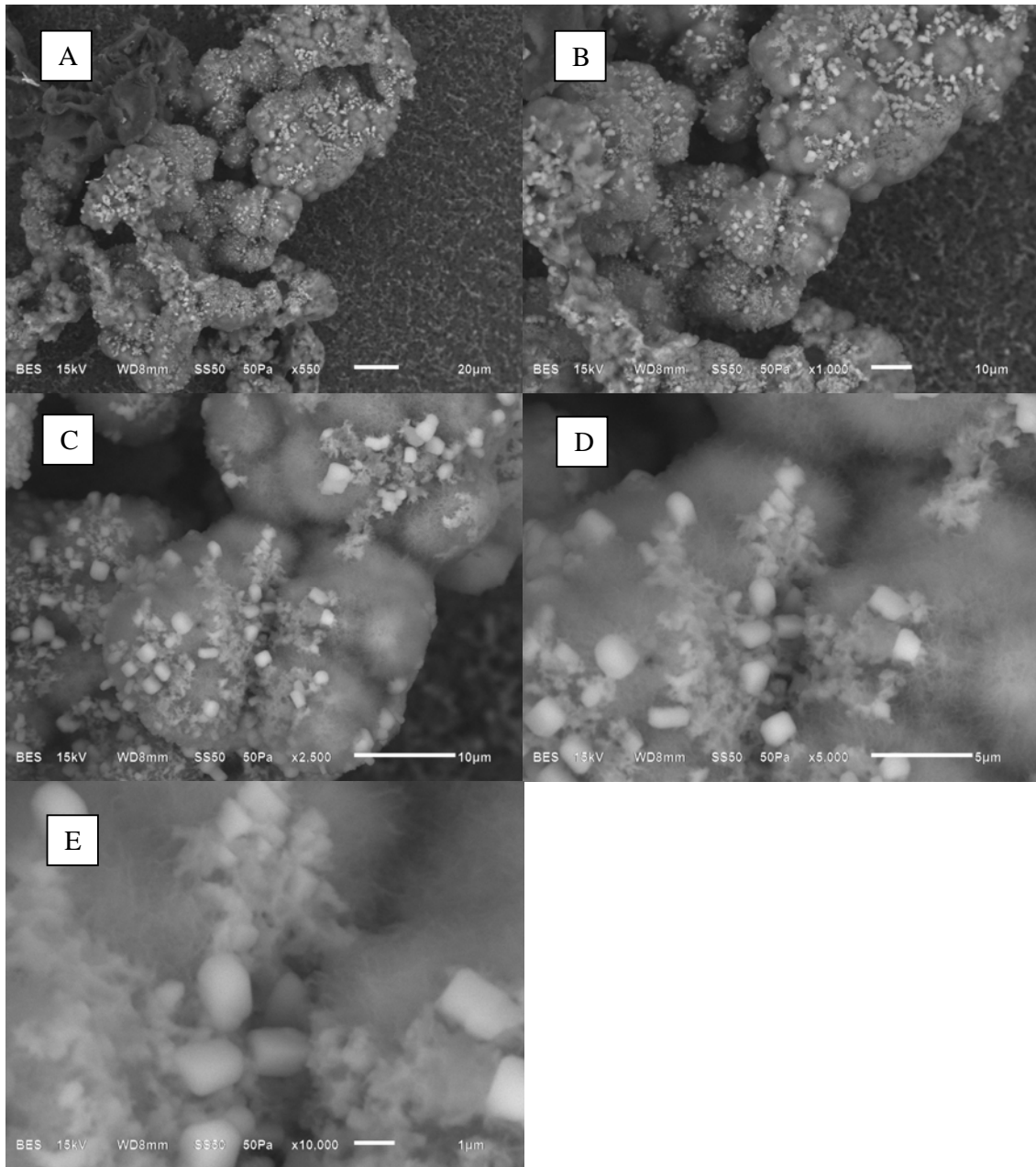


FIGURA 3-19 MICROGRAFÍAS DEL MATERIAL OBTENIDO SOBRE LA CEPA 83

En la siguiente figura 3-20 se observa el material obtenido sobre la membrana celular de la cepa 85, la micrografía A muestra un conglomerado de estructuras semiesféricas de apariencia densa, las cuales al igual que en los casos anteriores de las cepas 83 y 70 no están distribuidas homogéneamente sobre la superficie de la membrana Millipore™, el conglomerado tiene unas dimensiones aproximadas de 250 por 180  $\mu\text{m}$ , la micrografía B muestra una magnificación superior a la micrografía A en donde se aprecia con mayor detalle la morfología semiesférica del material que ha crecido, cada estructura semiesférica está compuesta por esferas más pequeñas; las estructuras semiesféricas tienen diferentes dimensiones que van de los 30 a 100  $\mu\text{m}$  de diámetro, sin embargo las esferas pequeñas que las conforman son más uniformes, las cuales tienen en promedio unas 10  $\mu\text{m}$  de diámetro.

En la micrografía C se observan estas pequeñas esferas que conforman a las estructuras semiesféricas, se observa que su superficie es porosa y están compuestas por diminutas hojuelas, en la micrografía D se observa una amplificación de las esferas en donde se muestra con mayor detalle la estructura de las hojuelas que las componen, son muy pequeñas la mayoría no rebasa 1  $\mu\text{m}$  de largo. La micrografía marcada como E, confirma que las dimensiones de las hojuelas no rebasan 1  $\mu\text{m}$  de largo incluso se puede observar que el espesor de las hojuelas es tan delgado que probablemente no rebase unas cuantas decenas de nanómetros.

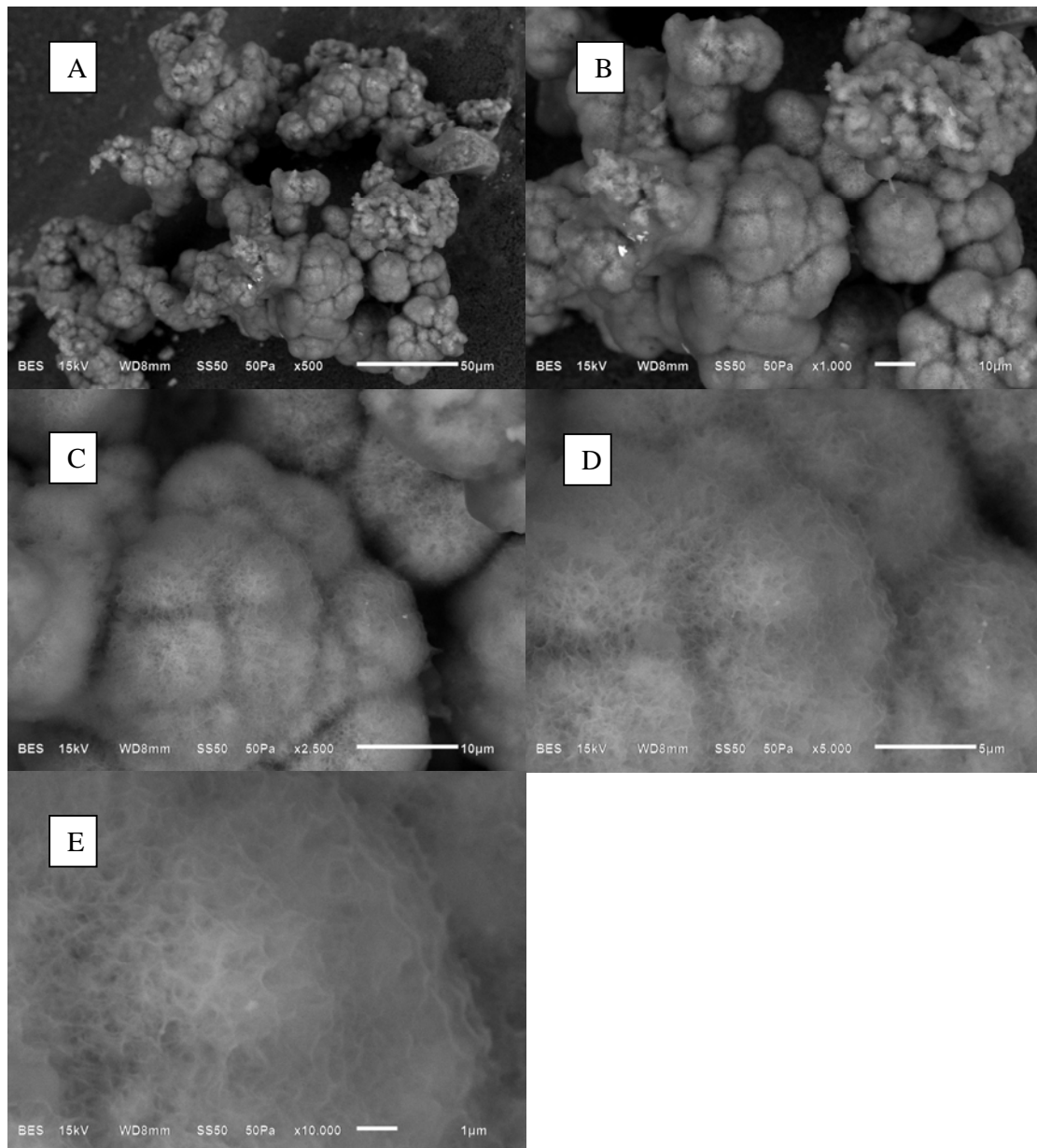
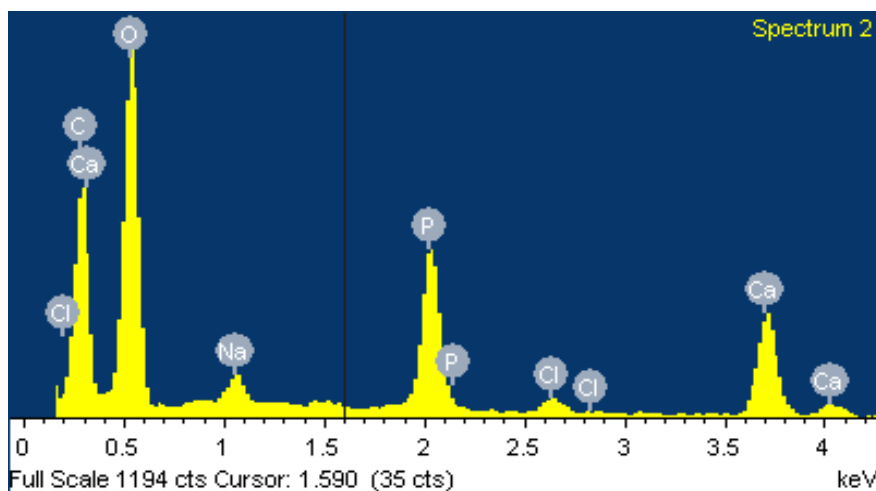


