

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Efecto de la morfología de nanocompuestos HA/MgO/Pt en sus propiedades antibacterianas bajo activación fotocatalítica.

Jeniffer Stefany Caballero Sarmiento

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Minas, Departamento de Materiales y Minerales
Medellín, Colombia
2017

Efecto de la morfología de nanocompuestos HA/MgO/Pt en sus propiedades antibacterianas bajo activación fotocatalítica.

Jeniffer Stefany Caballero Sarmiento

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magíster en Ingeniería de Materiales y Procesos

Director:
Carlos Guillermo Paucar Álvarez, MSc, Dr.

Línea de Investigación:
Biomateriales

Grupo de Investigación:
Materiales Cerámicos y Vítreos

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Minas, Departamento de Materiales y Minerales
Medellín, Colombia
2017

Dedico esta tesis de maestría principalmente a Dios que dispuso las herramientas, situaciones y personas necesarias para concluir esta etapa. A mi mamá y papá, que siempre han creído en mí y me han enseñado que es posible ir más allá de lo esperado. A mis hermanas, que día a día con su ejemplo y entrega me demuestran que todo lo propuesto se puede lograr, sólo basta con mirar hacia adelante. A mi abuela Eva, que me dejó el legado de la perseverancia y amor por las cosas.

Estudiar: leer escribiendo. Con un cuaderno abierto y un lápiz en la mano. Las páginas de la lectura en el centro, las de la escritura en los márgenes. Y también: escribir leyendo. Abriendo un espacio para la escritura en medio de una mesa llena de libros. Leer y escribir son, en el estudio, haz y envés de una misma pasión.

Jorge Larrosa

Agradecimientos

Siempre es preciso saber que cada etapa de la vida es valiosa, no sólo por lo vivido sino también por quienes acompañan o hacen parte del camino. Por ello, quiero extender mi agradecimiento al profesor Carlos Guillermo Paucar Álvarez; profesor asociado, Escuela de Química Facultad de Ciencias, quien dirigió y motivó el desarrollo de este trabajo; gracias por la orientación, paciencia, dedicación, criterio y ayuda.

Gracias a la profesora Claudia Patricia García García; profesor asociado, Escuela de Física, Facultad de Ciencias, por su apoyo y gestión en el uso de equipos y recursos que permitieron la culminación de este trabajo de investigación.

Gracias al profesor Jesús Oswaldo Moran Campaña; profesor asociado, Escuela de Física, Facultad de Ciencias por poner a disposición el equipo necesario para la ejecución del proceso de síntesis.

Gracias a la bacterióloga Blanca Luz Pineda Gómez y a la profesora Olga Inés Montoya Campuzano, coordinadora del Laboratorio de Microbiología Aguas y alimentos, por su colaboración, disposición y apoyo en la primera etapa de las pruebas de actividad antibacteriana.

Gracias al profesor Sidonio Da Cunha Freitas; profesor, Universidad Cooperativa de Colombia, sin su acompañamiento y orientación no habría sido posible completar las etapas de evaluación antibacteriana.

Gracias al profesor Omar Dario Gutiérrez Flórez; profesor, Instituto Tecnológico Metropolitano de Medellín- I.T.M, por compartir su conocimiento y capacitarme en la realización de las pruebas de caracterización de Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier.

Gracias al profesor Farid Bernardo Cortés Correa; profesor Facultad de Minas por su colaboración en la realización de las pruebas de Potencial Zeta, y a Jaime León Alzate Arias, Escuela de Química Facultad de Ciencias por su diligencia y contribución.

Con la misma estimación agradezco a los estudiantes de doctorado en Ingeniería- Ciencia y Tecnología de Materiales Alex Arbey Lopera Sepúlveda, Edgar Andrés Chavarriaga Miranda, Natalia Isabel Jaramillo Gómez y Adrian Gómez Zapata, a quienes les tengo un gran cariño y admiración. Gracias por siempre estar dispuestos a crear espacios para la producción o construcción de conocimiento; por las palabras de aliento; por el apoyo incondicional en todo el proceso; por ayudarme a buscar soluciones y por todos los momentos vividos en el laboratorio.

