BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

TESIS PROFESIONAL

"EVALUACIÓN DE HIDROXIAPATITAS CONTENIENDO COBRE PARA SU APLICACIÓN COMO MATERIALES ANTIMICROBIANOS"

PARA OBTENER EL GRADO DE:

LICENCIADO EN QUÍMICO FARMACOBIÓLOGO

PRESENTA:

YAZMÍN BADILLO CAAMAÑO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. GEOLAR FETTER

ASESOR DE TESIS:

DR. GERARDO LANDETA CORTÉS

PUEBLA, PUE. **ENERO 2020**

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Ciencias Químicas (FCQ-BUAP) y en el Centro Universitario de Vinculación y Transferencia de Tecnología (CUVyTT-BUAP)

“Cada gran sueño comienza con un soñador. Siempre recuerda que tienes dentro de ti la fuerza, la paciencia y la pasión por alcanzar las estrellas y cambiar el mundo.”

Harriet Tubman

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo principalmente a mi madre, no tengo palabras para describir lo que significas para mí, por tu paciencia, consejos, las noches de desvelo y trabajo constante y sobre todo por enseñarme que los sueños se pueden hacer realidad y creer en mí, a mi padre por su apoyo, confianza, por enseñarme que la dedicación y esfuerzo son importantes para seguir adelante y a darle valor a las cosas más importantes de la vida, sin ustedes no sería la persona que soy ahora. Los amo.

A mi hermana Ana Gabriela quien ha sido un soporte en mi día a día, cuidarme en mi infancia y ser un pilar importante en mi vida, por tu cariño y por mostrarme mis virtudes y nunca dejarme caer.

A mis sobrinos Moisés y Arik por iluminar mis días y recordarme a la niña que llevo dentro.

A mi hermano David que me hace ver mis fortalezas, por ser mi apoyo, aconsejarme y sobre todo ser mí amigo y recordarme que puedo con cualquier obstáculo que se me presente.

AGRADECIMIENTOS

Me siento agradecida con dios por todas las bendiciones que me ha otorgado, por darme la fuerza para seguir adelante cuando más agotada me sentía.

Doy gracias por encontrar la fortaleza para culminar esta etapa de la forma que siempre soñé, por cumplir los ideales que adquirí desde pequeña y nunca darme por vencida, por vencer todos los obstáculos y demostrarme a mí misma que soy capaz de realizar grandes cosas.

Agradezco a mi madre por estar conmigo en cada paso de esta aventura, por no dejarme rendir, por ser mi mejor amiga, por tus consejos, gracias por alentarme y ver en mi eso que a veces yo no veo, a mi padre por alentarme, por estar presente y por ser un ejemplo de perseverancia, por procurarme y estar a mi lado, sin ustedes esto no habría sido posible.

Ana Gaby, te agradezco por ser la mejor hermana que puedo tener, por ser un ejemplo de perseverancia, no sabes todo lo que te he aprendido, por guiarme y soportarme en los días malos, por hacerme reír y hacerme ver la vida de forma más simple durante el desarrollo de este trabajo.

A Moisés y Arik por provocarme una sonrisa cada día, por levantarme el ánimo y ser una chispa de felicidad en mi vida.

A mi hermano David, por sus consejos y por recordarme que soy una persona fuerte e inteligente, hacerme ver mi potencial, sobre todo por cuidarme y hacerme reír.

A mis tíos por siempre brindarme una palabra de aliento para alcanzar mis sueños, a mi tía Mary y mi tío Gerardo por creer en mí, por nunca dejarme sola, a mi tía Carmen y mi tío Pedro Ruiz por quererme, cuidarme y guiarme, por siempre haber estado cuando los necesite, a mi tío Pedro y mi tía Rosario por estar presentes y darme siempre consejos, a mi tío Alejandro, mi tía Tere y mi tía soledad por siempre haberme apoyado.

A todos mis primos por estar junto a mí y en especial a mi prima Karen por hacerme reír,

escucharme, alentarme, estar conmigo y hacerme ver la vida de una manera divertida.

Al Dr. Geolar Fetter, por confiar en mí, por tenerme paciencia, enseñarme y guiarme durante este proceso, por permitirme participar y proponer ideas, y darme la oportunidad de demostrar que puedo, por ser un gran docente y hacernos ver la ciencia como algo interesante y divertido, especialmente le agradezco por alentarme a concluir este proyecto, en verdad gracias.

Al Dr. Gerardo por ser mi asesor de tesis, y permitirme la oportunidad de trabajar a su lado, por aconsejarme, enseñarme y tenerme paciencia, ya que sin su ayuda no hubiera sido posible terminar este proyecto.

Al Dr. José Ángel por enseñarme, guiarme, aconsejarme y por abrirme las puertas en sus proyectos de investigación, por convertirme en una persona autocritica, autodidacta e iniciar mi formación como investigador, por creer en mí y confiar en mi criterio y sobre todo por convertirse en un buen amigo.

Al Dr. Aarón por alentarme a continuar, confiar y creer en mí, por aconsejarme y ser mi amigo.

A Arturo, Ana María, Jenny y Natalia por ser unos grandes amigos, por estar presentes en cada paso de este proyecto, por su amistad, consejos y ayuda, por enseñarme, creer y hacerme creer en mí.

A mis compañeros del laboratorio Franchescoli, Luis, Carlos, Marco y Moni por apoyarme y ayudarme durante este proceso.

Al Departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Ciencias Químicas (FCQ-BUAP), por el uso de sus instalaciones para la realización de la síntesis de los materiales.

Al Centro Universitario de Vinculación y Transferencia de Tecnología (CUVyTT-BUAP), por la caracterización y realización de la evaluación antimicrobiana de los materiales.

A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP-BUAP), por el apoyo económico otorgado para la realización de este trabajo con el proyecto "Síntesis de compósitos con propiedades antimicrobianas" (94-2017).

Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas.

Marie Curie

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN XIII

INTRODUCCIÓN XIV

JUSTIFICACIÓN XVII

OBJETIVOS XVIII

CAPÍTULO 1: GENERALIDADES

1.1 Apatitas 19

1.1.1 Bioapatitas 20

1.1.2 Hidroxiapatita 21

1.1.2.1 Estructura de la hidroxiapatita 21

1.1.3 Métodos de síntesis 23

1.1.3.1 Métodos por vía húmeda 23

1.1.3.2 Método por precipitación química 23

1.1.3.3 Método por irradiación con ultrasonido 24

1.1.3.4 Método por irradiación con microondas 24

1.1.4 Aplicaciones de las hidroxiapatitas 25

1.2 Bacterias 25

1.2.1 Género *Staphylococcus* 28

1.2.1.1 Características morfológicas y bioquímicas 28

1.2.1.1.1 Estructura 29

1.2.1.1.2 Cultivo e identificación 29

1.2.1.1.3 Patogenia 30

1.2.2 Género *Escherichia* 30

1.2.2.1 *Escherichia coli* 30
1.2.2.1.1 Estructura 31
1.2.2.1.2 Cultivo e identificación 31
1.2.2.2 Patogenia 32

1.3 Agentes antimicrobianos **33**
1.3.1 Cobre (Cu) **35**

1.3.1.1 Mecanismo de acción del cobre 35
1.3.1.2 Resistencia al cobre 35
1.3.1.3 Dosis y toxicidad 37
1.3.1.4 Aplicaciones del cobre 37
1.3.2 Neem (*Azadirachta indica, A. Juss*) **38**

1.3.2.1 Aceite de neem 38
1.3.2.1.1 Obtención del aceite de neem 38
1.3.2.2 Aplicaciones del neem 40

1.4 Antecedentes **40**
1.4.1 Estudios realizados sobre bacterias e hidroxiapatitas con cobre 40

1.4.2 Estudios realizados sobre bacterias y aceite de neem 41

CAPÍTULO 2: DESARROLLO EXPERIMENTAL

2.1 Síntesis de materiales **42**
2.1.1 Síntesis de hidroxiapatita de referencia 42

2.1.2 Síntesis de hidroxiapatitas con Cobre 42

2.1.3 Síntesis de hidroxiapatita de referencia con aceite de neem 43

2.1.4 Síntesis de hidroxiapatitas con cobre con aceite de neem 43

2.2 Evaluación antimicrobiana de las hidroxiapatitas **45**
2.2.1 Método de difusión en pozo 45

2.2.1.1 Suspensión de hidroxiapatitas 45
2.2.1.2 Suspensión directa de colonias 45
2.2.1.3 Método de difusión en pozo 46
2.2.1.4 Método de difusión en disco 46

2.3 Métodos de caracterización 48
2.3.1 Difracción de rayos X (DRX) 48
2.3.2 Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) 48
2.3.3 Espectroscopía de emisión por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES) 48

CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Difracción de rayos X (DRX) 49
3.1.1 DRX de las hidroxiapatitas de referencia 49
3.1.2 DRX de las hidroxiapatitas con aceite de neem 50

3.2 Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) 51
3.2.1 FTIR de las hidroxiapatitas de referencia 51
3.2.2 FTIR de las hidroxiapatitas con aceite de neem 52

3.3 Composición química de las hidroxiapatitas 53
3.3.1 Concentración de cobre en las hidroxiapatitas 54

3.4 Evaluación antimicrobiana de las hidroxiapatitas 55

CONCLUSIONES 59

REFERENCIAS 60

ANEXO 1: TINCIÓN DE GRAM 66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Estructura de la hidroxiapatita 22

Figura 1.2 Interacciones de las hidroxiapatitas non-apatitas. 22

Figura 1.3 Mecanismo físico de la síntesis de HA por ultrasonido. 24

Figura 1.4 Diferencias de la pared celular entre bacterias Grampositivas y Gramnegativas. 26

Figura 1.5 Clasificación por forma y disposición espacial de las bacterias. 27

Figura 1.6 Morfología de *Sthaphylococcus aureus.* 28

Figura 1.7 Theodor Escherich. 30

Figura 1.8 Morfología de *Escherichia coli.* 32

Figura 1.9 Mecanismo de acción de diferentes nanopartículas metálicas contra células bacteriana. 36

Figura 1.10 Proceso de prensado en frio. 39

Figura 2.1 Diagrama de proceso de síntesis de hidroxiapatitas. 44

Figura 2.2 Esquema del método de difusión en pozo para la evaluación de la actividad antimicrobiana de los materiales. 47

Figura 3.1 Difractogramas de rayos X de las hidroxiapatitas de referencia. 49

Figura 3.2 Difractogramas de rayos X de las hidroxiapatitas con aceite de neem. 50

Figura 3.3 Espectro infrarrojo de las hidroxiapatitas de referencia. 51

Figura 3.4 Espectro infrarrojo de las hidroxiapatitas con aceite de neem. 52

Figura 3.5 Actividad antibacteriana de las muestras CuHA y Neem/CuHA. 57

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Principales iones presentes en la composición química de las apatitas 19

Tabla 1.2 Apatitas presentes en la naturaleza. 20

Tabla 1.3 Comparativo entre bacterias grampositivas y gramnegativas 26

Tabla 1.4 Cepas patógenas de *E. coli*. 32

Tabla 1.5 Agentes antimicrobianos orgánicos e inorgánicos. 34

Tabla 2.1 Reactivos empleados para la síntesis de hidroxiapatita. 42

Tabla 2.2 Tabla de condiciones de síntesis con tratamiento de ultrasonido 43

Tabla 2.3 Condiciones de síntesis de hidroxiapatitas con aceite de neem por irradiación con microondas.44

Tabla 2.4 Muestras de hidroxiapatitas. 45

Tabla 3.1 Composición química elemental y relación molar M":P de las hidroxiapatitas determinadas por ICP-OES. 53

Tabla 3.2 Concentración de cobre en las muestras CuHA y Neem/CuHA determinada por ICP-OES. 55

Tabla 3.3 Diámetro de los halos de inhibición contra *S. aureus* y *E. coli* 55

Tabla 3.4 Antibióticos comúnmente usados para el tratamiento de infecciones nosocomiales asociadas a huesos 58

RESUMEN

La hidroxiapatita (HA) sintética es ampliamente usada en ingeniería de tejidos y medicina regenerativa debido a su biocompatibilidad con la HA biológica, ya que es un material bioactivo y reabsorbible. La HA pura no cuenta con actividad antimicrobiana lo que diezma la estabilidad del implante. En años recientes se ha investigado la incorporación de cationes como el cobre (Cu^{2+}) dado a su efecto antimicrobiano a bajas concentraciones, a su vez han reportado que las HA sustituidas con cobre (Cu-HA) no tienen un efecto antimicrobiano significativo. En este trabajo se realizó la síntesis de HA sustituidas con cobre a diferentes relaciones metálicas molares por el método de coprecipitación simultánea tratadas con ultrasonido. Posteriormente se sintetizaron hidroxiapatitas sustituidas con cobre dopadas con aceite de neem, ya que anteriormente se ha reportado que posee actividad bacteriostática. Los materiales híbridos obtenidos fueron caracterizados por difracción de rayos X (DRX), espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) y espectroscopía de plasma (ICP-OES). Se evaluó la sensibilidad bacteriana de los materiales en contra de las cepas *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) por el método modificado de difusión en disco.

INTRODUCCIÓN

En la práctica médica y quirúrgica, la osteomielitis (infección ósea y articular) es una de las complicaciones más frecuentes en las cirugías ortopédicas (Li y col., 2016). La osteomielitis es una infección causada principalmente por bacterias, desencadenando una respuesta inflamatoria que conduce a la destrucción del hueso, infección del tejido adyacente o la remoción de la prótesis (Inzana y col., 2016). Entre las bacterias causantes de la osteomielitis se encuentran *Staphylococcus aureus* responsable de la mayoría las infecciones en hueso, algunas enterobacterias (*Escherichia coli, Serratia marcences* y *Klebsiella pneumoniae), Pseudomona aureuginosa* o una mezcla de ellas (Hassani y col., 2014).

Debido a la aplicación generalizada de antibióticos de amplio espectro a materiales reabsorbibles como son ceftriaxona, vancomicina, rifampin, ciprofloxacino, gentamicina y trombomicina, entre otros para el tratamiento de la osteomielitis, ha dado lugar a la aparición de bacterias multirresistentes y efectos adversos provocados por antibióticos, por lo que se están buscando alternativas como los biomateriales (The Korean Society for Chemotherapy y col., 2014).

El procedimiento estándar en algunos casos involucra aplicación de antibióticos vía intravenosa, implantación local de microesferas de polimetilmetacrilato (PMMA) con moléculas de fármacos en suspensión y la impregnación de implantes metálicos a través de materiales poliméricos dopados con fármacos, sin embargo estos métodos poseen algunas desventajas, por ejemplo el PMMA debe estar implantado directamente en la zona infectada para asegurar un efecto de liberación controlada y prolongada, el PMMA es un material no biodegradable lo que significa someter al paciente a una nueva intervención quirúrgica para remover el material, otra desventaja es que el material no permite la liberación completa de los fármacos (Kolmas y col., 2015).

En el presente trabajo se proponen biomateriales como la hidroxiapatita por ser bioactivo, biocompatible y bioabsorbible, sustituidos a diferente concentración metálica molar Ca:Cu para su evaluación como agente antimicrobiano. Los materiales propuestos

fueron sintetizados por el método de ultrasonido debido a que confieren mejores propiedades mecánicas.

La HA es el principal componente mineral de los huesos, la cual está asociada con las reacciones bioquímicas del metabolismo del hueso (Šupová, 2015). La HA sintética es el material comúnmente usado en ingeniería de biomateriales y medicina regenerativa de huesos, tiene una gran biocompatibilidad con la HA biológica, es frecuentemente usada en implantes para ayudar con la osteointegración (Kolmas y col., 2014).

La síntesis de HA puede ser asistida por el uso de métodos húmedos como son el método de precipitación química convencional, hidrólisis, sol-gel, hidrotermal, emulsión y por sonicación, este último método produce materiales nano dimensionados y funciona por cavitación en fase acuosa, la sonicación estimula la aceleración de reacciones heterogéneas solido-líquido, incrementa el crecimiento de los cristales y produce partículas más pequeñas, uniformes y puras (Sadat-Shojai y col., 2013).

Hay varias limitaciones para el uso de la HA pura, incluyendo la falta de actividad antimicrobiana que diezma la estabilidad del implante. En los últimos años se ha investigado la incorporación de cationes inorgánicos como la plata (Ag^{+}), cobre (Cu^{2+}), zinc (Zn^{2+}) y titanio (Ti^{4+}) como agentes antimicrobianos (Heidenau y col., 2005).

En estudios anteriores se ha comparado el efecto inhibitorio de HA´s sustituidas con Ag^{+}, Cu^{2+} y Zn^{2+} contra *E. coli,* en donde la Ag-HA, mostró un claro efecto inhibidor, mientras Cu-HA y Zn-HA no mostraron un efecto significativo (Kim y col., 1998). Pese a los efectos positivos de las Ag-HA, estos materiales podrían generar efectos adversos de no ser administrada la dosis adecuada, estudios sugieren una dosis tóxica de entre 1 y 3 µg/mL (Peetsch y col., 2013).