FIGURA 3-20 MICROGRAFÍAS DONDE SE MUESTRA EL MATERIAL OBTENIDO SOBRE LA CEPA 85

En la figura 3-21 se observa un clásico espectro obtenido por EDS del material que se obtiene al sumergir la membrana Millipore™ impregnada con *Bacillus* en 1.5 FFS, en el eje x se observa la escala correspondiente a los Kev, que tienen que ver con la energía característica de las rayos X de cada elemento por lo que se observa la presencia de  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^+$ ,  $\text{C}^+$ ,  $\text{O}^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{P}^+$  y se observa que se repiten en otras secciones de la grafica esto debido al orbital del cual fue emitido el rayo X. bajo la

gráfica se observa una tabla en donde se aprecian los porcentajes en que se encuentran estos elementos, se observa que predomina la presencia de material orgánico (C<sup>+</sup>, O<sup>-</sup>) debido a la proximidad de la membrana Millipore™ y la presencia de las bacterias, pero también se observa una buena señal de Ca<sup>+</sup> y P<sup>-</sup> que son los componentes principales de la HAp. En menor proporción se observa Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> los cuales indican la presencia de NaCl proveniente del mismo FFS.



Element	Weight%	Atomic%
C K	31.96	40.59
O K	56.72	54.09
Na K	1.42	0.95
P K	5.11	2.52
Cl K	0.53	0.23
Ca K	4.26	1.62
Totals	100.00	

FIGURA 3-21 ESPECTRO EDS DE HAp

En la figura 3-22 se muestra a la cepa 309 con morfología típica de *Bacillus* en la figura 3-23 se observa un acercamiento a los cristales de HAp obtenidos después de 3 días de crecimiento en 1.5 FFS sobre la cepa 39, en el que se observan los orificios dejados por las células que han servido de iniciadoras para la nucleación de cristales de fosfato de calcio. Esta clase de cristales fueron obtenidos con una energía de 20KV y un aumento de 10,000 veces, el diámetro promedio de esta partícula corresponde a 15  $\mu\text{m}$ . La matriz corrugada corresponde a la forma cristalina de hidroxiapatita en tanto que las formas geométricas regulares corresponden a

deposiciones cristalinas de cloruro de sodio. A. Células frescas en la membrana de nitrocelulosa. B y C dos tipos de acercamiento a los cristales de hidroxiapatita.

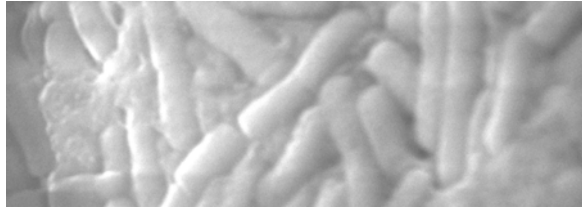


Figura 3-22. Micrografía de la cepa 39

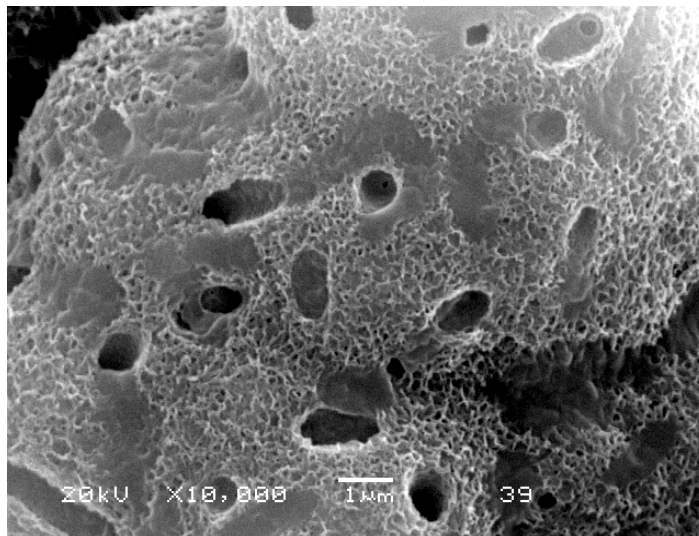
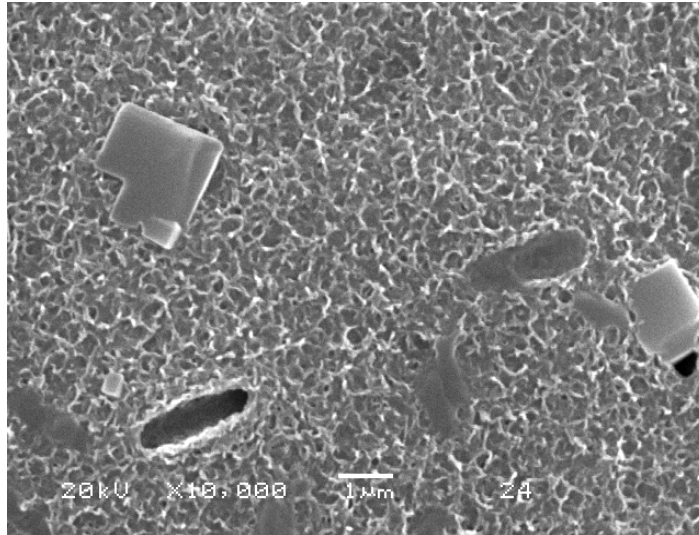
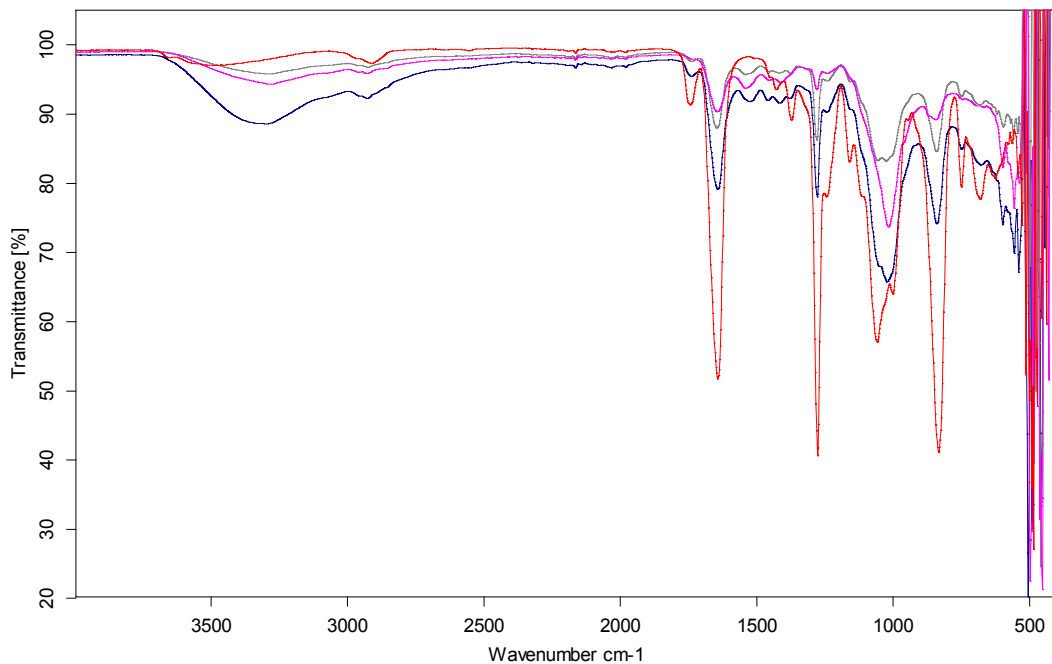