De igual manera, expreso mi gratitud y aprecio a mi amiga Diana Elizabeth Coral Rodríguez por su incondicional apoyo y a todos aquellos que hicieron parte de este aprendizaje; haciendo un reconocimiento especial a mi familia, quienes son mi mayor motivación y la base para lograr ésta y otras metas, ya que sin ellos nada de esto sería posible.

Resumen

Los microorganismos causantes de muchas enfermedades y condiciones médicas comunes se han vuelto resistentes a una amplia gama de medicamentos antimicrobianos. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de nuevos agentes antibacterianos, fármacos, vacunas y estrategias en nanotecnología. La hidroxiapatita (HA) es uno de los principales constituyentes de la matriz ósea, es el más estable, más denso y menos soluble de los fosfatos de calcio (CaPs), es biocompatible y bioactiva; su modelo estructural iónico puede aceptar sustituyentes catiónicos y aniónicos, lo que permite adaptar sus propiedades y mejorar su aplicación. Nanopartículas de HA con nanopartículas metálicas y óxidos metálicos pueden ser un material prometedor para combatir las enfermedades infecciosas.

Esta investigación se enfoca en la obtención de nanocompuestos de hidroxiapatita dopada con óxido de magnesio y platino a través de la ruta de síntesis solvotermal, a diferentes relaciones surfactante/cosurfactante con el fin de controlar la morfología de los nanocompuestos.

Los polvos sintetizados fueron caracterizados empleando varias técnicas como difracción de rayos X (DRX) para determinar su estructura y pureza; Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR), para identificar los grupos funcionales presentes; Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y Microscopía Electrónica de barrido por Emisión de campo (FESEM) para observar la morfología, tamaño y distribución de las nanopartículas. Posteriormente, se evaluó la actividad antibacteriana mediante el método de difusión por disco frente a bacterias gram- positivas y gram negativas, con y sin radiación ultravioleta. Para fines comparativos y el análisis del efecto de las nanopartículas metálicas y de óxidos metálicos en la actividad antibacteriana, se estudió además, el comportamiento de nanocompuestos dopados con plata.

Los resultados demuestran que el método solvotermal es una forma de síntesis prometedora para producir nanopartículas de hidroxiapatita dopada con nanopartículas metálicas y de óxidos metálicos, con determinada morfología y susceptibilidad en bacterias como *Streptococcus mutans* y *Escherichia Coli*; mostrando así, el posible uso de este material como antibacteriano.

Palabras clave: hidroxiapatita, actividad antibacteriana, óxido de magnesio, platino, método solvotermal.

Abstract

Microorganisms cause many diseases and common medical conditions and they have become resistant to antimicrobial drugs. Therefore, the development of new antibacterial agents, drugs, vaccines and strategies in nanotechnology is necessary. Hydroxyapatite (HA) is one of the main constituents of the bone matrix. Its material is the most stable, densest and least soluble of the calcium phosphates (CaPs) and has other qualities like biocompatible and bioactive. Hydroxyapatite ionic structural model can accept cationic and anionic substituents, which allows to adapt its properties and to improve its application. Hydroxyapatite nanoparticles combined with metal nanoparticles and metal oxides can be a promising material to combat infectious diseases.

Research focus is obtain nanocomposites of hydroxyapatite doped with magnesium oxide and platinum. Synthetic route used was solvothermal at different surfactant / cosurfactant ratios in order to control the morphology of the nanocomposites.

Synthesized powders were characterized using several techniques such as X-ray diffraction (XRD) to determine their structure and purity; Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), to identify the functional groups present; Scanning Electron Microscopy (SEM) and Field Emission Scanning Electron Microscopy (FESEM) to observe the morphology, size and distribution of nanoparticles. Subsequently, antibacterial activity was evaluated by disc diffusion method with gram-positive and gram-negative bacteria, with and without ultraviolet radiation. Behavior of nanocomposites doped with silver was also studied to compare and analyze the effect of metal nanoparticles and metal oxides on bacterial activity.

Results demonstrate that the solvothermal method is a promising synthetic form to produce nanoparticles of hydroxyapatite doped with metal nanoparticles and metal oxides with different morphology and susceptibility to *Streptococcus mutans* and *Escherichia coli*.

Keywords: hydroxyapatite, antibacterial activity, magnesium oxide, platinum, solvothermal method.