Además, se propone la evaluación del efecto antimicrobiano de biomateriales sintetizados por irradiación con microondas, ya que permite la formación de cristales de mayor tamaño en menor tiempo de reacción, además los materiales fueron dopados con aceite de neem debido a que hay estudios que sugieren posee actividad antimicrobiana.

El aceite de semillas de neem está constituido por varios principios activos con gran

capacidad antibacteriana, como son: la azaradiractina que se ha demostrado que posee un efecto inhibitorio contra *E. coli* (Pantoja y col., 2007); el nimbidin que inhibe completamente el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* (Murthy y col., 1958)*;* un derivado del nimbidin, el nimbolide que ha demostrado actividad antibacterial contra *S. aureus* y *Sthaphylococcus* coagulasa-negativos (Pankaj y col., 2011); y el mahmoodin aislado del aceite de semillas de neem, que ha presentado capacidad antibacteriana contra algunas bacterias patógenas humanas (Devacumar y col., 1993).

JUSTIFICACIÓN

Las HA puras son un material biocompatible, bioactivo y reabsorbible, pero carecen de actividad antimicrobiana. En estudios anteriores se han sustituido HA con Cu^{2+} en diferentes relaciones molares, dada su actividad antimicrobiana, pero a su vez no tiene efectos significativos. El aceite de árbol de neem ha demostrado que posee capacidad antimicrobiana y ser atóxico, es de bajo costo y tiene diferentes aplicaciones en la industria agrícola, médica y cosmética.

En este trabajo se evaluó el efecto de las HA sustituidas con cobre como materiales antimicrobianos, lo cual permitiría disminuir la incidencia de infecciones postoperatorias al tener un material bioactivo que promueva la osteointegración y osteoinducción y disminuya la incidencia de intervenciones postoperatorias y a su vez disminuyan los efectos adversos provocados por el uso de antibióticos de amplio espectro, como son la resistencia a antibióticos, insuficiencia renal, hepatotoxicidad entre otros. Además se evaluará el efecto del aceite de neem al dopar HA sustituidas con Cu^{2+}.

OBJETIVOS

General

- Evaluar las hidroxiapatitas de diferente relación metálica molar Ca^{2+}/Cu^{2+} sintetizadas por ultrasonido y por irradiación de microondas para su aplicación como agente antimicrobiano.

Particulares

- Sintetizar hidroxiapatitas Ca^{2+}/Cu^{2+} a pH 9 con relación metálica molar Ca:Cu 9:1, 8.5:1.5 y 8:2, por el método de coprecipitación simultánea.
- Sintetizar hidroxiapatitas Ca^{2+}/Cu^{2+} a pH 9 con relación metálica molar Ca:Cu 9:1, 8.5:1.5 y 8:2 con aceite de neem, por el método de coprecipitación simultánea.
- Caracterizar los sólidos obtenidos por difracción de rayos X (DRX), espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) y espectroscopía de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES).
- Evaluar la actividad inhibitoria de las hidroxiapatitas Ca^{2+}/Cu^{2+} como agentes antimicrobianos en cepas de *E. coli* (ATCC 25922) y *S. aureus* (ATCC 29213), por el método de difusión en agar.
- Estudiar la actividad antimicrobiana de las hidroxiapatitas con aceite de neem sintetizadas por irradiación con microondas.

1 GENERALIDADES

1.1 Apatitas

En 1786 A.G. Werner uso el terminó “apatita” (del griego “Apate”, engañarse o confundirse) para nombrar una familia de minerales que llegaban a ser confundidos con piedras preciosas. Las apatitas tienen estructuras cristalinas similares, es decir, son compuestos isomorfos, cuya formula molecular general es:

$$\boldsymbol{M_{10}(TO_4)_6N_2}$$

Donde: M representa a un catión divalente o trivalente, T es un catión con número de coordinación 4 que se encuentra rodeado por 4 átomos de oxígeno, que forma un radical negativo de geometría tetraédrica, por otra parte, N es un anión o radical negativo con número de coordinación 3 que interactúa con 3 cationes M (Rivera Ortega , 2007). En la tabla 1.1 se especifican los cationes y aniones que pueden formar diferentes compuestos isomorfos de las apatitas.

Tabla 1.1 Principales iones presentes en la composición química de las apatitas

Componentes químicos de las apatitas	
M	Na^+, K^+, Ca^{2+}, Sr^{2+},Ba^{2+},Mn^{2+},Cd^{2+}, Fe^{2+},$Re^{2+}Pb^{2+}$, U^{3+}
TO_4	CO_3^{2-}(raras veces), SO_4^{2-},PO_4^{3-}, AsO_4^{3-},VO_4^{3-}, SiO_4^{4-}
N	F^-, Cl^-, I^-, OH^-,CO_3^{2-},S^{2-},O^{2-}

Los componentes del sitio N son los que producen cambios significativos en la estructura cristalina y las propiedades del mineral, debido a que el grupo espacial varía según el tamaño del radio iónico de N, a mayor tamaño de radio atómico se genera una apatita de menor simetría. En el caso de la sustitución de N cuando se trata de un radical no simétrico como los grupos hidroxilo (OH^-), la orientación del enlace H-O puede presentarse en diferentes direcciones, modificando la interacción y la distancia con los cationes de M, esto genera que la cristalización de una apatita tenga una estructura cristalina hexagonal o monoclínica.

En la tabla 1.2 se enlistan algunos ejemplos de apatitas minerales que se encuentran

presentes de forma natural en la corteza terrestre. Las apatitas están presentes en tres formas principales dependiendo del anión de grupo N presente en su composición molecular, como son las fluorapatitas, clorapatitas e hidroxiapatitas.

Tabla 1.2 Apatitas presentes en la naturaleza.

Nombre	Fórmula
Hidroxiapatita de calcio	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$
Hidroxiapatita de bario	$Ba_{10}(PO_4)_6(OH)_2$
Hidroxiapatita de cadmio	$Cd_{10}(PO_4)_6(OH)_2$
Hidroxiapatita de plomo	$Pb_{10}(PO_4)_6(OH)_2$
Hidroxiapatita de estroncio	$Sr_{10}(PO_4)_6(OH)_2$
Hidroxivanaditina	$Ca_{10}(VO_4)_6(OH)_2$
Fluorapatita	$Ca_{10}(PO_4)_6F_2$
Clorapatitas	$Ca_{10}(PO_4)_6Cl_2$
Clorapatitas de cadmio	$Cd_{10}(PO_4)_6Cl_2$
Clorapatitas de cadmio y arsénico	$Cd_{10}(AsO_4)_6Cl_2$

1.1.1 Bioapatitas

Las bioapatitas son compuestos conocidos como ortofosfatos de calcio (CaPs), conforman la fase mineral del cuerpo y se encuentran presentes en huesos, dentina y esmalte entre un 45 a 70% de masa, confiriendo a estos estabilidad y dureza. El grado de cristalinidad de las bioapatitas es escaso y no contienen una gran concentración de grupos hidroxilo, e incluso algunas de ellas no tienen concentración alguna de estos grupos (Šupová, 2015).

La familia de CaPs se conforma de 4 categorías que son: HA, con una relación molar Ca/P de 1.67; hidroxiapatita deficiente de calcio (CDHA), fosfato tricálcico (α o β- TCP); y fosfato de calcio bifásico (BCP), con una relación molar menor. Aunque las bioapatitas o CaPs se encuentran distribuidos en la naturaleza, se han generado métodos de síntesis debido a su aplicación en el área de ingeniería de tejidos; al realizar la síntesis de estos materiales se pueden formar tres diferentes fases solidas que son fosfatos de calcio amorfos (ACP), fosfato de octacalcio (OCP) o HA, estas fases poseen una composición química similar a las apatitas biológicas y sus propiedades físicas, mecánicas biológicas y de cristalinidad pueden ser

controladas de acuerdo con los parámetros de síntesis (Hassan y col., 2015).

1.1.2 Hidroxiapatita

Los biomateriales basados en compuestos de fosfato de calcio han generado gran interés en los últimos años por su aplicación en la ingeniería de tejidos óseos. Un ejemplo de estos materiales es la HA $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, estos pueden ser obtenidos a partir de matrices biológicas (huesos humanos o de especies animales como los bovinos) o ser sintetizados por diferentes métodos fisicoquímicos. La HA biológica o sintética es un material biocompatible, bioactivo y bioabsorbible, por lo que son utilizados principalmente para la regeneración de tejido óseo. La HA biológica se encuentra involucrada en el metabolismo del sistema óseo, ya que en la misma se almacenan iones principales como son Ca^{2+} y PO_4^{3-}, que se encuentran asociados con algunos grupos y elementos menores como son CO_3^{2-}, HPO_4^{2-}, Na^+ y Mg^{2+} y elementos traza como el Sr^{2+}, K^+, Cl^- y F^-, entre otros, que permiten regular electrolitos de importancia en la sangre por cambios en el pH del individuo (Skinner, 2005; Stevens, 2008).

1.1.2.1 Estructura de la hidroxiapatita

La HA presente en huesos presenta una estructura hexagonal con un grupo espacial $P6_3/m$, el grado de cristalinidad de las apatitas biológicas siempre es pobre, en la celda unitaria de la HA hay cuatro tipos diferentes de posiciones cristalográficas. Cuatro iones de calcio por celda unitaria denominados Ca (I) se encuentran paralelos al eje c y rodeados de nueve átomos de oxígeno, además de otros seis átomos de calcio nombrados Ca (II) que forman dos triángulos equiláteros a lo largo del eje c y *z= ¼ y ¾* formando un canal aniónico que se encuentra ocupado por dos aniones monovalentes por celda unitaria, y seis aniones PO_4^{3-} en donde cada átomo de fosforo (P) está coordinado con cuatro átomos de oxígeno (Pasteris y col., 2008), (Wopenka y col., 2005). En la figura 1.1 se presenta el acomodo de los iones en la estructura de la hidroxiapatita.

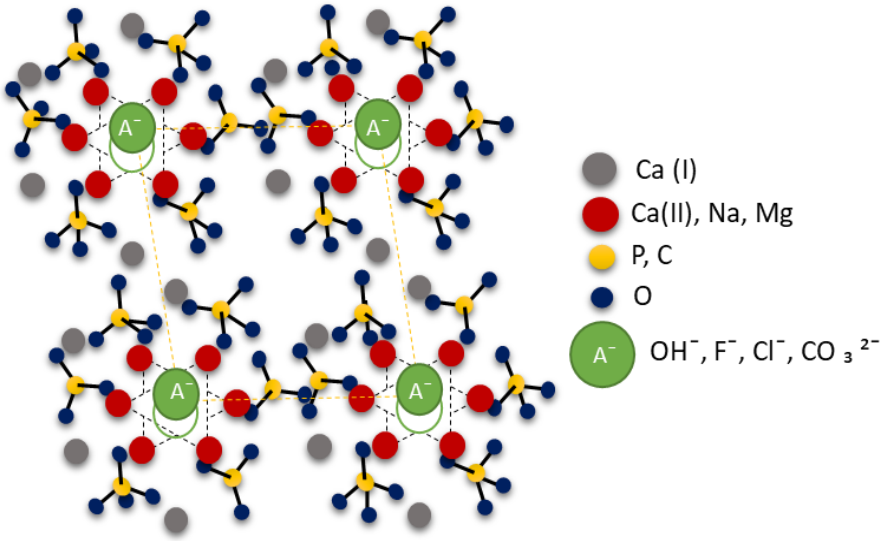

Figura 1.1 Estructura de la hidroxiapatita

Las HA también presentan sistemas non-apatita que corresponden a dominios hidratados de los sitios de iones móviles (Ca^{2+}, HPO_4^{2-} y CO_3^{2-}), esto le confiere a la superficie hidratada propiedades que permiten llevar a cabo interacciones del tipo cristal- cristal, cristal-substrato, cristal-molécula y cristal-célula, y estas benefician a los organismos (Rey y col., 2007). En la figura 1.2 se presentan las interacciones entre la superficie hidratada de las HA non-apatita y el medio.

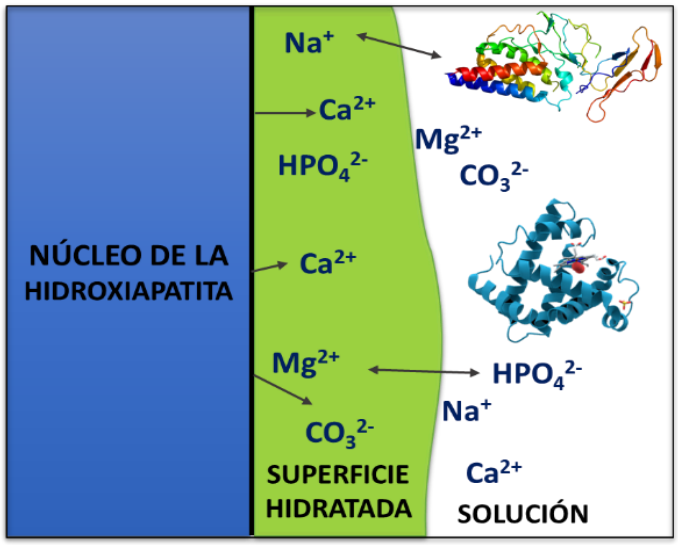

Figura 1.2 Interacciones de las hidroxiapatitas non-apatitas. (Rey y col., 2007).

1.1.3 Métodos de síntesis

En la última década se han estudiado diferentes métodos de síntesis para la preparación de HA, teniendo control específico en su estructura; estos métodos involucran distintos tipos de reacciones químicas y condiciones según la aplicación que se le dará al material, entre los métodos de síntesis se encuentran los métodos por vía seca, procesos a altas temperaturas, métodos basados en recursos biogénicos, métodos combinados y los métodos por vía húmeda que son los más utilizados; ya que tienen grandes ventajas en el control del tamaño y morfología del material.

1.1.3.1 Métodos por vía húmeda

Los métodos por vía húmeda permiten controlar la conducta y condiciones de crecimiento con base en el ajuste de los parámetros de síntesis como la temperatura y el pH, además permiten la adición de varios iones en solución acuosa que pueden ser incorporados a la estructura del cristal. Entre los métodos por vía húmeda más utilizados se encuentran el método de precipitación química, por ultrasonido y por microondas (Sadat-Shojai y col., 2013).

1.1.3.2 Método por precipitación química

La precipitación química es el método más simple para obtención de HA sintética, esta se basa en que a temperatura ambiente y a pH 4.2 la HA es menos soluble y más estable en solución acuosa (Vallet y col., 2004). Las reacciones de precipitación son usualmente sintetizadas a valores de pH mayores de 4.2 y valores de temperatura cercanos al punto de ebullición del agua (Catros y col., 2010).

El método de precipitación química para producir HA puede llevarse a cabo utilizando reactivos que contengan calcio y fosfatos, como son el nitrato de calcio o el hidróxido de calcio para el Ca^{2+} y ácido orto fosfórico para el PO_4^{3-}. El procedimiento de precipitación más utilizado consta de adicionar por medio de goteo dos soluciones acuosas cuya relación molar Ca/P sea estequiométrica a la relación molar Ca/P de la HA (1.67) en agitación constante, la suspensión resultante puede ser tratada a presión atmosférica o inmediatamente lavar y secar el precipitado obtenido (Kong y col., 2002; Gómez y col., 2001).

1.1.3.3 Método por irradiación con ultrasonido

Los cristales obtenidos por ultrasonido exhiben una serie de características específicas tales como una nucleación primaria más rápida y relativamente más fácil en materiales de difícil nucleación, el inicio de una nucleación secundaria y la producción de cristales uniformes y más pequeños. Este método se basa en la activación de reacciones químicas por medio de la irradiación con ultrasonido; el mecanismo físico detrás de la síntesis con irradiación con ultrasonido es la cavitación acústica en una fase acuosa, donde la formación, el crecimiento y el colapso de microburbujas, produce cristales de HA, como se muestra en la figura 1.3 (Jevtic y col., 2008; Han y col., 2009).

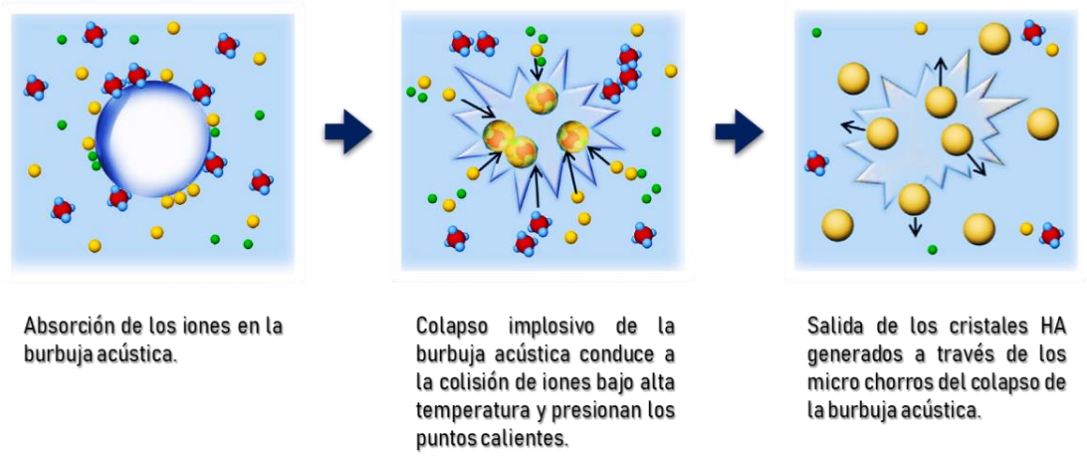

Figura 1.3 Mecanismo físico de la síntesis de HA por ultrasonido (Sadat-Shojai y col., 2013).