Figura 3-23. Micrografías del material obtenido sobre la cepa 39

La figura 3-24 muestra el espectrograma obtenido del análisis de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier, en donde se observan 4 espectros uno corresponde a la membrana Millipore™ (rojo), a la cepa 70 (rosa), la cepa 83 (gris) y por último la cepa 85 (azul marino). El OH que se ubica en la banda de absorción que va de los 3600 a 3200  $\text{cm}^{-1}$ , en 2830 a 2950  $\text{cm}^{-1}$  se observan unas pequeñas bandas correspondientes a  $\nu\text{CH}$ , así como los enlaces N-O se destacan por una banda bien definida y aguda característica de la zona de los 1650 a 1632  $\text{cm}^{-1}$ , en 1381  $\text{cm}^{-1}$  se distingue una pequeña banda característica de  $\delta\text{CH}$ , 1283  $\text{cm}^{-1}$  (indicativa de enlaces N-O y C-O), 1069  $\text{cm}^{-1}$  (ídem C-O) y 844  $\text{cm}^{-1}$  (N-O) así como en la banda cercana a los 850-800  $\text{cm}^{-1}$  se encuentra el enlace de C-O-C, en las bandas siguientes destacan los grupos fosfato, como es el caso de la banda de 1045  $\text{cm}^{-1}$  es el  $\nu_3\text{PO}_4$ , en la banda de 572  $\text{cm}^{-1}$  es para  $\nu_4\text{PO}_4$  también en la banda de los 458 a 430  $\text{cm}^{-1}$  se puede observar la presencia de  $\nu_2\text{PO}_4$ , todas estas bandas son características de los componentes principales de los enlaces de una apatita y la nitrocelulosa.



C:\CUV\RICARDO\NITROCELULOSA.1	NITROCELULOSA	FIBERS	20/07/2009
C:\CUV\RICARDO\NITROCELULOSA HAP.0	NITROCELULOSA HAP	FIBERS	20/07/2009
C:\CUV\RICARDO\NITROCELULOSA HAP 83 BT.0	NITROCELULOSA HAP 83 BT	FIBERS	20/07/2009
C:\CUV\RICARDO\NITROCELULOSA HAP 85 BT.0	NITROCELULOSA HAP 85 BT	FIBERS	20/07/2009

Page 1/1

FIGURA 3-24 ESPECTROGRAMA INFRARROJO DE LAS MUESTRAS DE HAP Y LA MEMBRANA MILLIPORE™

En la siguiente figura 3-25 se muestra el patrón de difracción del control, es decir la membrana Millipore™ sin haber sido impregnada con *Bacillus thuringiensis* y sin ser sometida a inmersión de FFS, se observa que en el punto de  $22^\circ\theta$  hay un máximo de difracción así como para el  $24^\circ\theta$ , lo que indica que es una estructura prácticamente amorfa con cierto arreglo cristalino.

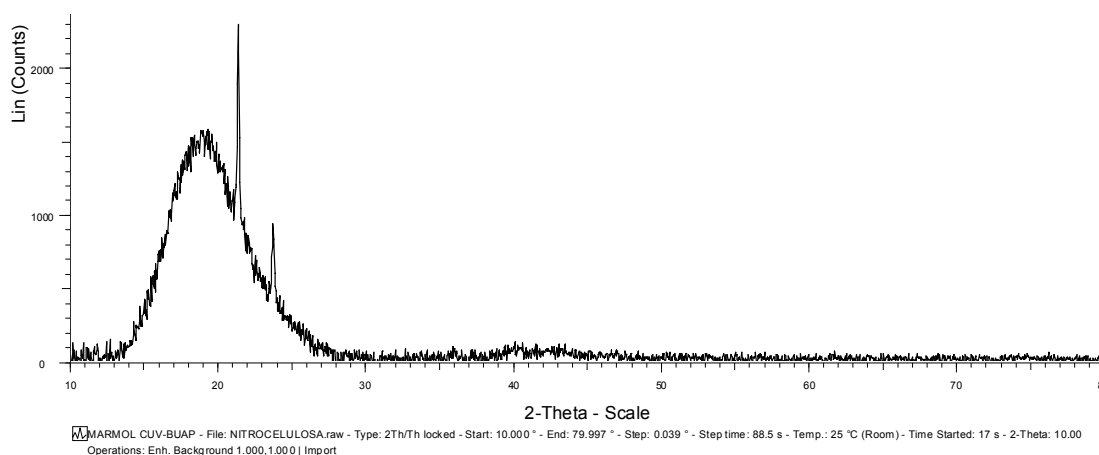


FIGURA 3-25 DIFRACTOGRAMA DE LA MEMBRANA MILLIPORE™

En la figura 3-26 se observa el patrón de difracción correspondiente a la cepa 70, claramente se aprecia que el desarrollo del material sobre la membrana Millipore™ provocado por la presencia de *Bacillus thuringiensis* ha propiciado el crecimiento de cristales de HAp según se observa en el estándar del patrón de difracción de la HAp (en rojo) que coincide con el difractograma obtenido en el laboratorio (en negro), se observa el background de la membrana Millipore™ que se explica en la figura anterior, pero además se observa la presencia de nuevos picos de difracción en los ángulos  $26.5^\circ$  en  $2\theta$ ,  $31.8^\circ$  en  $2\theta$ ,  $32.1^\circ$  en  $2\theta$ ,  $33^\circ$  en  $2\theta$ ,  $34.1^\circ$  en  $2\theta$  y  $49.3^\circ$  en  $2\theta$ , principalmente, lo que nos indica la presencia de un fosfato de calcio en fase cristalina de HAp, cabe mencionar que el estudio se hizo a 10 días después de estar sometido en inmersión a 1.5 FFS.

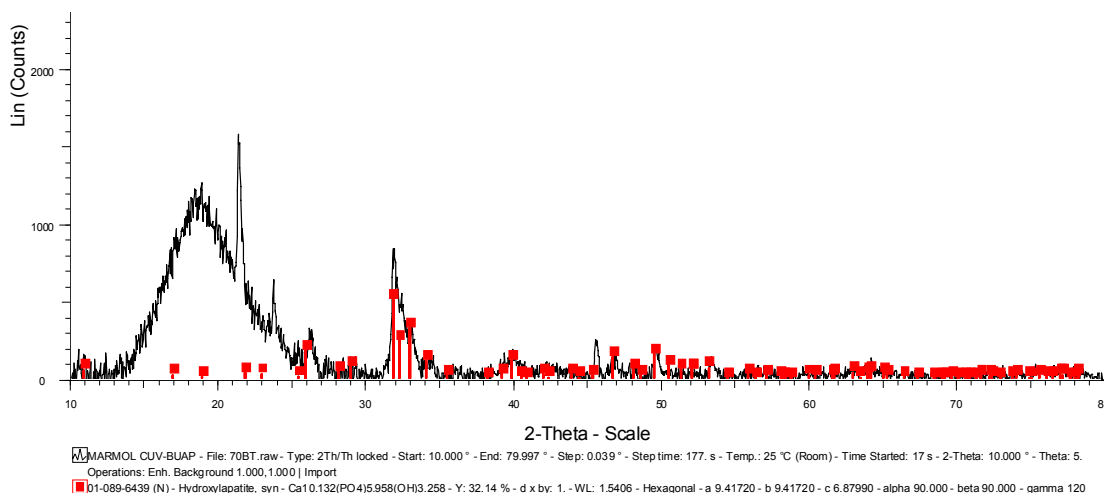


FIGURA 3-26 DIFRACTOGRAMA DEL MATERIAL OBTENIDO EN LA CEPA 70

En la figura 3-27 se observa el patrón de difracción correspondiente a la cepa 83 después de haber sido sometida a inmersión a 1.5 FFS por 10 días en donde nuevamente se observa la presencia de la membrana Millipore™ como se explica en la figura 3-26, también se observa en rojo el patrón de difracción que corresponde a la HAp y en negro el difractograma obtenido en el laboratorio, en donde se puede apreciar por comparación que existe la presencia de HAp esto lo observamos por la coincidencia en los ángulos para 2θ: 26.5°, 31.8°, 32.1°, 33°, 34.1° y 49.3°