Contenido

Agradecimientos	IV
Resumen	VI
Abstract	VII
Contenido	VIII
Lista de figuras	XI
Lista de tablas	XIII
Lista de símbolos y abreviaturas	XIV
Introducción	1
Objetivos	6
Objetivo General	6
Objetivos específicos	6
1. Marco teórico	7
1.1 Generalidades de los fosfatos de calcio.....	7
1.2 Nanopartículas metálicas como agentes antibacterianos.....	10
1.2.1 Nanopartículas de Plata	11
1.2.2 Nanopartículas de óxido de magnesio.....	12
1.2.3 Nanopartículas de platino.....	14
1.3 Hidroxiapatita sustituida con nanopartículas metálicas.....	15
1.4 Activación de nanomateriales antibacterianos con radiación ultravioleta	17
1.5 Métodos de síntesis	18
1.5.1 Método mecanoquímico.....	20
1.5.2 Método de Precipitación química.....	20
1.5.3 Método Sol- gel	21
1.5.4 Método hidrotermal	21
1.5.5 Método de emulsiones	22
1.6 Métodos de evaluación de la actividad antibacteriana	25

1.6.1	Concentración mínima inhibitoria	26
1.6.2	Zona de inhibición.....	26
1.7	Aplicaciones de las nanopartículas antibacterianas	27
2.	Síntesis de nanocompuestos.....	29
2.1	Variables y etapas del proceso solvotermal	29
2.2	Resultados del comportamiento de temperatura y presión de cada sistema.....	32
3.	Caracterización de nanopartículas.....	33
3.1	Difracción de Rayos X.....	33
3.1.1.	Metodología.....	34
3.1.2.	Efecto de la sustitución de magnesio y platino en la hidroxiapatita a una relación surfactante/cosurfactante de 1	35
3.1.1	Efecto de la sustitución de magnesio, platino y plata en la hidroxiapatita a una relación surfactante/cosurfactante de 6	40
3.1.2	Efecto de la relación surfactante/cosurfactante en la composición hidroxiapatita dopada con magnesio y platino	44
3.1.3.	Conclusiones parciales del análisis de difracción de rayos X.....	48
3.2	Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier	49
3.2.1	Metodología.....	49
3.2.2	Efecto de la adición de magnesio y platino en la estructura de hidroxiapatita para una relación surfactante/cosurfactante de 6	49
3.2.3	Efecto de la relación surfactante/cosurfactante en la hidroxiapatita sustituida con magnesio y platino.....	51
3.2.4	Efecto del cosurfactante en la composición de hidroxiapatita dopada con magnesio y platino	53
3.2.5.	Conclusiones parciales del análisis de Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier.....	54
3.3	Microscopía Electrónica.....	55
3.3.1	Microscopía electrónica de barrido	55
3.3.2	Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo.....	59
3.3.3	Conclusiones parciales del análisis de Microscopía electrónica.....	65
3.4	Potencial Zeta	66

3.4.1.	Metodología.....	66
3.4.2.	Efecto de la relación surfactante/cosurfactante en el potencial zeta	66
3.4.3.	Conclusiones parciales potencial zeta	67
4	Actividad antibacteriana	68
4.1	Efecto de la relación surfactante/cosurfactante en la susceptibilidad antibacteriana de hidroxiapatita dopada con magnesio y platino	68
4.1.1	Resultados de actividad antibacteriana	69
4.1.2	Conclusiones parciales del efecto de la relación estequiométrica surfactante/cosurfactante en la actividad antibacteriana	71
4.2	Efecto de los dopantes en la actividad antibacteriana de la hidroxiapatita.....	72
4.2.1	Resultados de actividad antibacteriana	73
4.2.2	Conclusiones parciales del efecto de los dopantes en la actividad antibacteriana ..	74
4.3.	Efecto de la radiación ultravioleta en la susceptibilidad antibacteriana de hidroxiapatita dopada con magnesio y platino	75
4.3.1	Resultados de actividad antibacteriana	76
4.3.2	Conclusiones parciales del efecto de la radiación ultravioleta en la susceptibilidad antibacteriana	79
	Conclusiones.....	80
	Recomendaciones	82
A.	Anexo: Divulgación investigación	83
	Bibliografía.....	84