En estudios recientes, se ha demostrado que la sonicación aumenta en 5.5 veces la nucleación de cristales de HA. Kim y Saito, usaron una suspensión acuosa que contenía ácido fosfórico e hidróxido de calcio y aplicaron irradiación con ultrasonido para investigar el efecto de la sonicación en la síntesis de HA y concluyeron que se produce una cantidad significante y una sola fase de HA después de 60 minutos de sonicación (Kim y col., 2001).

1.1.3.4 Método por irradiación con microondas

Inicialmente se utilizó el método de síntesis con irradiación con microondas para la síntesis de HA para producir un material denso y con propiedades mecánicas y físicas mejoradas, esto ha producido gran interés debido a la formación de nanopartículas de HA y

de mayor pureza con un menor consumo de energía y condiciones de síntesis reproducibles y controladas. A diferencia de los procedimientos convencionales, donde el material es calentado externamente a través de la conducción, el calentamiento producido con la irradiación con microondas implica la conversión in situ de energía en calor (Rameshbabu y col., 2005; Fang y col., 1994).

El tratamiento de irradiación con microondas da como resultado un calentamiento rápido y uniforme del material sin tensión térmica significativa o variación de la temperatura, esto aumenta la cinética de reacción y reduce la duración del proceso, dando como resultado una nucleación más homogénea con un tiempo de tratamiento de 30 minutos (Sarig y col., 2002).

1.1.4 Aplicaciones de las hidroxiapatitas

La HA sintética es un material frecuentemente usado en ingeniería de tejidos óseos, debido a su gran biocompatibilidad con la HA biológica contenida en dientes, esmalte y huesos, la HA sintética es atóxica y posee propiedades de osteoinducción, es frecuentemente usada en medicina como relleno, suplemento o implante óseo por facilitar la osteointegración. La HA también es utilizada como sistema de liberación de fármacos o sistema de liberación contralada de los mismos ya que posee buenas propiedades de absorción debido a los diferentes tipos de morfología y tamaño de poro que presentan las HA. Esto ha presentado un avance para el tratamiento de desórdenes óseos, osteoporosis, tumores óseos, y especialmente en la profilaxis a través de la impregnación de antibióticos en el material para prevenir infecciones en cirugías de trasplantes o implantes óseos a su vez pueden ser dopados con proteínas capaces de promover la vascularización y regeneración del tejido óseo (Kolmas y col., 2015).

1.2 Bacterias

Las Bacterias son microorganismos unicelulares que no poseen membrana nuclear, es decir son procariotas con una estructura relativamente simple, son de tamaños muy variables y la mayoría miden entre 0.2 a 2 µm de diámetro y entre 2 a 8 µm de longitud.

Tabla 1.3 Comparativo entre bacterias grampositivas y gramnegativas

Característica	Grampositivas	Gramnegativas
Tinción de Gram *(ver anexo 1)*	Se tiñen de color oscuro o púrpura	Se tiñen de color rojizo o rosa
Capa de peptidoglucano	Capa gruesa (múltiples capas)	Capa delgada (una o pocas capas)
Ácidos teicoicos	Presente en la mayoría	Ausente
Membrana plasmática	Ausente	Presente
Espacio periplamático	Ausente	Presente
Liposacárido (LSP)	Ausente	Presente
Contenido de lípidos y lipoproteínas	Reducido	Elevado
Toxinas producidas	exotoxinas	endotoxinas
Resistencia a la ruptura física	Elevada	Reducida
Ruptura de la pared celular por lisozimas	Elevada	Reducida
Resistencia a detergentes aniónicos	Elevada	Reducida
Resistencia a la desecación	Elevada	Reducida

< La pared celular que rodea a las bacterias es compleja y evita la ruptura de la célula bacteriana cuando la presión hidrostática intracelular es mayor que la extracelular. Permite distinguir a las bacterias por medio de tinción en bacterias Grampositivas que poseen varias capas de peptidoglucano que conforman una estructura gruesa y rígida que contiene ácidos teicoicos y las bacterias Gramnegativas, cuya pared celular está compuesta por una o pocas capas de peptidoglucano y está unida a una membrana externa por lipoproteínas (figura 1.4). En la tabla 1.3 se muestran algunas características de las bacterias Gramnegativas y Grampositivas (Tortora y col., 2009).

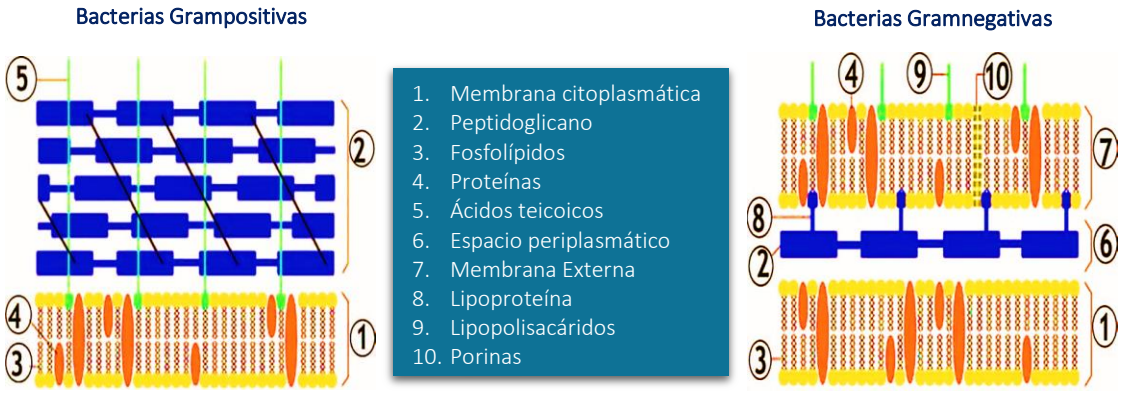

Figura 1.4 Diferencias de la pared celular entre bacterias Grampositivas y Gramnegativas. (Mora, 2012).

Las bacterias se pueden clasificar según su tamaño, forma (cocos, bacilos y espirilos) y disposición espacial (células aisladas, en cadenas y cúmulos) (figura 1.5), pero su clasificación definitiva se realiza por sus propiedades fenotípicas y genotípicas.

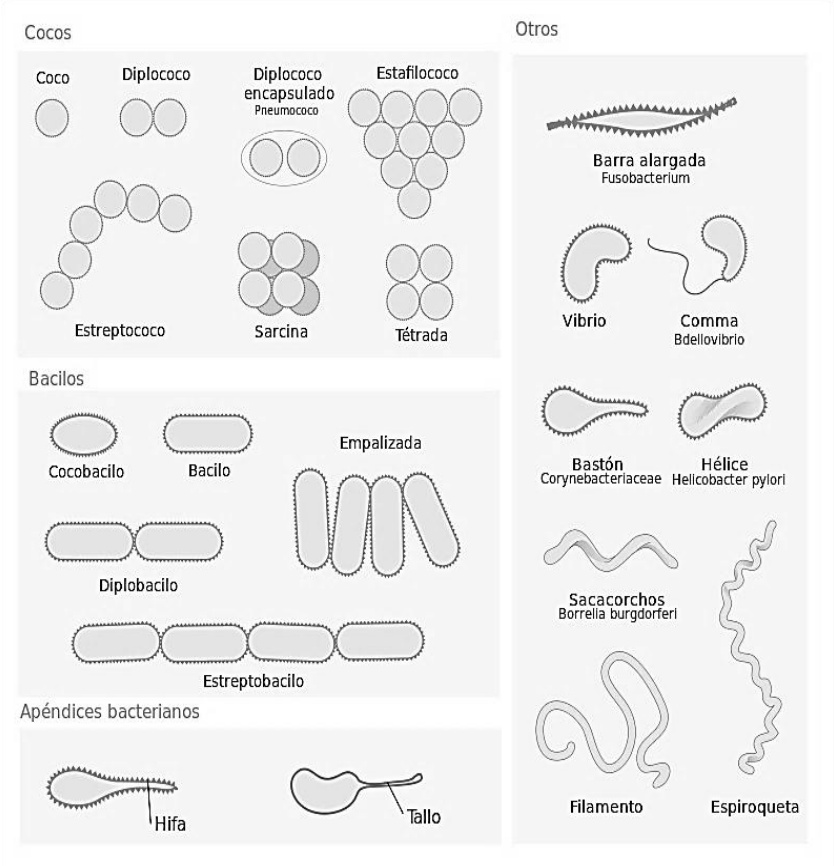

Figura 1.5 Clasificación por forma y disposición espacial de las bacterias.

Las bacterias también pueden encontrarse en el aire, agua, suelos, alimentos y superficies, aunque la mayoría de ellas pueden se consideras avirulentas, y en el organismo como parte del microbiota habitual en piel, conjuntiva, boca, vías respiratorias, estómago y tracto urogenital y cumplen un rol importante en la digestión, síntesis de vitaminas y sistema inmunológico, ya que son la primera línea de defensa contra bacterias patógenas (debido a que secretan sustancias químicas que inhibe su crecimiento), aunque algunas pueden causar enfermedades al estar en contacto con el organismo en zonas consideradas estériles, al tener un sistema inmunológico comprometido o por la producción de toxinas, en estos casos son consideradas de importancia clínica; como ejemplo están la *S. aureus* y *E. coli* que pueden ser agentes causales de las infecciones intrahospitalarias.

1.2.1 Género *Staphylococcus*

Los estafilococos son cocos Grampositivos dispuestos por lo general forma de racimos de uvas irregulares, se desarrollan rápidamente en muchos tipos de medios y tienen actividad metabólica, fermentan carbohidratos y producen pigmentos que varían desde un color blanco hasta un amarillo intenso. Los estafilococos desarrollan con rapidez resistencia a los antimicrobianos y generan problemas terapéuticos graves. El género *Staphylococcus* tiene por lo menos 40 especies identificadas, de las cuales 3 son de importancia clínica: *S. epidermidis, S. saprophyticus* y *S. aureus.*

1.2.1.1 Características morfológicas y bioquímicas

Los estafilococos son bacterias Grampositivas, esféricas, inmóviles con un diámetro aproximado de 0.5 a 1.5 µm, dispuestos en racimos irregulares y colonias redondas, lisas y elevadas en medios sólido, el *S. aureus* puede formar colonias de color gris a amarillo dorado (figura 1.6) y en medios líquidos se observan cocos individuales, pares, tétradas, no forman esporas y se lisan en presencia de fármacos como la penicilina. Crecen con rapidez a 37 °C en condiciones aerobias o de microaerofilia, salvo las especies *S. saccharolyticus* y *S. aureus anaerobius* que se desarrollan en condiciones anaerobias, pero se vuelven aerotolerantes en subcultivos; por su parte *S. aureus* produce diversos grados de hemólisis o β-hemólisis franca.

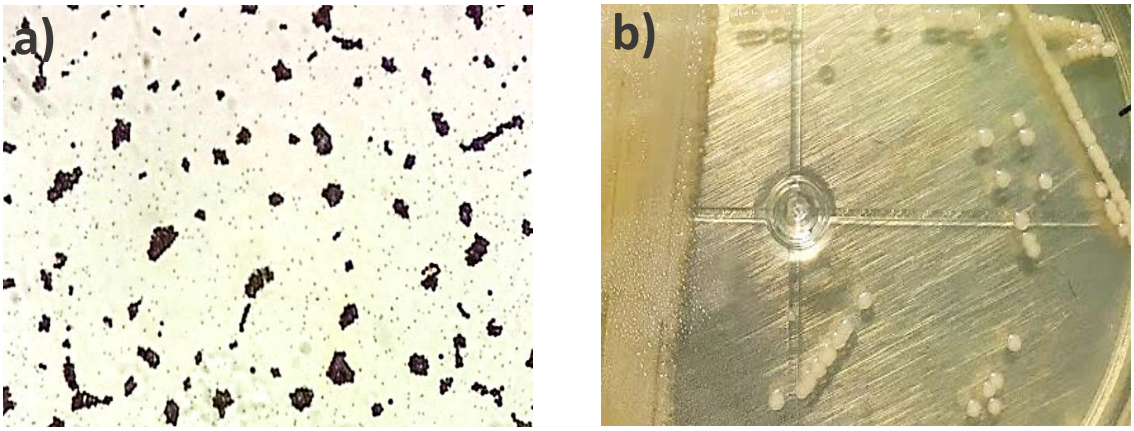

Figura 1.6 Morfología de *Sthaphylococcus aureus.* **a)** Tinción de Gram *S. aureus* cocos Grampositivos en microscopio óptico con un objetivo de 100x. **b)** Colonias de *S. aureus* en una placa de agar BHI después de 24 h de incubación, colonias de color gris amarillo.

Los estafilococos son catalasa positivos (la catalasa es una enzima que permite desdoblar el peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno libre) que permite diferenciarlos de los estreptococos, fermentan lentamente muchos carbohidratos, producen ácido láctico, pero no producen gas, los estafilococos son resistentes a la desecación y al calor *S. aureus* (Brooks y col., 2013).

1.2.1.1.1 Estructura

Los estafilococos como la mayoría de las bacterias Grampositivas; poseen una pared celular compuesta de peptidoglucano y ácidos teicoicos. Los ácidos teicoicos son polímeros compuestos por ribitol y N-acetil-glucosamina (polisacárido A) y son específicos de especie; están unidos al peptidoglucano a los lípidos presentes en la membrana celular por enlace covalente. Las cepas de *S. aureus* a excepción de las cepas coagulasa negativos, se encuentran recubiertos por proteína A, la cual permite la identificación de *S. aureus* por una prueba específica de aglutinación de anticuerpos monoclonales. Los estafilococos poseen además membrana citoplasmática; que sirve como barrera osmótica para la célula, además algunas cepas de *S. aureus* están recubiertas por una capa de polisacáridos externos denominada cápsula mucoide, que le confiere una mayor capacidad de adherencia, así como un aumento del efecto anti-fagocítico (Segura Pérez, 2018).

1.2.1.1.2 Cultivo e identificación

Los aislados de *S. aureus* crecen en medios de cultivo no selectivos como el agar sangre, chocolate, BHI (infusión cerebro corazón por sus siglas en inglés) y en medios selectivos con alta salinidad (7.5% NaCl) como el agar sal y manitol o medio Chapman y se incuban por un periodo de 18 a 24 horas a 37 °C. Para la identificación de *S. aureus,* se realiza una tinción de Gram, pruebas bioquímicas como la prueba de catalasa, coagulasa, y fermentación de glucosa (para diferenciar del género *Micrococcus* que no fermenta glucosa), la prueba de DNAasa termostable y otras pruebas específicas como la fermentación positiva de manitol y la producción de fosfatasa alcalina; además pueden identificarse por medio de técnicas moleculares como el PCR, que utilizan genes específicos de especie (Cervantes y col., 2014).

1.2.1.1.3 Patogenia

Se considera que entre el 20 y 50% de la población mundial es portadora de *S. aureus* en fosas nasales y el 30% forma parte de la piel y tracto gastrointestinal del individuo, pero al haber ruptura mecánica de las células, puede producirse una infección con microorganismos propios del individuo; aunque también pude manifestarse por contaminación directa de una herida, mayormente vistas en infecciones nosocomiales a través de una herida posoperatoria o traumatismo como la osteomielitis crónica subsiguiente a una fractura en donde el foco primario de infección suele ser un vaso sanguíneo, lo que desencadena necrosis del hueso y supuración crónica. Así *S. aureus* puede ser causa de neumonía, meningitis, empiema, endocarditis septicemia con formación de pus en cualquier órgano (Brooks y col., 2013).

1.2.2 Género *Escherichia*

El género *Escherichia* agrupa a cinco especies *E. blattae, E. fergusonnii, E. hermannii, E. vulneris* y *E. col,i* siendo esta última la de mayor importancia para el humano, debido a las cepas que causan padecimientos extraintestinales.

1.2.2.1 Escherichia coli

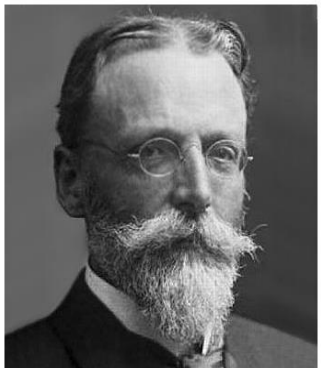

Figura 1.7 Theodor Escherich.

En 1885 el pediatra alemán Theodor Escherich (Figura 1.7) aisló y describió al *Bacilus coli* o *Colibacilo* (tiempo después se denominaría *Escherichia coli)*, demostrando su presencia como microbiota habitual del intestino, y fue incluida dentro del dominio Bacteria y clasificada en la familia de las enterobacterias.