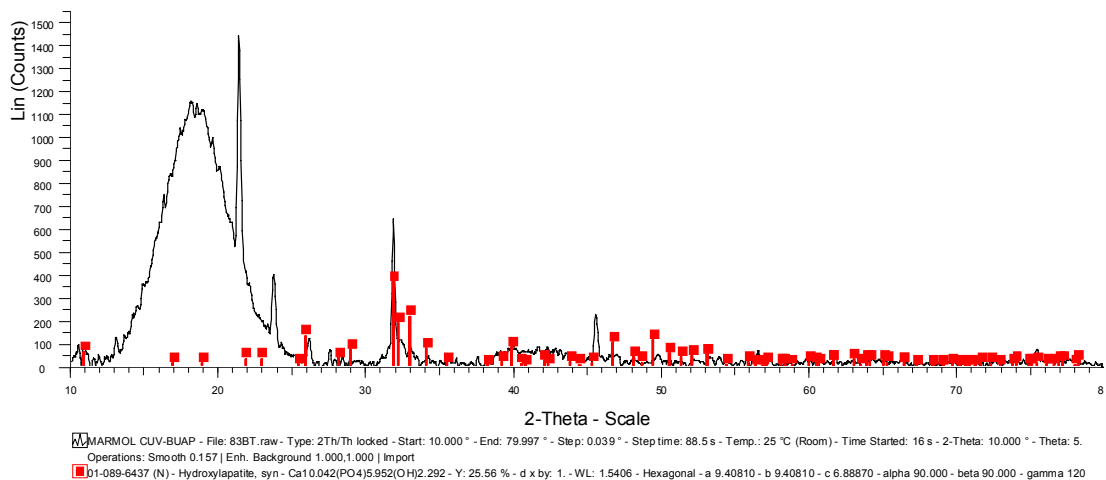


FIGURA 3-27 DIFRACTOGRAMA DEL MATERIAL OBTENIDO EN LA CEPA 83

Finalmente en la figura 3-28 se observa el patrón de difracción correspondiente a la cepa 85 después de haber sido sometida a inmersión a 1.5 FFS por 10 días en donde nuevamente se observa la presencia de la membrana Millipore™ como se explica en la figura 3-26, se observa en rojo el patrón de difracción que corresponde a la HAp y en negro el patrón de difracción obtenido en el laboratorio, en donde se puede apreciar por comparación que existe la presencia de HAp esto lo observamos por la coincidencia en los ángulos para  $2\theta$ :  $26.5^\circ$ ,  $31.8^\circ$ ,  $32.1^\circ$ ,  $33^\circ$ ,  $34.1^\circ$  y  $49.3^\circ$ , aunque cabe destacar que el material obtenido fue mayor lo cual se observa en el tamaño de los máximos de difracción que tuvieron mayores cuentas respecto a los difractogramas anteriores.

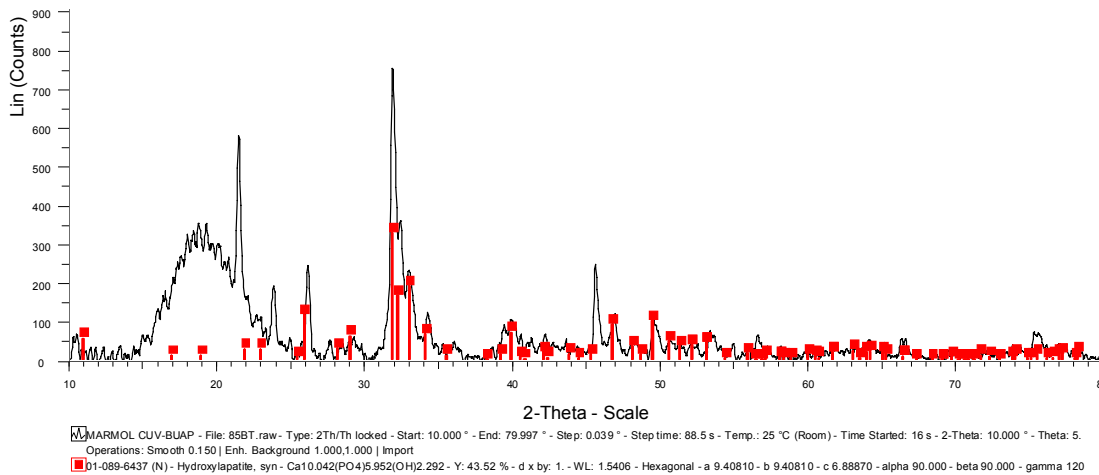


FIGURA 3-28 DIFRACTOGRAMA DEL MATERIAL OBTENIDO EN LA CEPA 83

### 3.6 DISCUSIÓN

Cualquier fuente química o biológica que se use con fines de investigación para uso en seres vivos, deberá mostrar atributos tales que permitan asegurar su inocuidad celular o fisiológica y permitir determinar que cualquier efecto adicional se deba a un atributo especial que se esté queriendo evaluar. Tal premisa es aplicable al caso de nuestra investigación en la que se pretendía hacer cristales de hidroxiapatita sobre las membranas celulares de la bacteria *B. thuringiensis*, cuyos productos elaborados podrían tener quizás una utilidad futura en humanos.

Un elemento necesario de considerar es primero la certeza inequívoca de usar el microorganismo que se desea incorporar en el diseño del trabajo. De tal forma que se genere la confianza de calidad en el material producido y por ende si hubiera la necesidad de rediseñarlo hacerlo en base a lineamientos de alta estrictez ética. Nosotros propusimos usar *B. thuringiensis* como elemento base de la investigación, y sus membranas habilitadas con grupos funcionales naturales diversos, como fuente de investigación innovadora. Al ser un microorganismo del ambiente natural e inocuo, de acuerdo a los criterios de inocuidad-por la especificidad de las toxinas *cry*, era necesario certificar que no se tratase de un organismo filogenéticamente relacionado de difícil discriminación; estos organismos parentales podrían ser tan dañinos como *B. cereus* o *B. anthracis* y había la necesidad de hacer muy clara la diferencia de sus clados. En el laboratorio de Bioquímica y Genética Microbiana del ICUAP se había estado estudiando el locus *ihr* como un marcador de tipo clonal, sin embargo, poco a poco con el incremento del número de cepas y con un muestreo aleatorio, se ha determinado que ese rasgo genético es diverso y que la complejidad de ese marcador no lo hace apropiado como marcador clonal, ni como un marcador de diversidad. Más bien parece funcionalmente interesante para la biología de las bacterias esporuladas del grupo "*cereus*", por supuestos eventos de recombinación vistos por las huellas dejadas en las secuencias de *ihr* de varias cepas analizadas por PCR.