Lista de figuras

Figura 1 Estructura de la HA a lo largo del eje c. Las líneas negras conectan las columnas de Ca (I) en redes hexagonales. El color cian y los triángulos de color magenta conectan los átomos escalonados de Ca (II) presentes en el mismo plano, pero a diferentes distancias con respecto al eje c. Tomado de (21).	9
Figura 2 Factores causantes de la actividad antibacteriana de los nanomateriales con metales/óxidos metálicos. Tomado y modificado de (30).....	11
Figura 3 Mecanismo de actividad antibacteriana para nanocompuestos de Ag-MgO. Tomado de (36).....	13
Figura 4 Diagrama de fases ternario para sistemas surfactante/agua/aceite. Tomado de (60)	23
Figura 5 Rutas principales en la síntesis por el método de emulsión de NPs de HA. Modificado de (51).....	25
Figura 6 Zona de inhibición. Tomado de (30)	27
Figura 7 Descripción proceso hidrotérmal asistido por microemulsiones.	31
Figura 8 Diagrama comparativo de presión en función de la temperatura de cada sistema sintetizado.....	32
Figura 9 Difractograma de rayos X de HA1.	36
Figura 10 Difractograma de rayos X a) HA1, b) HAMgPt1.....	37
Figura 11 Difractograma de rayos X a) HA6, b) HAMg6, c) HAMgPt6, d) HAMgAg6.	40
Figura 12 Difractograma de rayos X a) HAMgPt3, b) HAMgPt10, c) HAMgPt0.1, d) HAMgPt0.33 ..	45
Figura 13 Espectros FTIR muestras sintetizadas a una relación S/C de 6 a) HA6, b) HAMg6, c) HAMgPt6	50
Figura 14 Espectros FTIR muestras sintetizadas a una relación S/C de 6 a) HAMgPt6, b) HAMgAg6, c) HA6.....	51
Figura 15 Comparación espectros FTIR de las muestras sintetizadas a diferentes relaciones S/C .	52
Figura 16 Comparación espectros FTIR de las muestras sintetizadas a relaciones S/C de 0.1 y 0.33	53
Figura 17 Micrografías SEM y espectros EDS a-b) HA3, c-d) HA6, e-f) HA10.....	57
Figura 18 Micrografías SEM y espectros EDS a-b) HAMg6, c-d) HAMg10, e-f) HAMgPt1.....	58
Figura 19 Micrografías FESEM de HAMgPt sintetizada a diferentes relaciones S/C a) HAMgPt0.1, b) HAMgPt0.33, c) HAMgPt1, d) HAMgPt10.	60
Figura 20 Micrografías FE-SEM a diferentes aumentos de HAMgPt3 a) 10000X, b) 50000X, c) 100000X	61
Figura 21 Micrografías FE-SEM a diferentes aumentos de HAMgPt6 a) 50000X, b) 100000X	62
Figura 22 Micrografía FE-SEM de HAMgAg sintetizada a una relación S/C	62
Figura 23 Distribución de potencial Z (mV) vs pH de la muestras dispersas en agua a una concentración de 0.01% (p/v).....	67
Figura 24 Resultados antibiograma frente a <i>E.coli</i> a) HAMgPt10, b) HAMgPt0.1, c) HAMgPt0.33, d) HAMgPt6, e) HAMgPt3.....	69

Figura 25 Actividad antibacteriana vs morfología de los nanocompuestos	70
Figura 26 Proceso compactación de polvos a) molde, b) prensado, c) discos.....	72
Figura 27 Actividad antibacteriana frente a <i>S. mutans</i> a) HA6, b) HAPt6, c) HAMg6, d) HAMgPt6, e) HAMgAg	73
Figura 28 Susceptibilidad antibacteriana de las nanopartículas sintetizadas frente a <i>S. Mutans</i> y <i>E. Coli</i>	74
Figura 29 Montaje etapa de radiación UV de las muestras sintetizadas, a) Ubicación de las pastillas, b) rotulación, c) Radiación UV y d) aislamiento.	75
Figura 30 Susceptibilidad antibacteriana de las nanopartículas sintetizadas frente a <i>S. Mutans</i> , con y sin radiación UV.....	76
Figura 31 Susceptibilidad antibacteriana de las nanopartículas sintetizadas frente a <i>E. Coli</i> , con y sin radiación UV.	77
Figura 32 Mecanismo de fotocatalisis del MgO bajo radiación UV. Adaptado de (49).	78