1.2.2.1.1 Estructura

E. coli es un bacilo Gramnegativo de la familia de las enterobacterias, es una bacteria móvil que posee flagelos, mide 0.5 µm de ancho y 3 µm de longitud, posee membrana citoplasmática y una membrana externa y, entre ambas un espacio periplásmico constituido por una capa de peptidoglucano que le confiere forma, rigidez y resistencia a presiones osmóticas elevadas. Las cepas patógenas de *E. coli* poseen numerosos factores de adhesión, los cuales son determinados por la presencia de fimbrias, que les confiere la capacidad de fijarse de forma específica a un receptor celular. Las fimbrias son filamentos finos de naturaleza proteica dispuestos alrededor de la bacteria y con una terminación que se adhiere al receptor celular por una proteína de la membrana externa denominada intimina, que se une a las células epiteliales propiciando la primera etapa de colonización (Segura Pérez, 2018).

1.2.2.1.2 Cultivo e identificación

Las cepas de *E. coli* son bacilos gramnegativos no son exigentes y fermentan glucosa y lactosa con producción de gas y son anaerobios facultativos, son bacterias mesófila y crece a una temperatura de 35 a 43 °C, crecen en medios con peptona o extractos de carne sin que se les añada cloruro de sodio u otros suplementos, en medios diferenciales como el agar MacConkey fermentan lactosa produciendo colonias de color rosa (figura 1.8), en agar EMB (eosina y azul de metileno por sus siglas en inglés) crecen colonias con un centro grande de color oscuro con un brillo verde metálico iridiscente, *E. coli* es indol positivo, lisina descarboxilasa y fermentación de manitol positiva y produce gas a partir de glucosa, el 90% de las cepas de *E. coli* son positivas para glucurónidasa-β en caldo MUG (4-metilumbeliferil-β-glucurónico), (Brooks y col., 2013).

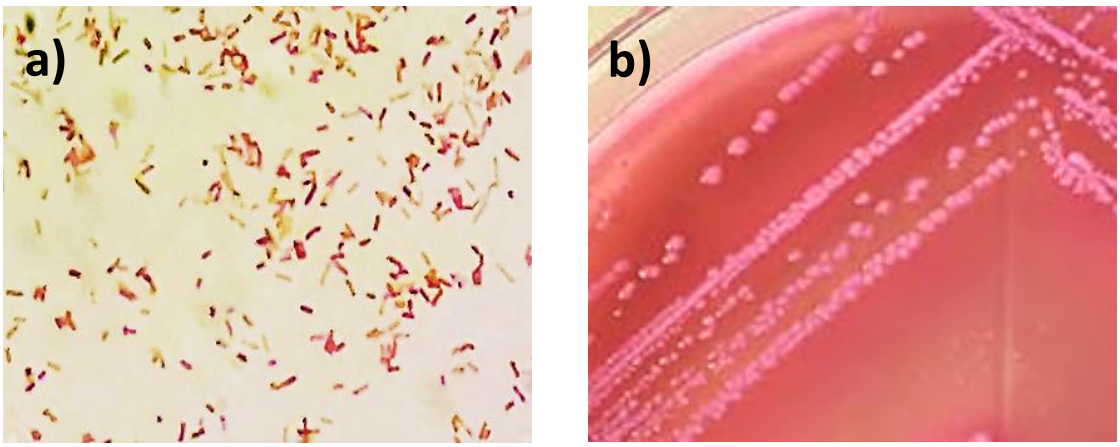

Figura 1.8 Morfología de *Escherichia coli.* **a)** Tinción de Gram *E. coli*, bacilos gramnegativos en microscopio óptico con un objetivo de 100x. **b)** Colonias *E. coli* en una placa de agar MacConkey después de 24 horas de incubación, colonias de color rosa.

1.2.2.2 Patogenia

E. coli es el agente causal más frecuente de infección de las vías urinarias y contribuye a casi 90% de las infecciones urinarias en mujeres jóvenes, además es una causa frecuente de diarrea en todo el mundo. Las cepas de *E. coli* se clasifican según las características de virulencia, y cada grupo causa enfermedades por diferentes mecanismos. Las propiedades de adherencia a las células epiteliales del intestino delgado o grueso son codificadas por genes presentes en los plásmidos. Asimismo, sus toxinas a menudo son mediadas por plásmidos o fagos. En la tabla 1.4 se muestran las principales cepas patógenas de *E. coli* (Brooks y col., 2013).

Tabla 1.4 Cepas patógenas de *E. coli*.

Patógeno	Factores de patogenicidad	Síntomas
***E. coli* enteropatógena (EPEC)**	Se adhiere a las células de la mucosa del intestino delgado. Mediado por cromosomas.	Diarrea líquida espontánea principalmente en lactantes, pero puede ser crónica.
***E. coli* enterotoxigénica (ETEC)**	Adherencia a las células epiteliales del intestino delgado, algunas cepas producen una exotoxina termolábil (LT), sujeta a control genético de un plásmido.	Diarrea del viajero. La luz intestinal se distiende con líquido y sobreviene hipermotilidad y diarrea por varios días.
	Algunas cepas pueden producir enterotoxina termoestable (ST) bajo control de un grupo heterogéneo de plásmidos y también pueden producir LT.	Diarrea de mayor gravedad

E. coli de toxina Shiga (STEC)	*E. coli* O157:H7. Producción de citotoxinas Shiga 1 y 2	Colitis hemorrágica, diarrea grave con síndrome hemolítico urémico, y puede desencadenar insuficiencia renal aguda, anemia hemolítica microangiopática y trombocitopenia.
E. coli enteroinvasiva (ELEC)	Invaden las células epiteliales de la mucosa intestinal.	Disentería grave, cólico, fiebre, náuseas y vómitos.
E. coli enteroagresiva (EAEC)	Produce toxina similar a ST y una hemolisina.	Diarrea aguda y crónica. Causante de las enfermedades transmitidas por alimentos.

1.3 Agentes antimicrobianos

Los agentes antimicrobianos son aquellos utilizados para destruir o diezmar el crecimiento de las bacterias responsables de procesos infecciosos, actúan sobre la estructura de la célula bacteriana y sobre sus procesos metabólicos; algunos de sus posibles mecanismos de acción son desnaturalización de proteínas, ruptura de la membrana o pared celular, remoción de grupos sulfhídrilo libres, interferencia con reacciones enzimáticas de los microorganismos y acción sobre del ADN.

La eficacia de estos agentes está condicionada por varios factores como la concentración y naturaleza del agente, la concentración y características de la población bacteriana, la duración del contacto entre el agente y los microorganismos, la presencia de material orgánicos y la temperatura y pH a la que se realiza el proceso.

Los agentes inorgánicos como los iones y óxidos metálicos han cobrado gran interés para su aplicación en la industria por su resistencia a condiciones extremas, al contario de los agentes orgánicos que son sensibles a altas temperaturas y presión. En la tabla 1.5 se presentan los agentes antimicrobianos orgánicos e inorgánicos (León Vallejo, 2019).

Tabla 1.5 Agentes antimicrobianos orgánicos e inorgánicos.

Naturaleza	Agente bactericida	Mecanismos contra microorganismos	Microorganismos
Orgánicos	Aceites esenciales	Inhibición de la biosíntesis de ácidos nucleicos o de la pared celular. Daño a la membrana celular. Interferencia con procesos metabólicos esenciales	*Aspergillus flavus, Bacillus cereus, Escherichia coli, Listeria monocytogenes*
	Ácidos	Inhibición del crecimiento bacteriano	*Escherichia coli*
	Compuestos fenólicos	Destrucción de la pared y la membrana celular	*Salmonella typhymurium, Listeria monocytogenes, Escherichia coli, Salmonella entenderitidis, Staphylococcus aureus y Streptococcus faecalis*
	Polisacáridos	Destrucción de membrana internas y externas de la bacteria, inhibidor del desarrollo microbiano	*Aspergillus niger, Diplococcus pneumonie, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Salmonella typhimurium.*
Inorgánicos	TiO_2	Destrucción de membrana celular por catálisis	*Pseudomona aureuginosa, Diplococococcus pneumonie, Staphylococcus aureus*
	Ag	Destrucción de membrana celular y/o enlace con grupo de enzimas celulares	Amplio espectro
	Au	Las partículas metálicas pueden cambiar la vía del metabolito y el mecanismo de liberación de células bacterianas	*Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus y Micrococcus luteus*
	Zno	Inhibición del crecimiento bacteriano al desintegrar la membrana celular	*Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Campylobacter jejuni, Escherichia coli.*
	Cu	Desnaturalización de proteínas de la célula	*Campylobacter jejuni, Proteus* spp., *Escherichia coli, Staphylococcus aureus y Pseudomonas aeruginosa*
	Agentes basados en Ga	Inhibición del metabolismo celular	*Clostridium difficile*
	Zeolitas	Desactivación de enzimas vitales	*Pseudomona aureuginosa, Prevotella intermedia, Staphylococcus aureus, Streptococcus mutans, y Streptococcos sanguis*
	Arcillas catiónicas	Destrucción de la membrana celular	*Escherichia coli*
	Arcillas aniónicas	Ataque al grupo carbonilo de los enlaces peptídicos de la célula bacteriana. Desnaturalización de proteínas.	*Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis var. niger, Enterobacter aerogenes, Salmonella entérica.*

1.3.1 Cobre (Cu)

El cobre está involucrado en la formación de la hemoglobina y es esencial para el desarrollo y mantenimiento de huesos, tendones, tejido conectivo mielina y sistema vascular, la mielina está formada por fosfolípidos cuya síntesis depende de la citocromo C oxidasa, que es una enzima dependiente de cobre, además está involucrado en la actividad de ferroxidasa, y puede servir como base para un control preciso del flujo de hierro a los diferentes tejidos. La deficiencia de cobre en el organismo se manifiesta como una anemia moderada a grave, edemas, desmineralización ósea, deficiencias en el crecimiento, anorexia y vulnerabilidad a las infecciones. Además el cobre posee propiedades biocidas y es utilizado en superficies para inhibir bacterias ya que los microorganismos son altamente susceptibles a él (González y col., 2016).

1.3.1.1 Mecanismo de acción del cobre

El mecanismo de acción del cobre (Figura 1.9) aún es estudiado, varios autores proponen que la muerte celular causada por la presencia de cobre se debe a un mecanismo multifactorial, ya que posee propiedades que contribuyen a su efecto citotóxico. El cobre tiene la habilidad de donar y aceptar electrones y cambiar su estado de oxidación entre Cu^{+} y Cu^{2+}, esto le permite actuar como un catalizador para la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), como son los radicales hidróxido y los aniones superóxidos. Estas ROS tienen el potencial de causar daño oxidativo a los constituyentes vitales de la célula como son las proteínas, ácidos nucleicos y lípidos de la membrana celular. Los iones de cobre libres pueden competir principalmente con los iones de zinc libres u otros iones metálicos por los sitios de unión a proteínas, provocando un cambio conformacional y la perdida de la función de las proteínas. Los iones de cobre también pueden inactivar proteínas dañando los grupos Fe-S en las enzimas citoplasmáticas necesarias para producir aminoácidos (O´Gorman y col., 2012).

1.3.1.2 Resistencia al cobre

El cobre es un micronutriente esencial que a altas concentraciones es tóxico, los microorganismos han desarrollado sistemas complejos para mantener precisos niveles de

cobre intracelular como son: bombas de intercambio iónico, una barrera permeable, secuestro de iones de cobre intra y extracelular y reducción de la sensibilidad de los objetivos celulares de los iones de cobre (Borkow y col., 2005). A su vez los genes responsables de este proceso pueden ser codificados por plásmidos transmisibles, la posible aparición de cepas bacterianas resistentes al cobre es reducida debido a la alta tasa de inhibición y la degradación de ADN que provoca el cobre en la célula (Grass y col., 2011).

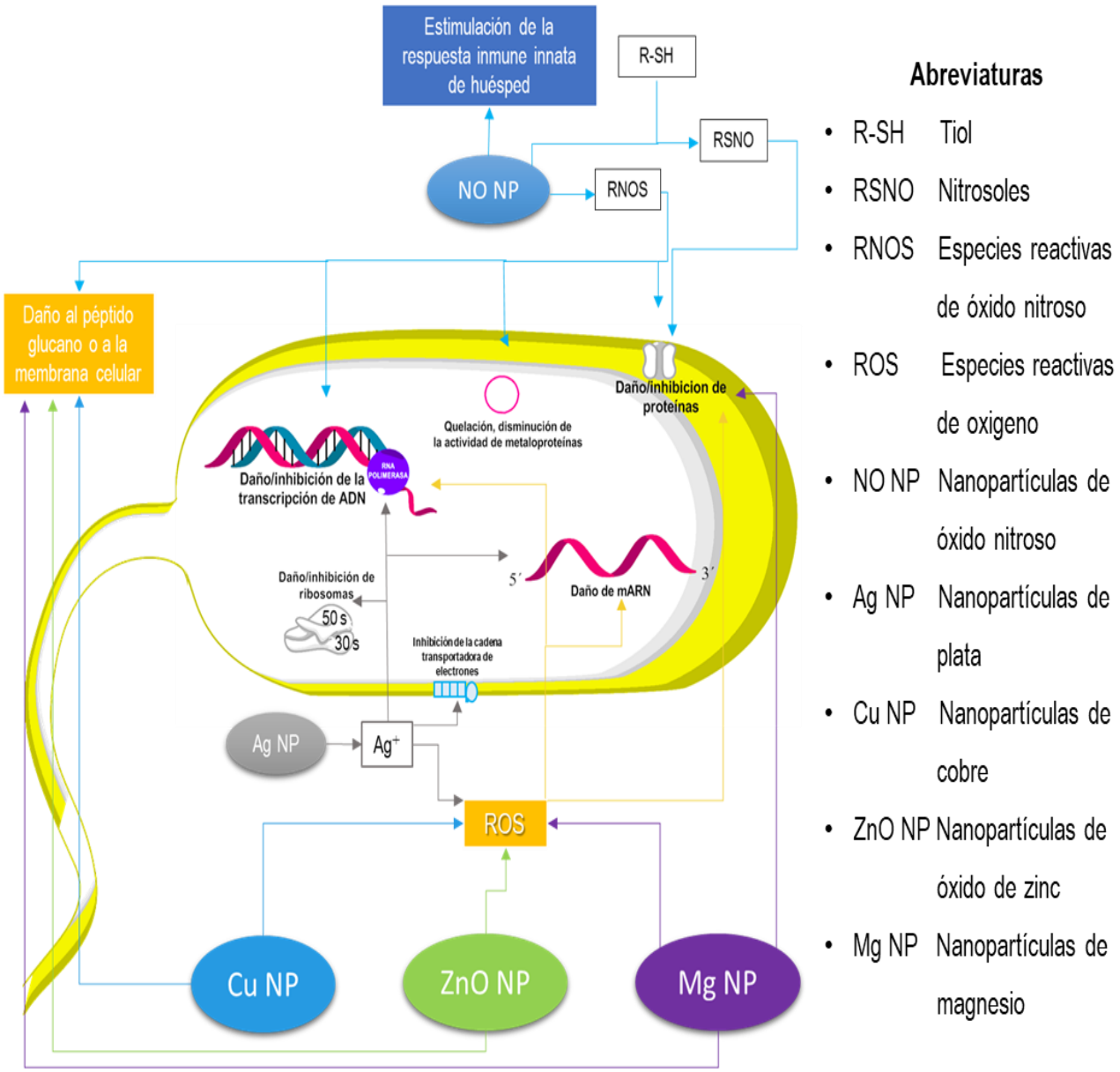

Figura 1.9 Mecanismo de acción de diferentes nanopartículas metálicas contra células bacterianas (Pelgrift y col., 2013).

1.3.1.3 Dosis y toxicidad

El cobre es uno de un grupo pequeño de los elementos metálicos que son necesarios para la salud de los humanos. El cuerpo de un adulto promedio contiene ente 1.4 a 2.1 mg/kg, y el exceso de cobre ingerido es enviado a la vesícula biliar y excretado por vía fecal (Borkow y col., 2005). La absorción enteral del cobre se estima en 0.12 a 0.15 mg/kg/día en infantes, y se ve afectada por la ingesta del zinc (Griffin y col., 2013). En 2003, Arancibia y col. reportaron que el dispositivo intrauterino de cobre libera de 0.25 a 0.80 mg/día de Cu^{2+}, lo cual resulta en daño del tejido uterino, el cual es removido durante la menstruación (Arancibia y col., 2003). Por su parte Cao y col. en 2012 determinaron la dosis letal 50 (LD50) en 0.46 mg/mL en fibroblastos de ratones L929 (Cao y col., 2012).

1.3.1.4 Aplicaciones del cobre

El cobre es considerado seguro para el uso humano, lo cual es demostrado por el uso generalizado y prolongado de dispositivos intrauterinos de cobre, debido a la baja sensibilidad de la piel y otros tejidos al cobre, además ha sido usado debido a su efectividad bacteriostática en pinturas, que reduce significativamente el número de microorganismos en las superficies cubiertas. Recientemente se ha usado el cobre como un inhibidor bacteriano en varias etapas del procesamiento de alimentos en forma de superficies.