Ante la necesidad de contar con elementos genéticos que permitan establecer diferencias y distinguir bacterias filogenéticamente muy relacionadas en el grupo *cereus*, se han propuesto un grupo marcadores moleculares para el análisis MLST. Esta estrategia de estudio se aplicó a un grupo de cepas de *B. thuringiensis* y a un

grupo de cepas control de parentales *B. cereus*, en un experimento a ciegas para diferenciar entre parentales y para tener la certeza de asegurar la pertenencia de los aislados a la especie *B. thuringiensis*. Esta estrategia resultó bastante apropiada a las pretensiones del proyecto, pues la selección previa en base a propiedades fisiológicas, como formación de cristales, tiempo de esporulación y presencia de amplificadores con los marcadores moleculares *ihr* y *its-rDNA* 16S, llevó a seleccionar 80 aislados del cepario de BGM-ICUAP, para analizar 19 aislados con 5 secuencias de genes en reacciones de PCR. De estas sólo el 34.8% (68/195) fueron positivas a la amplificación, posiblemente por diferencias en las secuencias blanco de complementación con los iniciadores de los genes. Esta reducida proporción de cepas positivas a la reacción tipo PCR, pone de manifiesto una diversidad genética importante de bacterias, respecto al esquema de estudio por MLST previamente propuesto. Además, sólo resuelve incluyentemente a un grupo de bacterias cercano al grupo “*cereus*” y asocia por exclusión a un grupo mayoritario que es diferente al grupo definido por MLST. Las reacciones moleculares de tipo MLST en los aislados con mayores probabilidades de ser *B. thuringiensis* y con los mismos criterios para diferenciar a aquellos que mostraban rasgos diferentes, mostró ser de gran valor discriminatorio al estudiar la secuencia de nucleótidos de cada uno de los marcadores. La prueba molecular basada en MLST asignó claramente a los aislados 1, 83 y 85 en el grupo de *B. thuringiensis* con una confiabilidad basada en *glpF* del 99%, el aislado 11 a la especie *B. cereus* y dos aislados restantes a especies distintas del grupo *cereus*, *B. halodurans* aislado 64 y a *B. weihenstephanensis* el aislado 70 con una confiabilidad del 90%. Esta estrategia de estudio permite hacer una clara asignación de las bacterias esporuladas de nuestra colección a la especie *B. thuringiensis*, tales bacterias muestran típicas pruebas morfológicas, bioquímicas y genéticas de amplificación por PCR para los genes *glpF*, *ilvD1*, *ilvD2*, *pta* y *pur*, con una confiabilidad del 99% respecto a los miembros conocidos del grupo *cereus* secuenciados hasta el momento, y por ende es una garantía del uso de esta bacteria inocua al ser humano.

De los organismos analizados se pueden apreciar los siguientes aspectos benéficos o al menos de poca importancia nociva para el humano que podrían ser considerados para un desarrollo posterior. Para la cepa 70, la secuencia obtenida posee máxima identidad con *Brevibacillus brevis* NBRC 100599 y *Bacillus halodurans*

C-125 respectivamente, ambos microorganismos son de importancia industrial para el ser humano para producir antibióticos tales como gramicidina y tirocidina (Abedon 1998). Aunque no es *B. thuringiensis*, esta bacteria se consideró para una prueba de ensayo biomimético y observar como nucleaban los cristales de hidroxiapatita. La bacteria *Brevibacillus brevis* ha sido relacionado pocas veces con enfermedades en humanos lo cual tiene un buen significado de inocuidad. Para la cepa 83, la secuencia obtenida para los genes *ilvdc1* y *ilvdc2* tienen máxima identidad con *B. thuringiensis kurstaki*, la misma cepa para los genes *glpfc1* y *glpfc2* tienen máxima identidad con *B. thuringiensis kurstaki* T03a001, por lo que es una buena cepa candidata a ser sometida al ensayo biomimético. Para la cepa 85 la secuencia obtenida para los genes *glpfc1* y *glpfc2* tienen una máxima identidad con *B. thuringiensis kurstaki* T03a001, por lo que es una buena cepa candidata a ser sometida al ensayo biomimético dada su inocuidad en humano.

El siguiente aspecto del trabajo que se abordó en esta tesis fue la utilización de las células bacterianas para hacer crecer cristales de hidroxiapatita, en un soporte que permitiera cristalizar y nuclear la sal de fosfato de calcio y caracterizar su estructura molecular. Como ya se tenía la experiencia del desarrollo de cristales de hidroxiapatita en membranas de quitosán con plasma fisiológico salino en una concentración 1X, se evaluó si diversas concentraciones de sales pudieran modificar la nucleación apropiada para la hidroxiapatita como consecuencia de los grupos funcionales de las cubiertas celulares de la bacteria. Inicialmente se usaron las células vegetativas vivas, pero se observó una fuerte lisis celular de las bacterias que se habían depositado en la membrana de filtración donde estaban concentradas las bacterias. En estas bacterias se ha demostrado la presencia de enzimas líticas que pueden realizar la autólisis como mecanismo de desarrollo celular o como actividad para la maduración de las células a esporas. El problema no era en sí la lisis sino la consistencia inapropiada del material que llevaría a la pérdida de cristales de hidroxiapatita por la baja deposición, la consistencia laxa del material y una excesiva fuerza de centrifugación que podría llevar a la destrucción de las formas cristalinas de hidroxiapatita. Estas razones nos llevaron a probar si las células en un estado fijo del metabolismo serían útiles para analizar el proceso de cristalización. La estrategia fue

fijar a las células en etanol al 70% con lo cual se inactivarían a las células sin hacer cambios más drásticos en la composición celular, es muy probable que las células se alteren un poco por la extracción de moléculas orgánicas solubles en la fase alcohólica, que después se retiraría, para resuspender las células en medio acuoso que permitiera la hidratación y el restablecimiento de los componentes celulares hidrofílicos expuestos al medio exterior. Con este acondicionamiento celular ya no se observó la lisis celular, lo que significa que en las células se detuvieron las actividades enzimáticas líticas y se obtuvo un soporte estable en composición y arreglo sobre la superficie de la membrana que sostenía a las células que descansaban sobre el filtro de nitrocelulosa, aunque no se puede asegurar que la estructura superficial sea exactamente la misma que la de una célula viva en constante reproducción.

La cristalización de la hidroxiapatita se siguió por periodos de tiempo de 24, 48, 72, 120 y 168 hrs con plasma fisiológico salino a las concentraciones 1X, 1.5X y 1.75X y temperatura fisiológica. Sin embargo, se terminó trabajando solo con 1.5 FFS debido a que la solución de 1.75 FFS se precipitaba muy rápido y no crecía material sobre las membranas celulares de las bacterias, lo que la descartaba para este estudio en donde se están usando los grupos funcionales presentes en la membrana celular de *Bacillus* como centros de nucleación de hidroxiapatita.

Los resultados de obtención de cristales fueron claros en el sentido de que la rapidez de cristalización dependía de una mayor concentración del plasma, aunque también aparecieron formas cristalinas de fosfato de calcio que estaban contaminadas con cristales regulares propios de cloruro de sodio. En base a estas observaciones se decidió usar la concentración de 1.5X del plasma porque fue la condición que mejor permitió la cristalización con baja contaminación de otros cristales.

El uso de las cepas seleccionadas para el ensayo biomimético produjo los resultados de microscopia de fuerza atómica en donde se observa en las tres cepas que la morfología corresponde a *Bacillus*, se tiene la certeza de que la cepa 83 y 85 son *B. thuringiensis kurstaki* y con respecto a la 70 es muy probable que se trate de *Bacillus halodurans* C-125. Es probable que esa diferencia de especie se note en la membrana pues para las cepas de *B. thuringiensis kurstaki*, se observó una mayor

rugosidad en su membrana celular según se puede observar en los análisis de rugosidad de las micrográficas de fuerza atómica correspondientes. Sin embargo, esta hipótesis no es concluyente, aunque podría explicar porque es mayor formación de hidroxiapatita sobre las cepas 83 y 85 con respecto a la 70.

El análisis de microscopía de barrido mostró que las membranas que estaban recubiertas con las células tratadas con etanol al 70% mantenían la estructura celular característica de los bacilos, tampoco se observó incremento de la viscosidad lo que indicó que el DNA permaneció confinado dentro de la célula y que el posterior crecimiento de cristales se debió a la nucleación de sales sobre la superficie celular. Los cristales observados en el acumulo celular fueron mayores conforme se hizo una incubación más prolongada, esos cristales adquirieron un tamaño tal que llegaron a observarse a simple vista al cabo de 168 hrs. Los cristales no quedaron fuertemente fijados a la membrana de filtración y se desprendieron con facilidad, del poco material que se retuvo en la membrana se hizo la mayoría de los análisis instrumentales que demostraron la cristalización efectiva de hidroxiapatita.