Lista de tablas

Tabla 1 Principales compuestos de fosfato de calcio. Modificado y tomado de (18), (20)	7
Tabla 2 Diferentes métodos para la síntesis de nanopartículas de HA. Modificado y tomado de (51)	19
Tabla 3 Reactivos empleados en la síntesis de nanocompuestos por el método solvotermal	29
Tabla 4 Notación empleada para los nanocompuestos sintetizados a una relación surfactante/cosurfactante determinada.	30
Tabla 5 Condiciones instrumentales empleadas en el análisis DRX	34
Tabla 6 Parámetros de celda para HA de acuerdo a JCPDS No. 01-074-0565.	37
Tabla 7 Parámetros de celda de los polvos sintetizados HA1.	38
Tabla 8 Parámetros de celda para los polvos sintetizados HAMgPt1	38
Tabla 9 Parámetros de celda de las muestras sintetizadas y HA estándar (JCPDS No. 01-074-0565)	39
Tabla 10 Grado de cristalinidad de los polvos sintetizados y HA estándar (JCPDS No. 01-074-0565)	39
Tabla 11 Radio atómico e iónico de Ca, Mg, Pt y Ag (70).....	40
Tabla 12 Parámetros de celda de los polvos sintetizados HA6.....	41
Tabla 13 Parámetros de celda de los polvos sintetizados HAMg6.	41
Tabla 14 Parámetros de celda de los polvos sintetizados HAMgPt6.	41
Tabla 15 Parámetros de celda de los polvos sintetizados HAMgAg6.	42
Tabla 16 Parámetros de celda de las muestras sintetizadas y HA estándar (JCPDS No. 01-074-0565)	42
Tabla 17 Grado de cristalinidad de los polvos sintetizados y HA estándar (JCPDS No. 01-074-0565)	43
Tabla 18 Parámetros de celda de los polvos sintetizados HAMgPt3	45
Tabla 19 Parámetros de celda de los polvos sintetizados HAMgPt10	46
Tabla 20 Parámetros de celda de los polvos sintetizados HAMgPt0.1	46
Tabla 21 Parámetros de celda de los polvos sintetizados HAMgPt0.33	46
Tabla 22 Parámetros de celda de las muestras sintetizadas y HA estándar (JCPDS No. 01-074-0565)	47
Tabla 23 Grado de cristalinidad de los polvos sintetizados y HA estándar (JCPDS No. 01-074-0565)	47
Tabla 24 Picos de absorción observados en el espectro FTIR de las muestras sintetizadas.....	51
Tabla 25 Nanopartículas y su aplicación biomédica	63
Tabla 26 Tamaño y forma de las nanopartículas sintetizadas	64
Tabla 27 Resultados actividad antibacteriana de las muestras	70
Tabla 28 Resultados de las técnicas de caracterización de las nanopartículas sintetizadas	71
Tabla 29 Medida halos de inhibición	73

Lista de símbolos y abreviaturas

OMS	Organización Mundial de la Salud
CaPs	Fosfatos de calcio
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>P. vulgaris</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>M. luteus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
HA	Hidroxiapatita
HAMg	Hidroxiapatita dopada con magnesio
HAPt	Hidroxiapatita dopada con platino
HAAg	Hidroxiapatita dopada con plata
HAMgPt	Hidroxiapatita dopada con magnesio y platino
HAMgAg	Hidroxiapatita dopada con magnesio y plata
NPs	Nanopartículas
CTAB	bromuro de hexadeciltrimetilamonio
PEG	Polietilenglicol
S/C	Relación estequiométrica surfactante/cosurfactante
CMI	Concentración mínima inhibitoria
ZOI	Zona de inhibición
X_c	Grado de cristalinidad
β	Tamaño de cristalito
pH	$-\log [H_3O^+]$