Se han desarrollado nuevas tecnologías para dopar fibras textiles con cobre para producir telas con diferentes aplicaciones como ropa asociada al área médica para reducir infecciones nosocomiales, pues se ha demostrado que las sabanas en contacto directo con la piel de los pacientes es una fuente importante de infección, además se pueden fabricar calcetas o calcetines con telas impregnadas de cobre para el tratamiento del pie diabético, el cual es causado por ulceraciones, rapaduras o cortes en la piel que pueden ser infectadas y causar la muerte de tejido circundante y causar la amputación, así el uso de este tipo de tecnología reduciría altamente el riesgo de infección y amputación del pie.

Además, las propiedades bacteriostáticas del cobre han permitido probar su capacidad en sistemas de purificación de agua, ya que se ha demostrado que el cobre es uno de los metales más tóxicos para bacterias heterotróficas en ambientes acuosos (Borkow y col.,

2005). Actualmente se continúan estudiando las propiedades bactericidas del cobre en la industria de acuicultura, agricultura y sobre todo en la industria médica.

1.3.2 Neem (*Azadirachta indica, A. Juss*)

La *Azadirachta indica (A. Juss)* o neem es un árbol comúnmente encontrado en la India, África y América, en México fue introducido en 1989 con éxito debido a que se adapta y crece bien zonas de clima tropical y subtropical, siendo usado por más de 400 años por sus efectos medicinales (Girish y col., 2008). Del árbol de neem se obtienen diversos productos, lo que permite un máximo aprovechamiento de sus recursos en comparación a otros árboles, es considerado inofensivo para los humanos, animales, aves y ha sido aprobado por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (Pankaj y col., 2011).

1.3.2.1 Aceite de neem

El aceite de semillas de neem es un líquido viscoso de color café y con un ligero olor a ajo, está constituido por varios principios activos con gran capacidad antibacteriana como son la azaradiractina que se ha demostrado que posee un efecto inhibitorio contra *E. coli* (Pantoja y col., 2007), el nimbidin que inhibe completamente el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* (Murthy y col., 1958), un derivado del nimbidin, el nimbolide ha demostrado actividad antibacterial contra *S. aureus* y *S.* coagulasa-negativo (Pankaj y col., 2011) y el mahmoodin aislado del aceite de semillas de neem ha presentado capacidad antibacteriana contra algunas bacterias patógenas humanas (Devacumar y col., 1993).

1.3.2.1.1 Obtención del aceite de neem

El aceite de neem es obtenido por medio del proceso de prensando en frio de las semillas del árbol, aunque la obtención de aceite es menor, este es el proceso de elección debido a que, por medio de este, es más fácil preservar los nutrientes y principios activos presentes en las semillas.

El proceso comienza con la fase de **limpieza**, en la que se hace pasar las semillas por una serie de espacios con sistemas de aire a propulsión para separar el interior de la semilla, de los restos de pulpa u otras impurezas. Al obtener la semilla limpia, continua el proceso de **molturación** en donde se tritura la semilla entre ruedas de granito o acero inoxidable hasta conseguir una pasta semisólida. La pasta semisólida se **prensa** para conseguir que expulse todo el aceite que contiene. Es uno de los momentos más importantes de todo el proceso, ya que esta presión puede hacer que aumente la temperatura de la masa. Si sobrepasa los 45 °C, el aceite puede perder algunas de sus propiedades, posteriormente se inicia el proceso de **filtrado,** en donde el aceite ya prensado pasa por una serie de filtros para separar las impurezas. Una vez finalizado el filtrado, se realiza un proceso de **decantación**, en el que, por efecto de la gravedad, los sedimentos restantes del fruto se separaran del aceite. En este método de obtención de aceite, se debe utilizar una gran cantidad de frutos y semillas, los residuos resultantes del proceso se utilizan para alimentar a animales o como abono. En la figura 1.10 se muestra el proceso del prensado en frio del aceite.

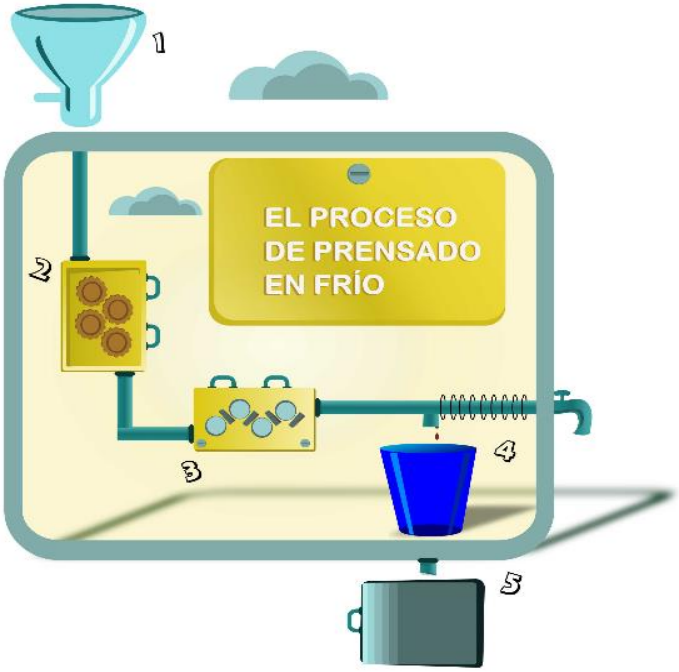

Figura 1.10 **Proceso de prensado en frio:** 1. Limpieza, 2. Molturación, 3. Prensado, 4. Filtrado, 5. decantación.

1.3.2.2 Aplicaciones del neem

Entre los usos conocidos de sus productos se encuentra su aplicación como anticonceptivo, Khillare y col., demostraron en 2003 que el extracto acuoso de las hojas de neem, inmovilizan y eliminan a los espermatozoides en humanos, también se ha reportado que una aplicación intrauterina de 100 µL de aceite de neem induce un bloqueo de pre-implantación que es reversible después de 5 o 6 meses. Otra aplicación de reciente interés farmacológico es el efecto antiplasmodial ya que ha demostrado inhibir el desarrollo y crecimiento de cepas de *Plasmodium falciparum.* Hay varios reportes del efecto antiviral, antifúngico y antibacterial de los compuestos presentes en los extractos de neem contra *E. coli, Streptococcus mutans,* el virus del dengue tipo 2 y algunos hongos como son *Aspergillus* spp y *Candida* spp.; Se ha encontrado que posee además propiedades antihiperglucemientes e insecticidas entre otras propiedades de aplicación biológica (Sunday y col., 2009).

1.4 Antecedentes

1.4.1 Estudios realizados sobre bacterias e hidroxiapatitas con cobre

Hay varias limitaciones para el uso de la HA pura, incluyendo la falta de actividad antimicrobiana que diezma la estabilidad del implante, por otro lado, en los últimos años se ha investigado la incorporación de cationes inorgánicos como la plata (Ag^{+}), cobre (Cu^{2+}), zinc (Zn^{2+}) y titanio (Ti^{4+}) como agentes antimicrobianos (Heidenau y col., 2005)

En estudios anteriores se ha comparado el efecto bactericida de HA sustituidas con Ag^{+}, Cu^{2+} y Zn^{2+} contra *Escherichia coli,* en donde la Ag-HA, mostro un claro efecto bactericida, mientras HA-Cu y HA-Zn no mostraron un efecto significativo (Kim y col., 1998).

Miyaji y col., 2005 estudiaron la sustitución progresiva del Zn en HA y observaron que a mayor sustitución de Zn el producto obtenido cambia de una HA sustituida con Zn a una fase amorfa, por lo cual sugieren un límite de sustitución de Zn en HA de 15 mol%.

Chung y col., en 2006 encontraron que el método de sol-gel es viable para la preparación de HA-Zn y probaron que son necesarias más de 1000 ppm de Zn^{2+} para observar el efecto antimicrobiano.

Stanic y col., en 2010 estudiaron la sustitución de Cu y Zn en la HA, así como los efectos antimicrobianos con *E. coli, S. aureus* y *Candida albicans* mediante pruebas en sólido y líquido. Concluyeron que en la prueba de difusión en agar la muestra de Cu-Ha mostraba efecto antimicrobiano en *E. coli* y en *C. albicans* y para las pruebas en medio líquido de las muestras que contenían Cu y Zn en la HA presentaron reducción en la población de los microorganismos de las cepas evaluadas.

1.4.2 Estudios realizados sobre bacterias y aceite de neem

El aceite de semillas de neem está constituido por terpenoides con gran capacidad antibacteriana, entre ellos la azaradiractina que se ha demostrado que posee un efecto inhibitorio contra *E. coli* (Pantoja y col., 2007).

Murthy y col.,en 1958 demostraron mediante pruebas in vitro que el nimbidin inhibe completamente el crecimiento de *M. tuberculosis* y que también es bactericida.

Khalid y col., en 1989 reportaron que un derivado del nimbidin, el nimbolide, ha demostrado actividad antibacterial contra *S. aureus* y *S.* coagulasa-negativo, además de poseer actividad antimalárica contra *P. falciparum*.

Devacumar y col., 1993 indicaron que el mahmoodin, un dioxigenoide aislado del aceite de semillas de neem, posee capacidad antibacteriana moderada contra algunas bacterias patógenas que afectan principalmente a humanos.

2 DESARROLLO EXPERIMENTAL

En el siguiente capítulo se describirán las técnicas, reactivos y condiciones utilizadas para la síntesis de los compuestos tipo hidroxiapatita y de los compósitos HA/Neem, así como también la metodología usada para evaluar su efecto bactericida.

2.1 Síntesis de materiales

En la tabla 2.1 se muestran los reactivos empleados para la síntesis de HA y los compósitos.

Tabla 2.1. Reactivos empleados para la síntesis de hidroxiapatita.

Reactivos	Masa molar (g/mol)	Pureza (%)	Marca
$Ca(OH)_2$	74.1	97.1	J.T. Baker
H_3PO_4	98.0	85	J.T. Baker
$Cu(NO_3)_2{\cdot}2.5H_2O$	232.59	98	Sigma-aldrich
EtOH	46.07	96	Medinatural
Aceite de neem (azaradictina)	720.20	35	ActiNEEM

2.1.1 Síntesis de hidroxiapatita de referencia

La síntesis de HA con relación metálica molar de 1.67 Ca:P, fue preparada por el método de coprecipitación. El método general de síntesis consistió en la coprecipitación simultanea gota a gota de una suspensión de $Ca(OH)_2$ al 2 M y una dilución de H_3PO_4 al 0.8 M, ambas preparadas con agua desionizada y manteniendo un pH constante de 9. El compuesto resultante se trató en un equipo de ultrasonido (BRANSON 5510) durante 30 minutos, con una frecuencia de 40 kHz y a una temperatura de 25 °C, los sólidos se decantaron y lavaron con agua desionizada (250 mL:1 g), hasta obtener pH constante de 8. El precipitado obtenido se secó a una temperatura de 60 °C por 24 horas y posteriormente se pesó y almacenó en un recipiente hermético.

2.1.2 Síntesis de hidroxiapatitas con Cobre

La síntesis de HA conteniendo cobre de diferente relación metálica molar Ca:Cu (9:1, 8.5:1.5 u 8: 2), se llevaron a cabo como el procedimiento anteriormente descrito con la variante de disoluciones de $Cu(NO_3)_2$ al 2 M preparadas con agua desionizada, y estas se

añadieron al H_3PO_4 al 0.8 M debido a la similitud de pH. El compuesto resultante se trató en un reactor de ultrasonido (BRANSON 5510) durante 30 minutos, con una frecuencia de 40 kHz y a una temperatura de 25 °C, los sólidos se decantaron y lavaron con agua desionizada, hasta obtener pH constante de 8. El precipitado obtenido se secó a una temperatura de 60 °C por 24 horas y posteriormente se pesó y almacenó en un recipiente hermético. En la tabla 2.2 se muestran las condiciones de síntesis para las muestras de HA con cobre con tratamiento de ultrasonido.

Tabla 2.2 Tabla de condiciones de síntesis con tratamiento de ultrasonido

Clave	Composición	Relación metálica molar	Síntesis			
			pH	Ultrasonido		
				T (°C)	t (min)	frecuencia (kHz)
HA	Ca:P	1.67	9	25	30	42
CuHA1	Ca:Cu	9:1				
CuHA1.5		8.5:1.5				
CuHA2		8:2				

2.1.3 Síntesis de hidroxiapatita de referencia con aceite de neem

La HA con aceite de neem fue preparada por el método de coprecipitación. Se preparo una dispersión de aceite de neem en etanol 1:50 en volumen y se coprecipitaron junto con una solución de $Ca(OH)_2$ al 2 M y H_3PO_4 al 0.8 M a un pH constante de 9. El compuesto resultante se trató en un reactor de microondas (modelo MIC 5 marca PRENDO) durante 10 minutos, con una potencia de 360 W y a una temperatura de 80 °C, los sólidos se decantaron y se lavaron con agua desionizada, hasta obtener un pH constante de 8. El precipitado obtenido se secó a una temperatura de 50 °C por 36 horas, posteriormente se pesó y se almacenó en un recipiente hermético. En la tabla 2.3 se muestra las condiciones de síntesis de las muestras con aceite de neem por irradiación con microondas.

2.1.4 Síntesis de hidroxiapatitas con cobre con aceite de neem

Para la síntesis de hidroxiapatitas conteniendo cobre de diferente relación metálica molar Ca:Cu (9:1, 8.5:1.5 u 8: 2) con aceite de neem, se prepararon dispersiones de aceite de neem

en etanol 1:50 en volumen y se coprecipitaron junto con una solución de $Ca(OH)_{2\ al}$ 2 M y la mezcla de $Cu(NO_3)_2$ al 2 M y H_3PO_4 al 0.8 M a un pH constante de 9. El compuesto resultante se trató en un reactor de microondas (modelo MIC 5 marca PRENDO) durante 10 minutos, con una potencia de 360 W y a una temperatura de 80 °C, los sólidos se decantaron y se lavaron con agua desionizada, hasta obtener un pH constante de 8. El precipitado obtenido se secó a una temperatura de 50 °C por 36 horas, posteriormente se pesó y se almacenó en un recipiente hermético. En la tabla 2.3 se muestra las condiciones de síntesis de las muestras con aceite de neem por irradiación con microondas.

Tabla 2.3 Condiciones de síntesis de hidroxiapatitas con aceite de neem por irradiación con microondas.

Clave	Composición	Relación metálica molar	Síntesis			
			pH	Microondas		
				T (°C)	T (min)	Potencia (W)
Neem/HA	Ca:P	1.67	9	80	10	360
Neem/CuHA1	Ca:Cu	9:1				
Neem/CuHA1.5		8.5:1.5				
Neem/CuHA2		8:2				

En la Figura 2.1 se presenta el procedimiento de síntesis por coprecipitación simultanea asistida por ultrasonido o microondas.

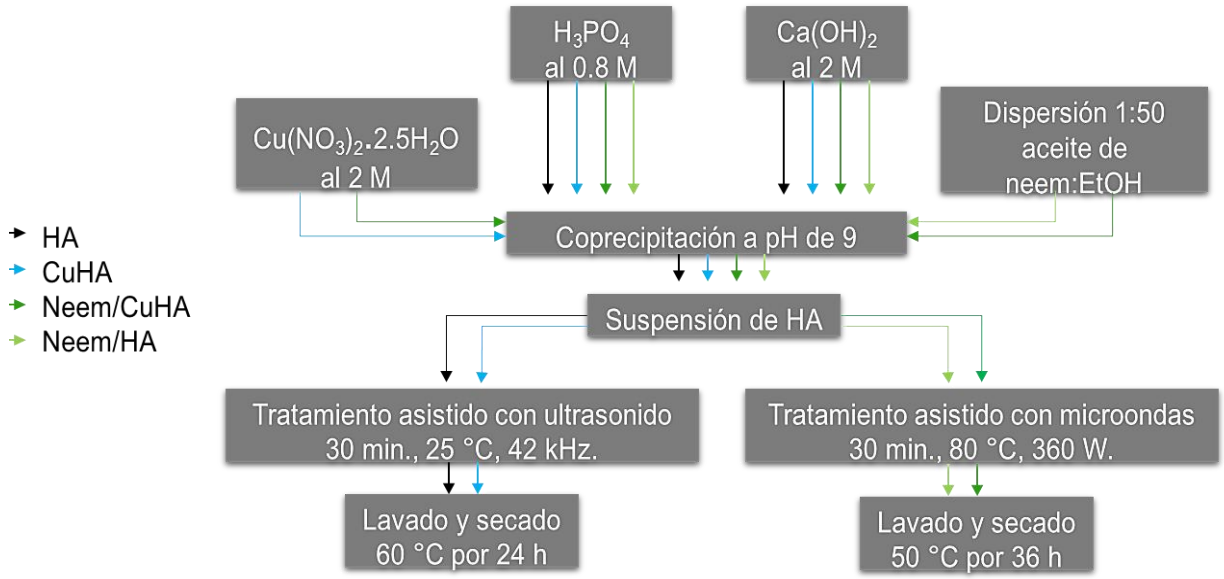

Figura 2.1 Diagrama de proceso de síntesis de hidroxiapatitas.