Por otra parte en las micrográficas obtenidas por microscopía electrónica de barrido, el material obtenido sobre la superficie de la membrana celular de los *Bacillus* es muy similar en todos los casos, es decir son pequeñas estructuras aciculares que forman diminutas estructuras esféricas, salvo que en la cepa 83, que existe una mayor contaminación por cristales de NaCl, esto debido al poco enjuague que se les da a las muestras para evitar el desprendimiento de las bacterias sobre las superficie de la membrana Millipore™, cabe mencionar que la mayoría de las bacterias se desprende de esta superficie y termina flotando en el FFS, sin embargo este punto no es del todo desfavorable pues ayuda a comprobar que solo en donde los *Bacillus* permanecieron unidos a la membrana Millipore™ ocurrió la nucleación de hidroxiapatita, y no en la superficie de la membrana Millipore™, lo que comprueba que la HAp solo nuclea sobre la membrana celular de los *Bacillus* debido a los grupos funcionales de la membrana celular, los cuales no están presentes en la nitrocelulosa de la membrana Millipore™. Se determinó que el tamaño de los cristales es del orden de las 10mm en promedio para todos los casos, dichos cristales tienen una morfología esférica y se hallan formando conglomerados más grandes que crecen con formas diversas pero predominan las estructuras semiesféricas de diferentes

dimensiones que van de los 50 hasta los 250 mm aproximadamente, como parte complementaria de este análisis de microscopia se realizó el análisis EDS al material que creció sobre *Bacillus*, dicho análisis indica la presencia de calcio y fósforo, los cuales son los componentes principales de la hidroxiapatita, también se detecta la presencia de carbono y oxígeno, los cuales se pueden explicar por el origen biológico de las bacterias y por la naturaleza orgánica de la membrana Millipore™, se observa que la relación Ca/P es de 1.20 lo cual es muy cercano a la relación teórica de Ca/P que es de 1.67

Como se observa también en el análisis de FTIR se encuentran presentes todos los enlaces y grupos funcionales de la nitrocelulosa (membrana Millipore™) y de una apatita, la cual sabemos es hidroxiapatita debido al análisis DRX que se discute posteriormente, es importante destacar que en el espectrograma infrarrojo el espectro en rojo que pertenece a la membrana Millipore™ solamente decrece su señal cuando se compara con los espectros de las cepas 70, 83 y 85 debido a que el material cristalino que crece sobre la membrana impidiendo que se detecte por completo la señal proveniente de la nitrocelulosa y a su vez aumenta la señal del fósforo que se observa principalmente en la banda de los  $1045\text{cm}^{-1}$  y  $572\text{cm}^{-1}$  siendo los más característicos de la presencia de este grupo funcional.

Por último el análisis de Difracción de Rayos X, muestra el patrón de difracción perteneciente a la membrana Millipore™ (figura 3-25) y posterior a este patrón se muestran los difractogramas obtenidos al analizar el material obtenido sobre las cepas 70, 83 y 85, estas últimas sumadas al difractograma de la membrana Millipore™ y comparadas contra la base de datos del patrón de difracción de hidroxiapatita de calcio, confirma concluyentemente que la fase mineral del material obtenido después de la inmersión por 10 días en 1.5 FFS es hidroxiapatita, según se puede observar en la coincidencia de los máximos de difracción de los ángulos para  $2\theta$   $26.5^\circ$ ,  $31.8^\circ$ ,  $32.1^\circ$ ,  $33^\circ$ ,  $34.1^\circ$  y  $49.3^\circ$

Las células que quedaron embebidas en la matriz de hidroxiapatita dejaron la huella su localización espacial ya que la metodología de preparación instrumental desintegró a las células y sólo se pudieron observar las estructuras cristalinas resistentes al vacío. Esas estructuras cristalizadas fueron más abundantes en las cepas 83 y 85 de *B. thuringiensis* y menos abundantes para la cepa 70. Como datos importantes de la cristalización las cepas que mejor sirvieron como centros de cristalización fueron la 83 y 85, el tiempo de generación de cristales valorable por microscopía de barrido fue de 72 hrs el tiempo de generación de cristales valorable por FTIR fue 240 hrs. El tamaño de los cristales valorables fue de 15 micras, la abundancia de cristales detectables a nivel macro fue de 5/mm<sup>2</sup> en promedio.

### 3.7 CONCLUSIONES

La caracterización fenotípica en la cual se utilizó microscopía óptica, microscopía de fuerza atómica y electrónica de barrido, demuestran que el microorganismo observado posee la morfología típica de *Bacillus*; por otra parte la caracterización genotípica se hizo por pruebas de PCR, secuenciación y análisis BLAST, lo cual no deja lugar a dudas de que los microorganismos utilizados para crecer cristales de Hidroxiapatita de calcio son *Bacillus thuringiensis*, cepas 83 y 85, la cepa 70 se trata de *Bacillus halodurans*

El método biomimético demuestra ser un método eficiente para lograr la síntesis de HAp sobre la membrana celular de *B. thuringiensis*, además de ser un ensayo relativamente sencillo de implementar debido a que no se requieren equipos muy sofisticados, también es un ensayo que no requiere de mucha energía debido a que se necesitan solo 36°C.

Al tercer día en una solución de 1.5FFS es posible observar el material formado sobre la superficie de la membrana Millipore™ impregnada por *Bacillus*, el material obtenido gracias a los grupos funcionales presentes en la membrana celular de *Bacillus* es de unas 10 μm en promedio y tienen una forma esférica.

Las pruebas para caracterizar el material obtenido sobre la membrana celular de *Bacillus* demuestran que la morfología de los cristales es similar en los tres casos del estudio, el material obtenido es Hidroxiapatita de Calcio. Esto se observó gracias a la microscopía electrónica de barrido, la espectroscopia de infrarrojos demostró que el fosfato se encuentra presente en el material que ha crecido sobre el *Bacillus*, y esto se comprueba finalmente en la prueba de Difracción de Rayos X en donde se confirma que. Una observación importante es que la membrana de *Bacillus thuringiensis* es capaz de nuclear más cristales de hidroxiapatita en comparación con *Bacillus halodurans* como se demuestra también en la difracción de Rayos X

### 3.8 REFERENCIAS

- Abedon, Stephen.(1998) "Bacteria Binomials." 26 Apr. Ohio State University.
- Abraham GA, González MF, R. T (1998) LA CIENCIA Y LA INGENIERÍA DE LOS BIOMATERIALES, UN DESAFÍO INTERDISCIPLINARIO, in *CIENCIA HOY*, vol 9-49. Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina.
- Alberto G, Carlos E, Julio SR, Antonio LB (1999) Polímeros Biodegradables en medicina; Aplicaciones Biomédicas y aportaciones en procesos de regeneración tisular avanzados. *Plásticos Modernos* 511:60-70.
- ALCALDE-PÉREZ T (2004) Activos cosméticos de origen marino. *ÁMBITO FARMACÉUTICO Cosmética* 23:10.
- Ascencio-Gutierrez J, Rodríguez-Lugo V, Angeles C, Santamaría T, Castaño VM (2002) Theoretical análisis of hidroxyapatite and its main precursors by quantum mechanics and HRTEM image simulations. *Computational materials science* 25:413-426.
- Baldrich NS (1983) *El Colágeno* vol 3. Revisión Clínica y estudios terapéuticos Barcelona
- Barba MCP (1987) *La Física en la Medicina*. Fondo De Cultura Económica S.A. de C.V, México D.F.
- Bautista Lozano Carlos. (2008) Caracterización molecular de la región ITS del rDNA de *Pasteurella multocida*. (Tesis de Maestría CICM ICUAP).
- Black J (2006) Biocompatibility: Definitions and Issues, in *Biological performance of materials: fundamentals of biocompatibility*,(Francis T ed, 4th ed., pp 497. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Borsntein P, Sage H (1980) *Structurally distinct collagen types*. vol 49.
- Bres E, Hardouin P (1998) Les matériaux en phosphate de calcium. Aspects fondamentaux. *Sauramps medical*:93.
- Brown WE (1973 ) Solubilities of phosphates and other sparingly soluble compounds, in *Enviromental Phosphorus Handbook*,(sons Wa ed, pp 203-239. in Griffith, E.J., Beeton. A., Spencer, J.M. and Mitchell, D.T., ed, New York.
- Daffonchio Daniele, Raddadi Noura, Merabishvili Maya, Cherif Ameer, Carmagnola Lorenzo.(2006) Strategy for Identification of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Strains Closely Related to *Bacillus anthracis*. *Applied and Environmental Microbiology*. p. 1295–1301.
- Daubrée A (1851) *Expériences sur la production artificielle de l'apatite, de la topaze, et de vuelques autres métaux fruorifères*. vol 32. Comp. Rend. Acad. Sci, Paris.
- Ducheyne P, Beight J, Cuckler J, Evans B, Radin S (1990) Effect of calcium phosphate coating characteristics on early postoperative bone tissue growth. *Biomaterials* 11:531-540.
- Dujardin E, Mann S (2002) Bio-inspired Materials Chemistry. *ADVANCED MATERIALS* 4(7):461-474.
- Fang Y, Agrawal D (1992) *Mater Res* 7:8.