Introducción

El ser humano está expuesto a una infinidad de microorganismos, tales como bacterias y virus, capaces de producir numerosas enfermedades. En los últimos años, el control de la población microbiana se ha convertido en un problema creciente a nivel mundial, debido a la ubicuidad de estos microorganismos y su habilidad para auto-establecerse (1).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reveló en su primer informe sobre la resistencia a los antibióticos, que las infecciones que en las últimas décadas han logrado tratarse gracias a los antibióticos pueden volver a ser potencialmente mortales por el aumento de la resistencia de las bacterias a estos fármacos. Lo cual representa una amenaza a la salud humana y animal, se pone en peligro la capacidad de tratar enfermedades infecciosas comunes y en consecuencia el aumento de la discapacidad; la muerte; enfermedades más largas; estancias prolongadas en el hospital; intervenciones como el trasplante de órganos, la quimioterapia del cáncer, el tratamiento de la diabetes o la cirugía mayor (cesáreas, prótesis de cadera, entre otras) representarían procedimientos de alto riesgo (2).

Se ha demostrado que mediante la combinación de la nanotecnología y la ciencia de los materiales se puede combatir el incremento de la resistencia de patógenos hacia los antibióticos, ya que permiten desarrollar materiales con propiedades antimicrobianas intrínsecas (3). Varias alternativas han sido estudiadas, entre ellas, el uso de nanopartículas (4). Nanopartículas metálicas y de óxidos metálicos poseen potenciales propiedades antibacterianas, que las convierten en una alternativa como agente antimicrobiano con mayores ventajas que los antibióticos tradicionales. Tienen una vida útil prolongada; son estables a elevadas temperaturas y/o presiones; es poco probable la aparición de resistencia antibacteriana; pueden ser modificadas para usos terapéuticos específicos a través de funcionalización y activadas por estímulos (químicos, calor, campos magnéticos, pH y radiación UV) que amplían su espectro bactericida (5).

Independientemente del tamaño pequeño de las nanopartículas (<100 nm), varios parámetros son relevantes para mejorar sus propiedades estructurales, magnéticas, eléctricas, ópticas, mecánicas y antibacterianas; entre ellos la composición elemental, carga, forma, cristalinidad, área superficial, solubilidad y agregación. Las nanopartículas poseen propiedades fisicoquímicas únicas debidas a su tamaño, éste afecta la movilidad y transporte de las partículas; partículas con diferentes formas (esféricas, tubulares y cúbicas) tienen distinta afinidad y accesibilidad a la pared celular; el potencial Zeta influye en la habilidad de las partículas para penetrar las células; la aglomeración afecta las propiedades de superficie de las nanopartículas y su bio-disponibilidad a las células (6).

Algunos estudios realizados en nanopartículas metálicas y óxidos metálicos se han enfocado en determinar cómo influye la morfología en la respuesta biocida. Wang et al. demostraron que partículas cúbicas y octaedrales de Ag_2O pueden inhibir el crecimiento de *E.coli*; sin embargo, las de morfología cúbica son más eficientes (7).

En el año 2013, Talebian et al. sintetizaron nanopartículas de ZnO con diferente morfología mediante el método solvotermal; determinaron la actividad antimicrobiana contra *E.coli* y *S.aureus* por conteo de colonias, con y sin presencia de luz de nanopartículas con morfología esférica, barras y forma de flor. Los resultados indicaron una eficiencia de inactivación de las nanopartículas en su orden, en forma de flor > esféricas > barras bajo condiciones de radiación UV y en la oscuridad (8).

Un año después, Laha et al. sintetizaron nanopartículas de cobre con morfología de lámina y esféricas, emplearon bacterias Gram-positivas y Gram- negativas para el análisis del efecto antibacteriano de las nanopartículas. El crecimiento de las bacterias Gram- negativas *P.vulgaris* y *E.coli* fue completamente inhibido por las nanopartículas esféricas a concentraciones de 0.16 mg/mL y 0.20 mg/mL, respectivamente. Las nanopartículas en forma de lámina fueron más efectivas en bacterias Gram-positivas *B.subtilis* y *M. luteus* a 0.22 mg/mL y 0.20 mg/mL, respectivamente. Esto puede deberse a que las nanopartículas en forma de lámina no puedan penetrar la membrana externa de la bacteria Gram-negativa, contrario a las que presentan morfología esférica. Por otro lado, tienen más carga superficial induciendo más daño en las bacterias Gram-positivas (9).