2.2 Evaluación antimicrobiana de las hidroxiapatitas

El estudio de sensibilidad bacteriana de dos cepas bacterianas de la American Type Culture Collection (ATCC), una Gram negativa *E. coli (*ATCC 25922,) y una Gram positiva *S. aureus (*ATCC 29213), se realizó por el método de difusión en pozo adaptado con suspensiones de hidroxiapatitas de referencias e hidroxiapatitas con aceite de neem en pozos de 6 mm de diámetro y 1 mm de profundidad. Las hidroxiapatitas de referencia e hidroxiapatitas con aceite de neem utilizadas para la determinación de la sensibilidad bacteriana se presentan en la tabla 2.4, para el estudio se usó una concentración de 20 mg de cada muestra.

Tabla 2.4 Muestras de hidroxiapatitas.

Clave	Composición Ca:Cu
HA	1.67 (Ca:P)
CuHA1	9:1
CuHA1.5	8.5:1.5
CuHA2	8:2
HA/Neem	1.67
CuHA1/Neem	9:1
CuHA1.5/Neem	8.5:1.5
CuHA2/Neem	8:2

2.2.1 Método de difusión en pozo

2.2.1.1 Suspensión de hidroxiapatitas

Se pesaron 20 mg de cada muestra en tubos Eppendorf de 1 mL de capacidad y se adicionaron 20 µL de una dilución 1:2 Agua:EtOH utilizando una pipeta (pipet4u® performance, 20-200 µL de capacidad). Para la dilución 1:2 Agua:EtOH se utilizaron 2 mL de agua estéril (PiSA Farmacéutica®) y 1 mL de alcohol etílico al 96% (HYCEL).

2.2.1.2 Suspensión directa de colonias

Se realizó la siembra de las cepas de *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 29213 en placas Petri de agar Infusión Cerebro Corazón (BHI, por sus siglas en inglés), preparadas según las

instrucciones del fabricante (BD DIFCO ™). Las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 h, posteriormente se realizó una suspensión bacteriana ajustada al 0.5 de la escala de McFarland ($1.5x10^8$ UFC), utilizando de 2 a 3 colonias de cada placa suspendidas en 10 mL de solución salina 0.9 estéril (PiSA Farmacéutica®).

2.2.1.3 Método de difusión en pozo

Para la realización de las pruebas se sensibilidad antimicrobiana por el método de difusión en disco se tomaron en cuenta los lineamientos del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2019). Para la evaluación antimicrobiana por el método adaptado de difusión en disco, se hicieron de 4 a 6 pozos con 6 mm de diámetro y 1 mm de profundidad con una varilla de vidrio estéril de borde liso (genérica), posteriormente sumergiendo un hisopo estéril a la suspensión directa de colonias se realizó un extendido masivo en placas de agar Mueller Hinton (MH) preparadas según las instrucciones del fabricante (BD DIFCO ™), las muestras se depositaron en cada pozo en las placas Petri. Las placas fueron incubadas a 37°C por 24 h en aerobiosis para medir las zonas de inhibición obtenidas en milímetros. En la figura 2.2, se presenta el esquema del procedimiento para la evaluación de la actividad antimicrobiana de los materiales por el método de difusión en pozo.

2.2.1.4 Método de difusión en disco

Para la muestra de aceite de neem se impregno un disco de papel filtro estéril (genérico) de 6 mm de diámetro y se colocó sobre la placa. Las placas fueron incubadas a 37°C por 24 h en aerobiosis para medir las zonas de inhibición obtenidas en milímetros.

Figura 2.2 Esquema del método de difusión en pozo para la evaluación de la actividad antimicrobiana de los materiales.

2.3 Métodos de caracterización

2.3.1 Difracción de rayos X (DRX)

El análisis de caracterización de DRX se realizaron con un difractómetro para polvos BRUKER modelo D8 Discover con un detector Linx Eye, utilizando como radiación la línea Kα de cobre (λ=1.54 nm). El tamaño de paso fue de 0.03 con un incremento de 0.3 para un barrido de ángulos 2θ de 5 a 70°. Este análisis permite calcular el valor de la distancia interlaminar **d** utilizando la ley de Bragg ($n\lambda=2d\text{sen}\theta$). Los difractogramas se pueden comparar con las tarjetas clasificadas de Joint Committee of Powder Diffraction Standards (JCPDS).

2.3.2 Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)

Esta técnica permite identificar los principales grupos funcionales que se encuentran en la muestra a analizar. Los análisis se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Nicolet modelo Magna FT-Infrarrojo 750. Las muestras se analizaron en forma de pastillas preparadas con KBr puro (99.999%, Merck) en relación 1:100 en masa.

2.3.3 Espectroscopía de emisión por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES)

La técnica de caracterización ICP-OES es un análisis cuantitativo que permite determinar y detectar de nivel traza a ultra traza la mayoría de los elementos de la tabla periódica. Los análisis se realizaron en un espectrofotómetro de Emisión Óptica marca Varian modelo 730-ES, por medio de la disolución ácida con HCl: HNO_3 relación 1:2.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Difracción de rayos X (DRX)

3.1.1 DRX de las hidroxiapatitas de referencia

La hidroxiapatita presenta picos característicos en la zona angular 5°<2θ<60° con índices de Miller 002, 210, 211, 112, 300 y 130. En la figura 3.1 se presentan los difractogramas de rayos X de la muestras de hidroxiapatita (HA) y las muestras de hidroxiapatita con cobre (CuHA) a diferente relación metálica molar Ca:Cu (9:1, 8.5:1.5 y 8:2) que fueron comparadas con la tarjeta JCPDS 003-0747.

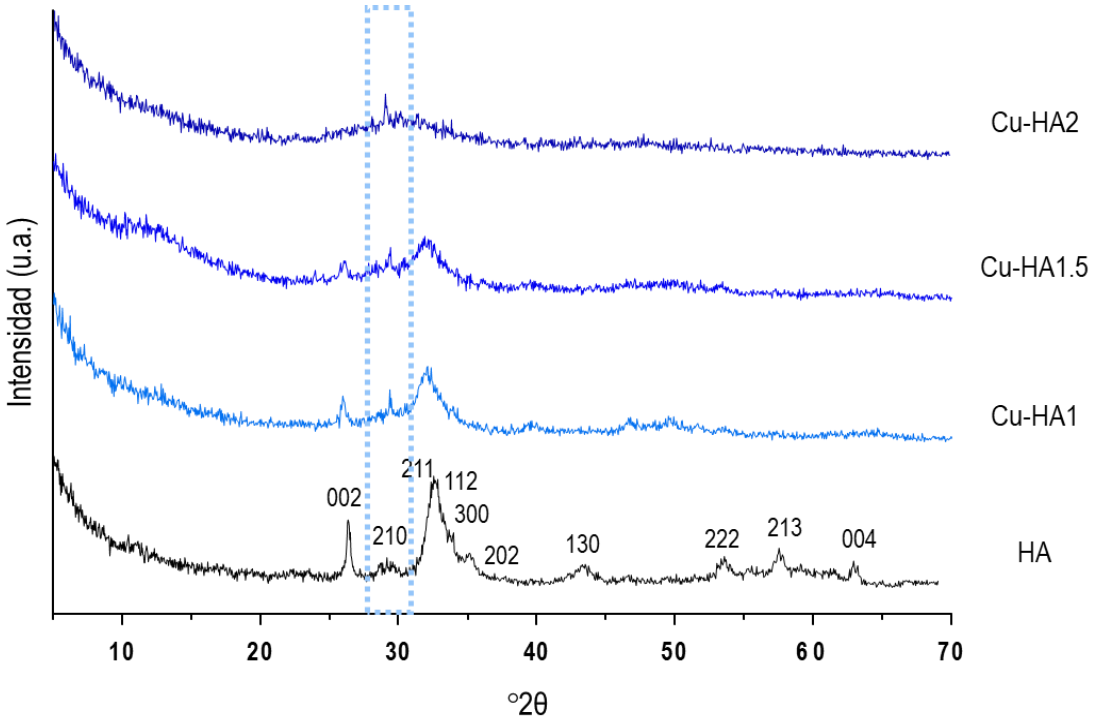

Figura 3.1 Difractogramas de rayos X de las hidroxiapatitas de referencia.

En la muestra HA se observan los planos característicos de la hidroxiapatita, por lo que se obtuvo un material cristalino y sin impurezas, en la muestra CuHA1 y CuHA1.5 se observan los planos característicos de hidroxiapatita, la intensidad de los picos se ve ligeramente disminuida, lo cual puede ser atribuido a la presencia del cobre, la muestra CuHA2 presenta un pico en 29° de 2θ con índice de Miller 210, se observa la presencia de un pico ancho

característico de compuestos amorfos de 30° a 35° de 2θ, los compuestos amorfos exhiben un ordenamiento de átomos de corto alcance, lo cual pude ser causado por la presencia del cobre que provoca la deformación de la red cristalina debido que posee un radio iónico mayor 0.69 Å que el Ca (0.65 Å) y la propiedad de óxido-reducción del ion, por lo tanto la estructura presenta irregularidades y desestabilización, favoreciendo la formación de fosfato β-tricálcico (Segura Pérez, 2018). Todas las muestras fueron obtenidas por el método de coprecipitación simultánea a pH constante de 9 y tratadas con ultrasonido lo cual es un método eficaz y reproducible para obtener materiales cristalinos y puros.

3.1.2 DRX de las hidroxiapatitas con aceite de neem

En la figura 3.2 se presentan los difractogramas de rayos X de las muestras de hidroxiapatita con neem (Neem/HA) y las muestras de hidroxiapatita con cobre y aceite de neem (Neem/CuHA) a diferente relación metálica molar Ca:Cu (9:1, 8.5:1.5 y 8:2) que fueron comparadas con la tarjeta JCPDS 003-0747.

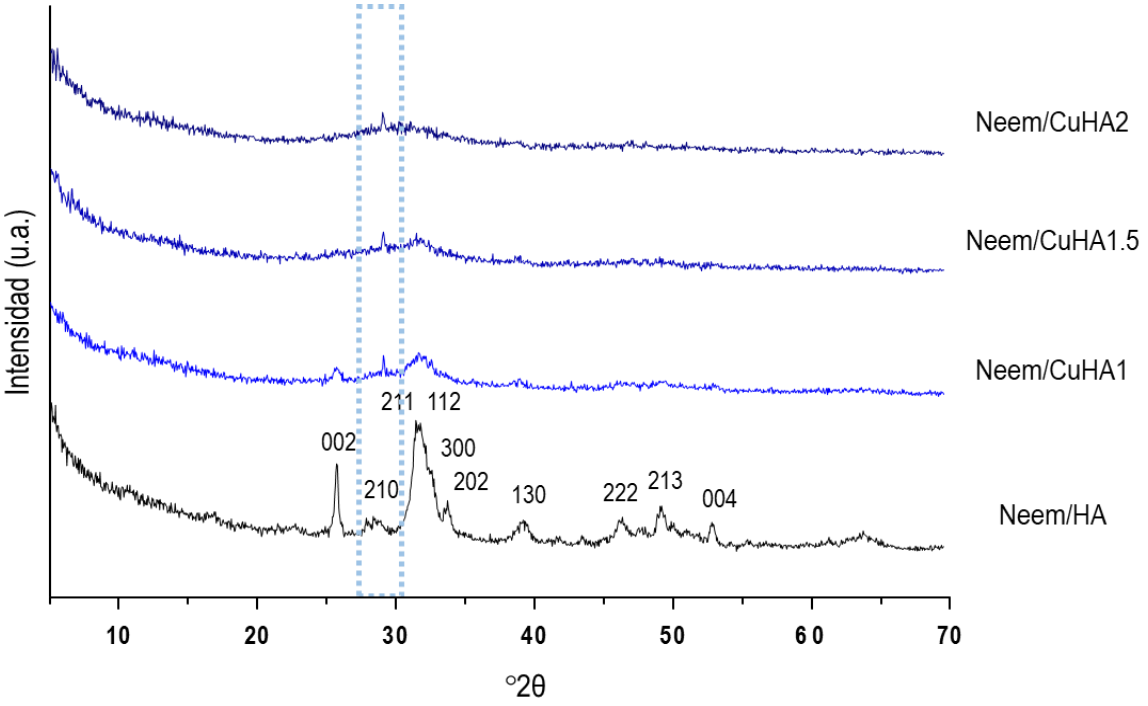

Figura 3.2 Difractogramas de rayos X de las hidroxiapatitas con aceite de neem.

La muestra Neem/HA presenta los planos característicos de la hidroxiapatita, se observan picos bien definidos, por lo que se obtuvo un material cristalino y sin impurezas, la

muestra de Neem/CuHA1 presenta picos característicos de la hidroxiapatita con menor intensidad, las muestras Neem/CuHA1.5 y Neem/CuHA2 presentan un pico a 29° de 2θ con índice de Miller 210, se observa la presencia de un pico ancho característico de compuestos amorfos de 30° a 35° de 2θ, esto puede deberse a la presencia de los compuestos presentes en el aceite de neem, lo que ocasiona una deformación en la estructura cristalina.

3.2 Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)

3.2.1 FTIR de las hidroxiapatitas de referencia

En la figura 3.3 se presenta el espectro de infrarrojo de la muestra HA y las muestras de Cu-HA a diferente relación metálica molar Ca:Cu (9:1, 8.5:1.5 y 8:2) muestran bandas características a las hidroxiapatitas en la zona entre los 4000 y 400 cm^{-1} .

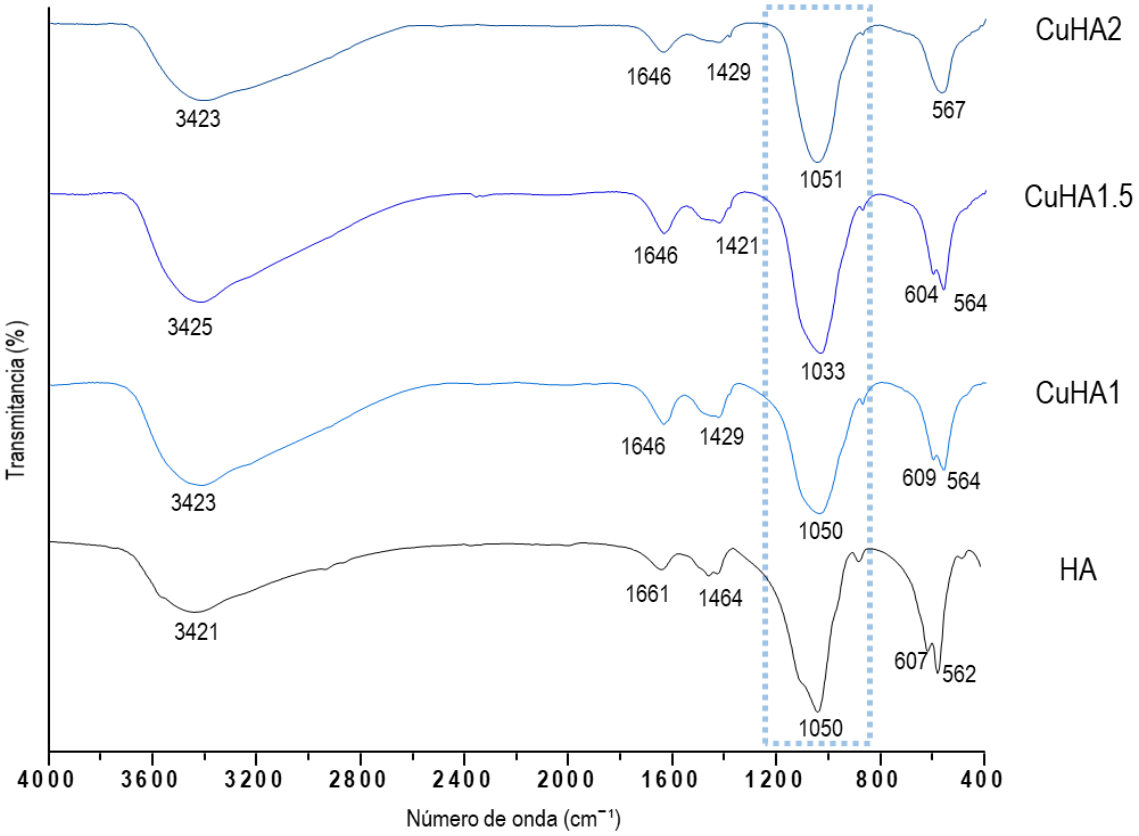

Figura 3.3 Espectro infrarrojo de las hidroxiapatitas de referencia.

Las bandas a 3425 a 3421 cm^{-1} son atribuidas al estiramiento simétrico de los grupos O-H, la banda a 1661 a 1646 cm^{-1} corresponde a la flexión del grupo O-H de la estructura de la

hidroxiapatita y de las moléculas de agua contenidas en las muestras. Las bandas de estiramiento del grupo PO_4^{3-} se encuentran de 1051 a 1033 cm^{-1}, las bandas de 609 a 604 y de 562 a 564 cm^{-1} se atribuyen a las vibraciones de flexión del grupo PO_4^{3-}. La banda de 1464 a 1421 cm^{-1} corresponde a pequeñas cantidades de CO_2 absorbido durante la síntesis de las hidroxiapatitas en condiciones atmosféricas. (Chengfeng y col., 2014). Las muestras sintetizadas a diferente concentración molar Ca:Cu presentan grupos funcionales característicos de la hidroxiapatita, las bandas de 1051 a 1033 cm^{-1} presentan un aumento de intensidad y anchura al aumentar la concentración del cobre pero la presencia de este no modifica la características de las hidroxiapatitas.