Feitelson J.S. . Marcel Dekker, I., (1993) New York, N.Y. p 63-71 En: L.Kim (ed). The *Bacillus thuringiensis* family tree. Advanced engineered pesticides. L. Kim. New York, CRC Press: 430.

Feitelson, J. S. (1993). The *Bacillus thuringiensis* family tree. Advanced engineered pesticides. L. Kim. New York, CRC Press: 430.

Helgason Erlendur, Okstad Ole Andreas, Caugant Dominique A., Johansen Henning A., Fouet Agnes, Mock Michael. (2000) *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*—One Species on the Basis of Genetic Evidence. Applied and Environmental Microbiology. p. 2627–2630 Vol. 66. No. 6.

Hernández TR, Palma CR, Piña BMC HIDROXIAPATITA Y SUS APLICACIONES. Revista Mexicana De Física 45:144.

Ishikawa T (2000) Different reactions for the synthesis of apatite particles Metal Phosphates and Apatites, in *FINE PARTICLES synthesis, characterization and mechanism of growth*,(Sugimoto T ed, vol 92, pp 362-367. Marcel Dekker Inc., New York.

Joon B, Park, S. R (1992) Biomaterials, an Introduccion, in *Biomaterials*,(Press P ed, pp 223. Plenum Press, New York.

Kay MI, Young RA, Posner AS (1964) Crystal structure of hydroxiapatite. Nature 204:1050.

Lavernia C, Schoenung JM (1991) Calcium Phosphate Ceramics as Bone Substitutes. Ceramic Bulletin 70(1):95.

LeGeros, Zapanta R (2002) Properties of Osteoconductive Biomaterials: Calcium Phosphates. Clinical Orthopaedics and Related Research 395:81-98.

Lemons JE (1986) General Characteristics and Clasification of Implant Material. Materials Science Monographs Elsevier Netherlands 33.

Liu WL, Alim K, Balandin AA, Mathews DM, Doods JA (2005) Assembly and characterization of hybrid virus-inorganic nanotubes. Nanoscale science and design 88(25):1-3.

Mogul R, Kelly JGG, Cable ML, Hebard. AF (2006) Synthesis and magnetic characterization of microstructures prepared from microbial templates of differing morphology. Materials Letter 60:19-22.

Moortier A, Lemaitre J, Rodrique L, Rouxhet P (1989) Solid State Chem 78.

Morejón-A L, Jasso CF, Davidenko N, Mendizábal E (1999) Materiales poliméricos para la reconstrucción de partes del cuerpo humano, in *Universidad de Guadalajara, Dossier Ciencia, ingeniería y vida*, vol 14.

Naka K, Chujo Y (2001) Control of Crystal Nucleation and Growth of Calcium Carbonate by Synthetic Substrates. Chemical Materials 13(10):3245-3259.

Nancollas GH, Tomazzie B (1974) Growth of calcium phosphate on Hydroxiapatite Crystals. Effect of supersaturation and ionic medium. Phys. Chem 78:2218-2225.

Návez González Daysi (2002). Tesis de Maestría Aislamiento y caracterización parcial de cepas de *Bacillus thuringiensis* de la región Puebla-Tlaxcala-Hidalgo.

Palacios JM, Apella MC, Blesa MA, Morando PJ (2001) Estudios fisicoquímicos sobre hidroxiapatitas para implantes dentales: modificación de las propiedades superficiales con la concentración de Ca<sup>2+</sup> soluble y su relación con la adhesión bacteriana., in *Jornadas SAM*, (CONAMET ed, pp 1213-1220, Argentina).

Palmer LC, Newcomb CJ, Kaltz SR, Spoerke ED, Stupp SI (2008) Biomimetic systems for hydroxyapatite mineralization inspired by bone and enamel. *Chem Rev* 108(11):4754-83.

Park JB, Lakes RS (2007) *Biomaterials: an introduction*. 3rd. ed. Springer, Iowa, USA.

Raquejo EH (2007) Materiales de uso técnico, in *I.E.S. CARLOS BOUSOÑO.*, pp 8, Madrid, España.

RECILLAS S, MONDRAGÓN-GALICIA G, RODRÍGUEZ-LUGO V, CASTAÑO VM (2004) Growth of Calcium phosphate onto chemically-functionalized cottons. *Designed Monomers and Polymers* 6(4).

Regí MV (2004) Biomateriales para sustitución y reparación de tejidos, (28040 ed, pp 2. Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense, MADRID.

Reyes-Cervantes E (2006) Crecimiento de hidroxiapatita sobre quitosan, in *Ingeniería Química*, vol Licenciatura, pp 116. Benemerita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla.

Rios-Hernández M, Cepero-Cañas J, Davidenko N (2001) *Evaluación Toxicológica in vitro de Materiales Poliméricos de Restauración Dental Compuestos por BIS-GMA*. vol 1. Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología.

Rivera E, Bonilla M, Hernández R, Rodríguez R, Castaño VM (1997) Microstructure and magnetic properties of Hydroxylapatite. *Mater Síntesis and Proc* 5:153.

Rodríguez-Lugo V, Ascencio J, Angeles-Chavez C, Camacho-Bragado A, Castaño VM (2001) Controlled Hydrothermal production of Hydroxylapatite from Marine Skeletons. *Materials and Technology* 16:97-103.

Rodríguez-Lugo V, Hernández JS, Jiménez MA, Hernández-Tejeda PH, Gospert SR (2005) Characterization of Hydroxyapatite by Electron Microscopy. *Microscopy and Microanálisis* 11(6):516-523.

Rodríguez-Lugo V, Hernández M, Angeles-Chavez C (2003) Síntesis of hydroxylapatite from sand dollar and  $\beta$ -tricalcium phosphate by the solid-state method. *Materials and Manufacturing Processes* 18(6):903-913.

Rodríguez Rodríguez Erika. (2009). Búsqueda del locus *ihr* y correlación con la presencia de locus toxigénicos en *Bacilli* del grupo "cereus" en alimentos preparados.

Rojas Ruíz Norma Elena. (2003) Tesis de Maestría. Estudio de la variación poblacional de cepas de *Bacillus thuringiensis* en condiciones controladas de laboratorio e invernadero.

Sansinenea-Royano E., Sánchez-Alonso P., Ibarra-Rendón J., Olmedo-Alvarez G., Vázquez-Cruz C. (2010). Recombinación homóloga en un solo paso en el cromosoma de *Bacillus thuringiensis*. *Agrociencia* (aceptado). ISSN 1405-3195

Saenz ML, Montero G, Mondragón G, Rodríguez-Lugo V, Castaño VM (2003) Effect of pH on the precipitation of hydroxyapatite on silica gels. *Materials Research Innovations* 7:68-73.

Sánchez C, A. GJDA, Soler-Illia, Ribot F, Grosso D (2003) Design of functional nano-structured materials through the use of controlled hybrid organic-inorganic interfaces. *Comptes Rendus Chimie* 6:1131-1151

Sanz Ana M., Alcaide Ma.d.C., Kuljich Alberto, Cabrera Durango María. J., Alarcón Carolina, Stupka Juan, Castillo Marcelo, Gandía Susana. (2001). .- Incidencia de *Bacillus cereus* en muestras de alimentos Instituto Nacional de Alimentos - Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica, Estados Unidos 25, C.P. 1101, Ciudad de Buenos Aires, Argentina.

Schaffer JP, Saxena A, Antolovich SD, Sanders TH, Warner SB (1999) *La Ciencia y Diseño de los Materiales de la Ingeniería*. 2nd ed. McGraw-Colina, Chicago.

Suzuki T, Hatsushika T, Hayakawa Y (1981) *Faraday Trans. Chem Soc* 77:1059.

Thamaraiselvi T.V. PK, Rajeswari s. (2006) Synthesis of Hydroxyapatite that Mimic Bone Minerology, vol 19 (2), pp 81-83. *Trends Biomaterials Artificial Organs*, Chennai, India.

VARELA-CASELIS JL (2005) CRECIMIENTO DE HIDROXIAPATITA SOBRE TEMPLETES ORGÁNICOS, in *Facultad de Ingeniería Química.*, vol Maestría. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla.