Un requerimiento clave para el éxito en el uso de nanopartículas en aplicaciones biomédicas es que presenten baja toxicidad. Razón por la cual varias investigaciones están orientadas a desarrollar nanocompuestos o nanomateriales con incorporación de diferentes metales u óxidos metálicos. Un ejemplo de ello son los compuestos de hidroxiapatita (HA) y nanopartículas de HA dopadas con iones y óxidos metálicos, que han sido de gran interés. Nathanael et al. prepararon nanocompuestos de HA/ TiO_2 por combinación del método hidrotermal y de alta gravedad (nanoesferas de TiO_2 fueron depositadas sobre nanobarras de HA); las propiedades biológicas fueron medidas usando células animales similares a los osteoblastos (CHO), a bajas concentraciones de TiO_2 los nanocompuestos presentaron excelente respuesta celular; nanocompuestos con 60% de TiO_2 mostraron actividad antibacteriana en *S. aureus* (10).

El efecto antimicrobiano de nanopartículas de HA con nanopartículas de Ag (tamaño promedio de (65 ± 17) nm) fue evaluado por Mocanu et al. mediante el método de difusión en agar nutritivo con glucosa, de acuerdo al modelo de antibiograma. Emplearon discos con superficies lisas y observaron zonas de inhibición para *E.coli* entre 10 y 15 mm, para *S. aureus* entre 11 y 16 mm; las cepas de *Staphylococcus spp*, fueron menos sensibles, su actividad fue registrada con contenidos de plata de 4.5 wt% identificada con un halo de 14 mm. Para *B.cereus* hubo zona de inhibición de 14 mm a 5.4 wt% de nanopartículas de Ag (11).

HA multisustituida con iones Mg^{2+} , Ni^{2+} y SiO_4^{4-} fue sintetizada por el método de microondas asistido con precipitación por Alshemary et al. Investigaron las propiedades antibacterianas de estas nanopartículas contra *P. aeruginosa* mediante el método cualitativo de difusión por disco y contra *E.coli* con el método de conteo. Las nanopartículas mostraron efecto antibacteriano contra *E.coli*, la tasa de supervivencia de la bacteria disminuyó con la cantidad de iones Ni^{2+} . La mayor zona de inhibición encontrada para *P. aeruginosa* (4.1 mm) fue en nanopartículas de Ni-Mg-SiHA con concentración alta de Ni^{2+} , longitud 55 nm y ancho de 21 nm (12).

Investigaciones orientadas a la síntesis de HA con sustitución de magnesio han aumentado debido a sus potenciales aplicaciones como desarrollo de hueso artificial, entre otras; la adición de este catión mejora la degradación y bioactividad de la HA por los cambios en la composición química, tamaño de cristal y microestructura. Las propiedades antibacterianas de este tipo de nanopartículas también han sido analizadas (13).

Por sus propiedades fisicoquímicas, la HA también ha sido considerada como un material aplicable contra el cáncer. Ezhaveni et al. sintetizaron HA mediante el método hidrotermal. Los estudios de TEM mostraron una morfología de nanobarras con un diámetro de aproximadamente 18-24 nm y una longitud de 33-40 nm. Cerca del 50% de muerte celular fue observado a 24 h de incubación de las células cancerígenas G2 con nano HA tratada a 200°C – 5 h y 56% de muerte celular a 48h de incubación. Nano HA sintetizada a 100°C- 5 h mostró un perfil de muerte celular similar al material anterior (14).

Por otro lado, las propiedades biológicas y antibacterianas son evaluadas predominantemente con nanopartículas de HA que presentan morfología esférica y de barras. No hay reportes comparativos del efecto de la morfología de HA en las propiedades antibacterianas pero sí en las propiedades biológicas. La respuesta biológica de las NPs de CaPs depende del tamaño del cristal y la forma, parámetros que afectan la proliferación de osteoblastos, la actividad celular y la apoptosis. Xu et al. demostraron que nanopartículas de HA de 20 nm fueron efectivas en promover la proliferación celular, la actividad celular y la inhibición de apoptosis celular. Simultáneamente, observaron que la proliferación de osteoblastos y migración celular mejoró cuando las células se cultivaron en suspensiones con nanopartículas esféricas de HA, comparada con la respuesta obtenida empleando suspensiones de nanobarras de HA. Sin embargo, las nanopartículas esféricas indujeron mayores expresiones de las enzimas metabólicas, lo que indica que podrían ser potencialmente más peligrosas para los osteoblastos que las partículas con forma de aguja (15).