3.2.2 FTIR de las hidroxiapatitas con aceite de neem

En la figura 3.4 se presenta el espectro de infrarrojo de la muestras de hidroxiapatita (HA) y las muestras de hidroxiapatita con cobre (Cu-HA) a diferente relación metálica molar Ca:Cu (9:1, 8.5:1.5 y 8:2) sintetizadas con aceite de neem y el aceite de neem.

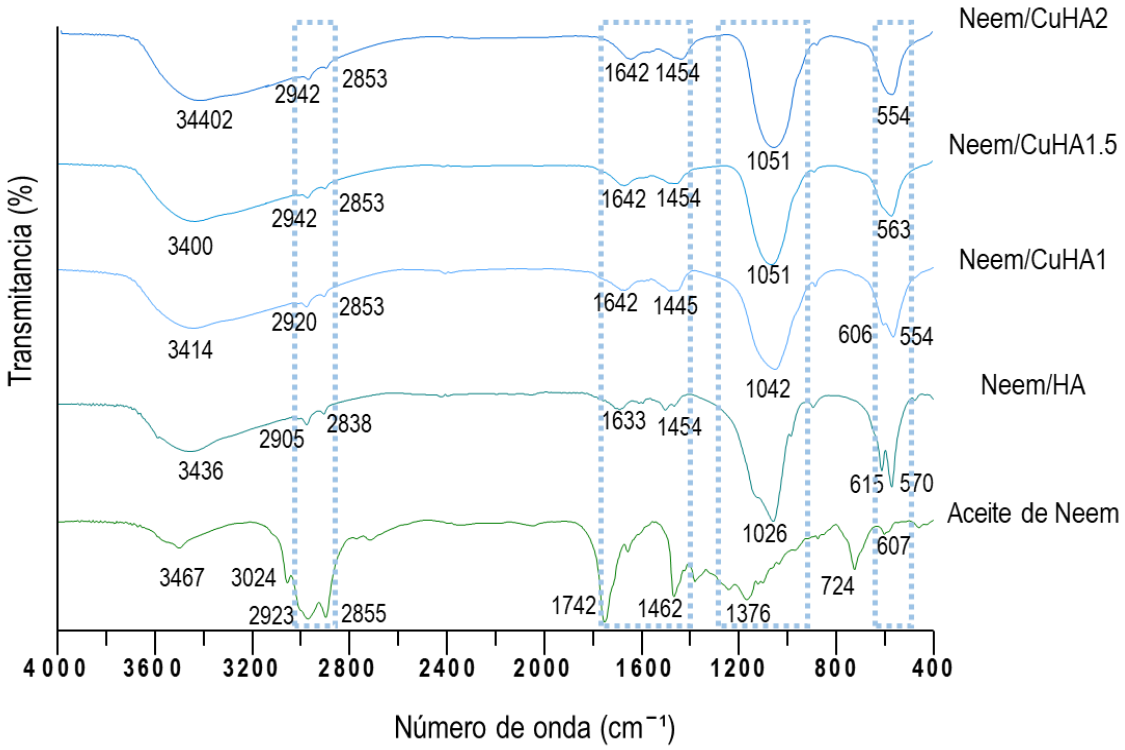

Figura 3.4 Espectro infrarrojo de las hidroxiapatitas con aceite de neem.

El aceite de neem presenta diversos grupos funcionales pertenecientes a los principios activos del aceite. En las bandas a 3024 y 721 cm^{-1} se encuentran las bandas de estiramiento de =C-H y a 2923 y 2855 cm^{-1} aparecen las bandas de estiramiento C-H pertenecientes a los alquenos, las bandas a 1462 cm^{-1} pertenecen a las bandas de estiramiento C-C del anillo de los compuestos aromáticos y las bandas de 1742 corresponden al estiramiento C-O de los grupos ésteres.

En las muestras de Neem/HA y Neem/CuHA (1, 1.5 y 2) presentan bandas características de la composición de la hidroxiapatita, las bandas de 2905 y 2942 cm^{-1} muestran la presencia del aceite de neem en las muestras Neem/HA y Neem/CuHA (1, 1.5 y 2), las bandas a 1742 y 724 cm^{-1} no se observan en las muestras y las bandas a 1462, 1376 se encuentran solapadas por las bandas pertenecientes a la flexión del grupo O-H y estiramiento del grupo PO_4^{3-} de la estructura de la hidroxiapatita y las banda a 607 cm^{-1} se encuentra solapada por la flexión del grupo PO_4^{3-}.

3.3 Composición química de las hidroxiapatitas

En la tabla 3.1 se presenta la composición química elemental y la relación metálica molar obtenida por ICP-OES de las hidroxiapatitas CuHA y Neem/CuHA.

Tabla 3.1 Composición química elemental y relación molar M":P de las hidroxiapatitas determinadas por ICP-OES.

Muestra	Composición teórica		Composición elemental			Relación molar	
	Relación molar Ca:Cu	Relación molar M":P	Ca	Cu	P	Ca:Cu (M^{II})	M":P
			(% en masa)				
HA	10:0	1.67	61.39	0.01	28.19	—	1.68
CuHA1	9:1	1.67	41.94	6.61	18.82	10.06	1.89
CuHA1.5	8.5:1.5	1.67	33.97	8.68	16.05	6.21	1.9
CuHA2	8:2	1.67	32.48	14.31	15.59	3.6	2.06
Neem/HA	10:0	1.67	50.31	0.01	21.64	—	1.80
Neem/CuHA1	9:1	1.67	36.19	5.64	15.01	10.18	2.05
Neem/CuHA1.5	8.5:1.5	1.67	38.39	12.94	17.27	4.71	2.08
Neem/CuHA2	8:2	1.67	33.50	14.94	15.23	3.56	2.18

La relación Ca:P de la muestra HA es similar al de la hidroxiapatita biológica, mientras que la muestra de Neem/HA presenta una composición Ca:P de 1.80, las muestras de CuHA y Neem/CuHA presentan una variación non estequiométrica, ya que presentan una variación de entre el 13 y 30% respecto con la composición de la hidroxiapatita biológica (1.67), y puede ser atribuido a la presencia de carbonatos sustituyendo los iones fosfatos en la estructura (Wu y col., 2016).

Las muestras de CuHA1 y Neem/CuHA1 contienen 6.61 y 5.64% (masa) de cobre por lo que la presencia del aceite de neem no interfiere significativamente en la formación del compuesto, la cantidad de cobre depositada en la estructura de la hidroxiapatita es menor a la esperada estequiométricamente, esto puede deberse a la totalidad del consumo del reactivo limitante previo a agotarse las sales de cobre durante la síntesis.

Las muestras CuHA1.5, CuHA2, Neem/CuHA1.5 y Neem/CuHA2 presentaron una mayor retención de cobre en la estructura del material, la muestra CuHA1.5 retuvo una menor cantidad de cobre en comparación a la muestra Neem/CuHA1.5 (6.21 y 4.71% en masa respectivamente), las muestras CuHA2 y Neem/CuHA1.5 presentan una composición similar Ca:Cu (3.6 y 3.56% en masa respectivamente). Es probable que las altas temperaturas generadas por el efecto de cavitación en el reactor de ultrasonido para el tratamiento de las muestras CuHA y el tratamiento hidrotérmico con irradiación de microondas a las muestras Neem/CuHA junto con las diferencias de calor específico de cada elemento (Cu= 385 y Ca=653 J K^{-1} Kg^{-1}) favorezcan una mayor difusión y acomodo de los cationes en la estructura del material. Estos resultados indican que se puede sustituir una cantidad mayor al 20% de Ca por Cu en la hidroxiapatita.

3.3.1 Concentración de cobre en las hidroxiapatitas

La cantidad presente de cobre en las muestras CuHA y Neem/CuHA son reportadas en la tabla 3.2 se determinó a partir de la composición química elemental obtenida por ICP-OES, el cálculo se obtuvo a partir de la cantidad de Cu presente en 100 g de muestra.

Tabla 3.2 Concentración de cobre en las muestras CuHA y Neem/CuHA determinada por ICP-OES.

Muestras	Cobre (ppm/100g)
HA	0.00
CuHA1	1.32
CuHA1.5	1.74
CuHA2	2.86
Neem/HA	0.00
Neem/CuHA1	1.13
Neem/CuHA1.5	2.59
Neem/CuHA2	2.99

La concentración de cobre presente en un adulto promedio es de 1.4 a 2.1 mg/Kg (Borkow y col., 2005), lo equivalente a 105 ppm en un adulto promedio de 50 kg, de acuerdo con lo anterior las muestras de CuHA2 y Neem/CuHA2 contienen una concentración de 2.86 y 2.99 ppm respectivamente lo que sugiere que no serían tóxicas para su aplicación como biomateriales.

3.4 Evaluación antimicrobiana de las hidroxiapatitas

La evaluación de la actividad antimicrobiana de las HA se llevó a cabo por el método modificado de difusión en disco contra *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 29213. En la tabla 3.3 se presentan los halos de inhibición obtenidos a partir de una concentración 20 mg de cada muestra, la lectura se tomó después de 24 horas de incubación y de acuerdo con los "Estándares de Desempeño para Antimicrobianos: Pruebas de susceptibilidad M100" (CLSI, 2019).

Tabla 3.3 Diámetro de los halos de inhibición contra *S. aureus* y *E. coli*

	Diámetro de los halos de inhibición (mm)								
Muestras 20 mg / Bacterias*	HA C+	CuHA1	CuHA1.5	CuHA2	Neem	Neem/HA	Neem/CuHA1	Neem/CuHA1.5	Neem/CuHA2
E. coli ATCC 25922	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S. aureus ATCC 29213	0	18	16	21	0	0	14	7	16

*Cepas sembradas en agar Müller-Hinton en una concentración al 0.5 en la escala de McFarland, incubadas por 24 horas a 37° C.

Como se puede observar en la tabla 3.3, las muestras evaluadas contra *E. coli* ATCC 25922 no presentaron actividad antimicrobiana, de acuerdo con Pelgrift y col. (2013) algunos microorganismos presentan resistencia a algunos iones metálicos, estos microorganismos usan un mecanismo que reduce la ingesta y/o eflujo de los iones de Cu^{2+} presentes en las muestras, debido a las características de la membrana plasmática o pared celular (figura 3.5a).

Los halos de inhibición obtenidos contra *S. aureus* presentaron formas circulares regulares, las muestras de CuHA1, CuHA1.5 y CuHA2 mostraron halos de entre 16 y 21 mm de diámetro, mientras que las muestras Neem/CuHA1, Neem/CuHA1.5 y Neem/CuHA2 presentaron halos de entre 7 y 16 mm de diámetro, muestras que no contenían cobre como son HA, Neem y Neem/HA no presentaron actividad antimicrobiana (figura 3.5b).

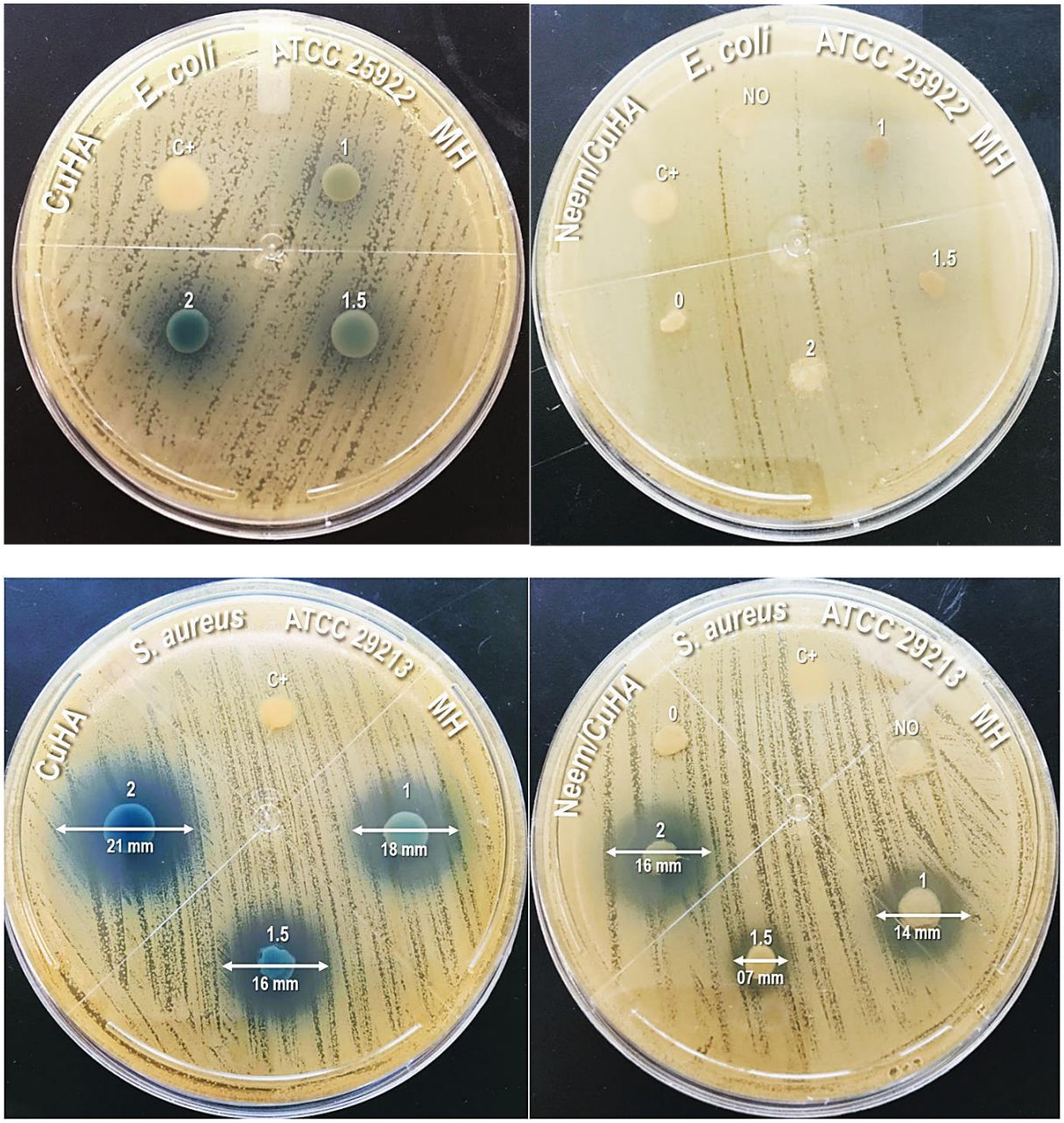

Figura 3.5 a) Actividad antibacteriana de las muestras CuHA y Neem/CuHA frente a *E. coli* ATCC 25922, b) Actividad antibacteriana de las muestras CuHA y Neem/CuHA frente a *S. aureus* ATCC 29213.

De acuerdo con los resultados obtenidos la muestras que CuHA mostraron mayor eficacia antimicrobiana en comparación con las muestras de Neem/CuHA contra *S. aureus,* en la tabla 3.4 se muestran los halos de inhibición reportados en los Estándares de Desempeño para Antimicrobianos: Pruebas de susceptibilidad M100 de los antibióticos comúnmente usados para el tratamiento contra las infecciones nosocomiales de huesos e implantes.

Tabla 3.4 Antibióticos comúnmente usados para el tratamiento de infecciones nosocomiales asociadas a huesos

		Diámetro de halos de inhibición (mm)		
Antibióticos	Dosis (µg)	S[a]	I[b]	R[c]
Rifampin	5	≥20	17-19	≤16
Ciprofloxacino	5	≥21	16-20	≤15
Trombomicina	**10**	**≥15**	**13-14**	**≤12**
Gentamicina	**10**	**≥15**	**13-14**	**≤12**

a) S: Sensible, buena probabilidad de éxito terapéutico.
b) I: Intermedio, se puede conseguir efecto terapéutico en ciertas condiciones.
c) R: Resistente, probabilidad de éxito terapéutico es nula o muy reducida.

Los antibióticos más utilizados en la práctica médica son la gentamicina y la trombomicina, por lo que en comparación con los resultados obtenidos la cepa de *S. aureus* ATCC 29213 es susceptible a las muestras de CuHA1, CuHA1.5, CuHA2 y Neem/CuHA2, y resistente a la muestra de Neem/CuHA1.5, la muestra de Neem/CuHA1 tiene un efecto intermedio lo que significa que su actividad antimicrobiana es impredecible.

Las muestras Neem/CuHA presentaron una menor actividad antimicrobiana contra *S. aureus* y ninguna actividad en el caso de *E. coli*, en sentido contrario a lo esperado, la impregnación con aceite de neem a los materiales disminuye su actividad antimicrobiana y esto se puede deber a la formación de una capa hidrófoba no polar, durante la síntesis que le impide al material realizar el intercambio iónico en la superficie, ya que se encuentra encapsulado.