Villee CA (1997) estructuras y funciones celulares, in *BIOLOGIA*, 8 ed., pp 78. Mcgraw-hill

Wang X, Li Y, Wei J, Groot Kd (2002) Development of biomimetic nano-hydroxyapatite/poly(hexamethylene adipamide) composites Elsevier, *Biomaterials* 23:4787-4791.

Yaffee SL, Bulkley JW (1973) Phosphates in Detergents and the Eutrophication of America's waters, in *Comm. On Covt. Operations*, pp 27. US Printing Office, Washington.

Yoshimura M, Suda H (1994) *Hydroxyapatite and related materials*. Boca Raton.

Young RA, Holcomb DW (1982) Variability of hydroxyapatite preparations. *Calcif. Tissue Int* 34:s17-s32.

## ANEXOS

### MEDIOS Y SOLUCIONES

#### LB-Caldo

- 10 gr de peptona de caseína
- 5 gr de extracto de levadura
- 5 gr de Na Cl
- Se afora hasta 1 lt. de H<sub>2</sub>O bidestilada

Una vez aforado se disuelven todos los componentes y se vierten en frascos de 250 ml con la finalidad de reducir el desperdicio y evitar la contaminación de todo el medio de cultivo; se procede a esterilizar por vía húmeda durante 20 minutos a 15 psi (120°C)

#### LB-Agar

- 10 gr de peptona de caseína
- 5 gr de extracto de levadura
- 5 gr de Na Cl
- 15 gr de agar bacteriológico
- Se afora hasta 1 lt. de H<sub>2</sub>O bidestilada

Se recomienda aforar y agregar al último en cada frasco de 250 ml 4 grs de agar bacteriológico con la finalidad de disolver uniformemente el agar, así como reducir el desperdicio y evitar la contaminación de todo el medio de cultivo; se procede a esterilizar por vía húmeda durante 20 minutos a 15 psi (120°C) y una vez esterilizado se vierte en placas petri bajo campana de flujo laminar. Estas cajas se someten a prueba de esterilidad una vez que se ha enfriado por completo el medio y se ha evaporado todo el vapor de agua.

## **TBE**

Para preparar un litro de solución se ocupan:

- 108 grs de Tris
- 55 gr de ácido Bórico
- 20 ml 0.5 EDTA (pH=8.0)
- Se afora con H<sub>2</sub>O destilada

Se procede a esterilizar por vía húmeda durante 20 minutos a 15 psi (120°C)

## **Gel de agarosa**

Por 100 ml. De TBE se agregan 0.8 gramos de Agarosa, se funde en un matraz de precipitados, se enfría hasta una temperatura de 60°C y se vierte en el recipiente especial para elaborar geles y se coloca el peine con el número de dientes deseados para el análisis.

**Tabla anexo1 Tris G**

<b>REACTIVOS</b>	<b>100 ml.</b>
CaCl <sub>2</sub>	0.8%
FeSO <sub>4</sub>	0.025%
CuSO <sub>4</sub>	0.05%
ZnSO <sub>4</sub>	0.5%
MnSO <sub>4</sub>	0.5%
MgSO <sub>4</sub>	2%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20%
Glucosa	20%
Tris pH 7.5	1M
Extracto de levadura	.15 gr
K <sub>2</sub> HP0 <sub>4</sub>	5%
Agar	1.6 gr

Una vez aforado se disuelven todos los componentes se procede a esterilizar por vía húmeda durante 20 minutos a 15 psi (120°C)

### SOLUCIÓN DE BROMURO DE ETIDIO

- 100 ml H<sub>2</sub>O destilada por 800  $\mu$ l de Bromuro de Etidio

**TABLA anexo 2 FLUIDO FISIOLÓGICO SIMULADO**

<b>PLASMA</b>	
<b>CONCENTRACIÓN</b>	<b>1.5 FFS</b>
<b><i>CANTIDAD A PREPARAR</i></b>	1000 ml
CaCl <sub>2</sub>	0.249g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.235g
NaCl	12.535g
TRIS	6.055g

**La Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**  
 a través del Cuerpo Académico Ingeniería en Materiales  
 de la Facultad de Ingeniería Química



otorga la presente



# Constancia

*E. Reyes-Cervantes*

A:



Por su presentación oral del trabajo titulado

**USO DE LA MEMBRANA DE BACILLUS THURINGIENSIS COMO  
 TEMPLETE PARA CRECER CRISTALES DE HIDROXIAPATITA**



por el Comité Organizador

Dr. Efraín Rubio Rosas

Dr. Ernesto Chigo Anota

Dr. Heriberto Hernández Cocoltzi



La Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

a través de la

Facultad de Ingeniería Química y del Cuerpo Académico Ingeniería en Materiales

Otorga el Presente

## RECONOCIMIENTO

A: E. Reyes Cervantes, C. Vázquez Cruz, E. Rubio-Rosas y V. Rodríguez Lugo

Por su participación con el trabajo:

### **USO DE MICROORGANISMOS COMO TEMPLETES PARA NUCLEACIÓN DE CRISTALES DE HIDROXIAPATITA.**

durante el 3<sup>er</sup> Simposium de Ingeniería en Materiales, 1<sup>er</sup> Simposium de Ingeniería y

70 Aniversario de la Facultad de Ingeniería Química, realizado en la

Facultad de Ingeniería Química de la BUAP, Puebla, México del 11 al 13 de marzo del 2009.

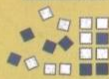
Dr. E. Chigo Anota  
Por el Comité Organizador

70

ANIVERSARIO



Sociedad Mexicana  
de Materiales A.C.



Materials Research Society  
The Materials Gateway

THE ORGANIZING COMMITTEE  
ACKNOWLEDGES THE PARTICIPATION OF

## ERIK REYES

IN THE WEDNESDAY POSTER SESSION AND CERTIFY THAT THE PRESENTATION  
RECEIVED **FIRST PLACE** IN THE BEST POSTER CONTEST

Cancún, México, August 2009

Luis Enrique Sansores Cuevas  
MRS-Mexico

Allan T. Hurd  
MRS-USA



LASMAC





**Materials  
Research  
Society**

506 Keystone Drive  
Warrendale, PA 15086-7573  
www.mrs.org

724-779-3003  
FAX 724-779-8313

January 11, 2010

Eric Reyes Cervantes  
Centro Universitario de Vinculacion  
Benemerita Universidad Autonoma de Puebla  
Prolongación de la 24 Sur y Ave. San Claudio  
Cd. Universitaria, Col. San Manuel  
Puebla, Puebla C.P. 72570  
Mexico

Dear Mr. Cervantes:

Congratulations on your selection as a winner of the MRS/MRS-Mexico Student Poster Award Exchange Program!

We are looking forward to having you present your poster entitled "Growth of Hydroxylapatite Crystals Using as Template the Surface of Cellular Membranes of Bacillus Thuringiensis" at the 2010 MRS Spring Meeting, April 5-9, in San Francisco, CA. ([www.mrs.org/spring2010](http://www.mrs.org/spring2010)). As a selectee of the Exchange Program, MRS will offer you complimentary registration for the meeting and up to five nights of accommodations in San Francisco so that you might enjoy all the activities the meeting offers. We understand that your travel expenses will be subsidized by MRS-Mexico.

Your poster is to be prominently displayed as part of the Tuesday, April 6 MRS poster session from 8:00 – 11:00 PM on the Salon level of the San Francisco Marriott Marquis Hotel. Posting can be done at your convenience between the hours of 12:00-5:00 PM. Our poster boards measure 8-feet high by 4-feet wide (i.e., a vertical format), with a usable space of 91 inches by 45 inches. More detailed poster-presentation guidelines can be found in the attached PDF file. It would be ideal if you could plan your poster display so that MRS would have a 7-inch space across the top of the board to properly identify the poster as a part of this unique exchange program.

Please let me know your arrival and departure dates and times as they're confirmed so that we can book your hotel room accordingly. I can be reached at [mcauley@mrs.org](mailto:mcauley@mrs.org). MRS Meetings Operations Manager Jackie Manchas will then confirm your accommodations at the San Francisco Marriott Marquis in a later e-mail.

I'd be happy to answer any additional questions you might have. We look forward to your participation at the 2010 MRS Spring Meeting.

Regards,

  
Mary McAuley  
Meetings Project Manager

Cc: [Gonzalo Gonzalez, MRS-Mexico](#)  
Enrique Sansores, MRS-Mexico  
Jackie Manchas, MRS  
Dick Stevens, MRS