CONCLUSIONES

El método de coprecipitación simultanea asistida con ultrasonido o con irradiación de microondas permite la obtención de HA cristalinas, sin embargo, al aumentar la concentración del catión Cu^{2+} promueve la formación de materiales de menor cristalinidad. De acuerdo con los resultados obtenidos por DRX, las muestras asistidas con ultrasonido favorecen el acomodo de los iones de cobre en la estructura y procura un mejor acomodo, en comparación de las muestras asistidas con irradiación de microondas que a mayor cantidad de cobre se forman compuestos de menor cristalinidad.

Los datos obtenidos por ICP-OES en relación con los resultados obtenidos por DRX, sugieren que se puede realizar una sustitución de Ca^{2+} por Cu^{2+} en las HA mayor al 20%, a su vez la concentración de cobre depositada en las muestras es menor a la requerida para causar un efecto tóxico en el organismo, por lo que sugiere que los materiales son seguros para aplicaciones médicas.

Los espectros obtenidos por FTIR de las muestras de Neem/CuHA, demuestran la presencia del aceite de neem en la superficie del material, lo que es consistente con la formación de una capa alrededor del material.

La evaluación antimicrobiana de los materiales indica que *S. aureus* presente mayor susceptibilidad frente a las muestras que no contiene aceite de neem, esto se puede deber a la poca difusión del cobre debido a la formación de una capa hidrófoba en el material, a su vez las muestras CuHA presentan una actividad bacteriostática mayor a la de los antibióticos de amplio espectro más utilizados, a una concentración de 20 mg, sin embargo, los resultados de las muestras frente a *E. coli* sugiere que no es factible su aplicación para infecciones causadas por bacterias Gramnegativas.

De acuerdo con los resultados obtenidos por DRX, ICP y la evaluación antimicrobiana de los materiales, la incorporación del aceite de neem por coprecipitación simultánea en los materiales disminuye la cristalinidad y la actividad bacteriostática de los materiales.

REFERENCIAS

Arancibia y col. (2003). Characterization of copper in uterine fluids of patients who use the copper T-380A intrauterine device. *Clinica Chimica Acta*, 69-78. Obtenido de https://doi.org/10.1016/S0009-8981(03)00124-4

Borkow y col. (2005). Copper as a Biocidal Tool. *Current Medicinal Chemistry*, 2163-2175. Obtenido de https://doi.org/10.2174/0929867054637617

Brooks y col. (2013). *Microbilogía médica.* México, D.F.: McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V.

Cao y col. (2012). Concentration-dependent cytotoxicity of copper ions on mouse fibroblasts in vitro: effects of copper ion release from TCu380A vs TCu220C intra-uterine devices. *Biomed Microdevices*, 709-720. Obtenido de https://doi.org/10.1007/s10544-012-9651-x

Catros y col. (2010). Physico-chemical and biological properties of a nano-hydroxyapatite powder synthesized at room temperature. *IRBM*, 226-233. Obtenido de https://doi.org/10.1016/j.irbm.2010.04.002

Cervantes y col. (2014). Características generales del Staphylococcus aureus. *Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*.

Chengfeng y col. (2014). Preparation and characterization of novel hydroxyapatite/copper assemblies with well defined morphologies. *Solid State Sciences*, 66-74. Obtenido de http://dx.doi.org/10.1016/j.solidstatesciences.2014.01.008

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (Enero de 2019). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. *M100*(29th). Wayne, PA, USA.

Cruz y col. (2004). *El arbol de nim, establecimiento y aprovechamiento en la huasteca potosina.* Secretaria de Agricultura, Ganaderia, Desarrollo Rural, Pesca y alimentación. San Luis Potosí: Instituto Nacional de Investigaciones Agricolas y Pecuarias.

Devacumar y col. (1993). *Neem research and development.* (R. N. BS, Ed.) Society of Pesticide Science, India.

Fang y col. (1994). Microwave sintering of hydroxyapatite ceramics. *Journal of Materials Research*, 180-187. doi:10.1557/JMR.1994.0180

Girish y col. (2008). Neem – A Green Treasure. *Electronic Journal of biology*, 102-111. Obtenido de ISSN 1860-3122

Gómez y col. (2001). Precipitation of Stoichiometric Hydroxyapatite by a Continuous Method. *CRYSTAL Research & Technology*, 15-26. Obtenido de https://doi.org/10.1002/1521-4079(200101)36:1%3C15::AID-CRAT15%3E3.0.CO;2-E

González y col. (2016). Micronutrients and neurodevelopment: An update. *Archivos argentinos de pediatria,*, 570-575. Obtenido de https://doi.org/10.5546/aap.2016.eng.570

Grass y col. (2011). Metallic Copper as an Antimicrobial Surface. *Aplied and Environmental Microbiology*, 1541-1547. doi:10.1128/AEM.02766-10

Griffin y col. (2013). Zinc and copper requirements in preterm infants: An examination of the current literature. *Early Human Development*, s29-s34. Obtenido de https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2013.08.001

Han y col. (2009). A simple route to prepare stable hydroxyapatite nanoparticles suspension. *Journal of Nanoparticle Research*, 1235-1240. Obtenido de http://dx.doi.org/10.1007/s11051-008-9507-8

Hassan y col. (2015). Microwave-assisted preparation of Nano-hydroxyapatite for bone substitutes. *CERAMICS INTERNATIONAL*, 3725-3744. Obtenido de https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2015.11.044

Hassani y col. (2014). Aerobic Microbiological Profile Of Contigious Focus Osteomyelitis. *National Journal of Integrated Research in Medicine*, 102-108. doi:ISSN: 0975-9840

Heidenau y col. (2005). A novel antibacterial titania coating: metal ion toxicity and in vitro surface colonization. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 883-888.

Obtenido de https://doi.org/10.1007/s10856-005-4422-3

Inzana y col. (2016). Biomaterials approaches to treating implant-associated osteomyelitis. *Biomaterials*, 58-71. Obtenido de http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.12.012

Jevtic y col. (2008). Crystal Structure of Hydroxyapatite Nanorods Synthesized by Sonochemical Homogeneous Precipitation. *Cristal Growth & Design*, 2217-2222. Obtenido de https://doi.org/10.1021/cg7007304

Kausik y col. (2002). Biological activities and medicinal properties of neem (Azadirachta indica). *Current science*, 1336-1345. Obtenido de https://www.jstor.org/stable/24106000

Khalid y col. (1989). Isolation and characterization of an antimalarial agent of the neem tree Azadirachta indica. *Journal of Natural Products*, 922-927. Obtenido de https://doi.org/10.1021/np50065a002

Kim y col. (1998). Antimicrobial effects of metal ions (Ag+, Cu2+, Zn2+) in hydroxyapatite. *JOURNAL OF MATERIALS SCIENCE: MATERIALS IN MEDICINE*, 129-134. Obtenido de https://doi.org/10.1023/A:1008811501734

Kim y col. (2001). Sonochemical synthesis of hydroxyapatite from H3PO4 solution with Ca(OH)2. *Ultrasonic Sonochemestry*, 85-88. Obtenido de https://doi.org/10.1016/S1350-4177(00)00034-1

Kolmas y col. (2014). Substituted Hydroxyapatites with Antibacterial Properties. *BioMed Research International*, 1-16. Obtenido de http://dx.doi.org/10.1155/2014/178123

Kolmas y col. (2015). Synthetic hydroxyapatite in pharmaceutical applications. *CERAMICS INTERNATIONAL*, 2472-2487. Obtenido de http://dx.doi.org/10.1016/j.ceramint.2015.10.048

Kong y col. (2002). Nanosized hydroxyapatite powders derived from coprecipitation process. *Journal of Materials Science*, 1131-1134. Obtenido de https://doi.org/10.1023/A:1014355103125

León Vallejo, A. M. (2019). Fibras de celulosa funcionalizada con hidrotalcitas con propiedades bactericidas. *Tesis de Doctorado*. Puebla , Puebla: BUAP.

Li y col. (2016). Biodegradable Mg-Cu alloy implants with antibacterial activity for the treatment of osteomyelitis: In vitro and in vivo evaluations. *Biomaterials*, 250-263. Obtenido de https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.08.031

Mora, X. (2012). Diferenciando Bacterias Gram + y Gram -. *Selecciones Avicolas-Patología*, 25-27.

Murthy y col. (1958). Pharmacological studies on Melia azadirachta, Linn N. O. Meliaceae. *Indian J. Physiol. Pharmacol*, 387-396.

O´Gorman y col. (2012). Application of copper to prevent an control infection. Where are we now? *Journal of Hospital Infection*, 1-7. Obtenido de http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2012.05.009

Pankaj y col. (2011). Review on neem (Azadirachta indica): Thousand problems one solution. *International Research Journal of Pharmacy*, 97-102. doi:ISSN 2230-8407

Pantoja y col. (2007). Efecto antimicrobiano de extractos crudos de neem (Azadirachta indica A. Juss) y venadillo (Swietenia humilis Zucc) contra E. coli, S. aureus y el bacteriófago P22. *Bioquimica*, 117-125. Obtenido de ISSN: 0185-5751

Pasteris y col. (2008). Bone and Tooth Mineralization: Why Apatite? *Elements*, 97-104. Obtenido de https://doi.org/10.2113/GSELEMENTS.4.2.97

Peetsch y col. (2013). Silver-doped calcium phosphate nanoparticles: Synthesis, characterization, and toxic effects toward mammalian and prokaryotic cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 724-729. doi:https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.09.040

Pelgrift y col. (2013). Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1803-1815. Obtenido de https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.07.011

Rameshbabu y col. (2005). Acclerated microwave processing of nanocrystalline

hydroxyapatite. *Journal of Materials Science*, 6319-6323. doi:DOI: 10.1007/s10853-005-2957-9

Rey y col. (2007). Physico-chemical properties of nanocrystalline apatites: Implications for biominerals and biomaterials. *Materials Science and Engineering: C*, 198-205. Obtenido de https://doi.org/10.1016/j.msec.2006.05.015

Rivera Ortega , J. A. (2007). Cómpositos de hidroxiapatita e hidrotalcita. *Tesis de Maestría*. Puebla, Puebla: BUAP.

Sadat-Shojai y col. (2013). Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta Biomaterialia*, 7591-7621. Obtenido de http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2013.04.012

Sarig y col. (2002). Rapid formation of nanocrystalline apatite. *Journal of Crystal Growth*, 237-239. Obtenido de https://doi.org/10.1016/S0022-0248(01)01850-4

Segura Pérez, V. (2018). Síntesis de compósitos hidrotalcita-hidroxiapatita como agentes antimicrobianos. *Tesis de maestría*. Puebla, Puebla: BUAP.

Skinner. (2005). Biominerals. *Mineralogical Magazine*, 621-641. Obtenido de https://doi.org/10.1180/0026461056950275

Stevens, M. M. (2008). Biomaterials for bone tissue engineering. *Materialstoday*, 18-25. Obtenido de https://doi.org/10.1016/S1369-7021(08)70086-5

Sunday y col. (2009). Azadirachta indica (neem): a plant of multiple biological. *Phytochem Rev*, 601-620. doi:10.1007/s11101-009-9144-6

Šupová, M. (2015). Substituted hydroxyapatites for biomedical applications:A review. *CERAMICS INTERNATIONAL*, 9203-9231. Obtenido de http://dx.doi.org/10.1016/j.ceramint.2015.03.316

The Korean Society for Chemotherapy y col. (2014). Clinical Guidelines for the Antimicrobial Treatment of Bone and Joint Infections in Korea. *Infection & Chemotherapy*, 125-138. Obtenido de http://dx.doi.org/10.3947/ic.2014.46.2.125

Tortora y col. (2009). *Introducción a la Microbiología.* EE.UU.: Médica Panamericana.

Vallet y col. (2004). Calcium phosphates as substitution of bone tissues. *Progress in Solid State Chemistry*, 1-31. Obtenido de https://doi.org/10.1016/j.progsolidstchem.2004.07.001

Wopenka y col. (2005). A mineralogical perspective on the apatite in bone. *Materials Science and Engineering: C*, 131-143. Obtenido de https://doi.org/10.1016/j.msec.2005.01.008

Wu y col. (2016). Synthesis of hydroxyapatite from eggshell powders through ball milling and heat treatment. *Journal of Asian Ceramic Societies, 4*, 85-90. Obtenido de https://doi.org/10.1016/j.jascer.2015.12.002

ANEXO 1: TINCIÓN DE GRAM

1. Fundamento

La coloración de Gram ha constituido desde los albores de la microbiología un elemento fundamental para la taxonomía e identificación de los microorganismos. Es uno de los ensayos básicos en bacteriología y constituye una ayuda invalorable en la identificación microbiana (Laboratorios Britania, 2017).

El investigador danés Christian Gram en 1884 demostró que ciertos microorganismos coloreados con violeta de genciana y mordentados con solución de Lugol, cuando eran sometidos a la acción de una mezcla alcohol-acetona se decoloraban mientras que otros retenían el color violeta. Esto ha constituido uno de los grandes pilares de la bacteriología ya que permitió la división de los gérmenes en Gramnegativos y Grampositivos respectivamente, grupos que presentan características bien definidas. El conocimiento de las estructuras de las membranas bacterianas, tanto en el aspecto físico como en su composición molecular que fueron logrados a partir de la década del sesenta, demostró que la coloración de Gram distingue dos grupos de bacterias totalmente diferentes (Laboratorios Britania, 2017).

La diferencia de la reacción entre bacterias Grampositivas y Gramnegativas es atribuida a diferencias químicas y físicas de su pared celular. Las bacterias Grampositivas presentan una gruesa capa de peptidoglicano como estructura fundamental por sobre la membrana citoplasmática mientras que las bacterias Gramnegativas presentan por sobre la membrana citoplasmática una delgada capa de peptidoglicano a la que se superpone una capa de lipopolisacáridos-lipoproteína denominada “membrana externa”. La presencia de esta “membrana externa” diferencia actualmente dos divisiones en sistemática bacteriana: las que no la poseen (Grampositivas) y las que sí la poseen (Gramnegativas). En la coloración de Gram, el violeta de genciana es captado en la pared celular de bacterias Grampositivas y Gramnegativas y luego se forma un complejo con el lugol. El decolorante actúa extrayendo los lípidos de la membrana externa de la pared celular de las bacterias Gram negativas lo que produce un aumento en la permeabilidad y se pierde el complejo formado entre el violeta

de genciana y el lugol. Al agregar la safranina, las bacterias Gram negativas toman el color de este contracolorante y se observan de color rosado. A diferencia de estas, en las bacterias Grampositivas el agregado del decolorante produce disminución de la permeabilidad e incrementa la retención del complejo del violeta de genciana-iodo. El resultado es que se observan de color violeta por la retención de este (Laboratorios Britania, 2017).

2. Reactivos

a) Violeta de genciana
b) Lugol
c) Alcohol-cetona
d) Safranina

3. Procedimiento

Preparación de extendidos:

- Utilizar portaobjetos limpios y desengrasados.
- A partir del crecimiento microbiano en medios sólidos o líquidos: cuando la coloración de Gram se efectúa para caracterizar colonias, colocar en el portaobjeto una gota de solución fisiológica en la que se emulsionará la colonia que ha sido recolectada (mediante el uso de asa bacteriológica) del medio de cultivo en que se encuentra. En caso de que se trate de medios líquidos, depositar una alícuota de cada uno de ellos en el portaobjetos.
- Colocar los portaobjetos en posición horizontal dentro de la estufa de cultivos o sobre la corriente de aire caliente de un mechero.

Fijado del extendido:

- A la llama: se efectúa pasando 3 veces el lado del portaobjeto que no tiene la preparación sobre la llama del mechero.
- Con alcohol metílico: cubrir el extendido durante 1 minuto. Este método permite obtener fijaciones más uniformes sin destrucción de elementos por excesivo calentamiento y ahorro de tiempo. Nota: en el caso de orinas es conveniente que

luego que ha sido fijado el extendido se realice un lavado con chorro fino de agua durante 10 segundos para arrastrar las sales que pudiera contener, dado que estas perjudican la correcta coloración.

Técnica de Coloración

- Cubrir el extendido con Violeta de genciana. Dejar actuar 60 segundos. Lavar con agua corriente durante 10 segundos.
- Cubrir con lugol. Dejar 60 segundos. Lavar con agua corriente durante 10 segundos.
- Cubrir con alcohol cetona. Decolorar durante 10 segundos. Lavar con agua corriente 10 segundos.
- Cubrir con Safranina para Gram. Dejar 60 segundos. Lavar con agua corriente durante 10 segundos.
- Secar el extendido.

Interpretación de los resultados

- Cubrir el extendido con una gota de aceite de inmersión y observar al microscopio óptico, con aumento 100X. Bacterias Grampositivas: se observan de color azul-violáceo Bacterias Gramnegativas: se observan de color rosado-rojizo.

Referencia

Laboratorios Britania. (2017). *Gram Britania,* CABA Argentina: Laboratorios Britania S.A; Obtenido de: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a3141e7ad9f8