Continuos avances en el campo de la medicina se han enfocado en el desarrollo de biomateriales que tengan un amplio espectro de actividad bactericida en la prevención y/o tratamiento de una infección; que no sean tóxicos al huésped y susceptibles al desarrollo de resistencia microbiana (16).

De acuerdo a lo anterior, con este trabajo de investigación se propone sintetizar un nuevo material de HA dopado con Mg y Pt (sin reporte bibliográfico hasta el momento), que tenga morfología específica y propiedad antibacteriana comparable a CPs con presencia de metales u óxidos metálicos como Ag y TiO₂ que, a pesar de ser efectivos, son tóxicos. Teniendo en cuenta que se ha demostrado el efecto bactericida y actividad fotocatalítica de NPs de MgO, se busca aumentar estas propiedades con Pt y así, obtener un material biocompatible con posible aplicación de agente antibacteriano. Para lograr esto, se empleará el método hidrotérmal asistido con microemulsiones, técnica que permite obtener productos cristalinos muy homogéneos a baja temperatura de reacción, menos aglomeración entre partículas, distribución de tamaño de partícula pequeño, fase homogénea, composición uniforme, alta pureza en el producto y morfología controlada (17). Además, se evaluará su efectividad en bacterias Gram- positivas y Gram-negativas.

Este trabajo está conformado por cuatro capítulos. En el primer capítulo, el lector encontrará información relevante de los fosfatos de calcio; nanopartículas metálicas y óxidos metálicos como agentes antibacterianos; métodos de síntesis; pruebas de evaluación de actividad antibacteriana y aplicaciones de las nanopartículas como agentes antibacterianos. Posteriormente, se describe cada una de las etapas del método de síntesis empleado para obtener los nanocompuestos. Finalmente, se presentan los resultados de caracterización estructural, morfológica y la evaluación de la susceptibilidad antibacteriana.

Objetivos

Objetivo General

Evaluar el efecto de la morfología de nanocompuestos HA/MgO/Pt en sus propiedades antibacterianas bajo activación fotocatalítica.

Objetivos específicos

- Controlar la morfología de nanocompuestos HA/MgO/Pt con la proporción estequiométrica surfactante/cosurfactante para determinar su posterior actividad antibacteriana.
- Evaluar la capacidad bactericida de los nanocompuestos sintetizados sobre microorganismos Gram positivos y Gram negativos.
- Determinar la existencia de un efecto sinérgico del Pt y el MgO en el efecto antibacteriano de los nanocompuestos bajo activación fotocatalítica.

1. Marco teórico

El desarrollo del marco teórico imparte conocimientos enmarcados en los conceptos y fenómenos relacionados al tema de investigación. En este apartado el lector encontrará: una introducción a los fosfatos de calcio, nanopartículas como agentes antibacterianos, métodos de síntesis y aplicación; se resalta y sustenta la importancia de la tesis de acuerdo a los reportes científicos.

1.1 Generalidades de los fosfatos de calcio

Los biomateriales basados en fosfatos de calcio (CaPs) son un grupo de compuestos que tienen una relación molar Ca/P en el rango de 0.5-2 y son empleados para la reconstrucción de defectos óseos, especialmente en el campo de la odontología, ortopedia y cirugía (18,19). Estos materiales presentan propiedades de biocompatibilidad, osteoconductividad y osteointegración que potencializan sus aplicaciones en el campo biomédico (Tabla 1).

Tabla 1 Principales compuestos de fosfato de calcio. Modificado y tomado de (18), (20)

Compuesto	Fórmula	Elipsis	Ca/P
Fosfato monocálcico monohidratado	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	MCPM	0.5
Fosfato monocálcico (anhídrido)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	MCPA	0.5
Fosfato dicálcico anhídrido	CaHPO_4	DCPA	1
Fosfato dicálcico dihidratado	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	DCPD	1
α - Fosfato tricálcico	$\alpha - \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	α -TCP	1.5
β - Fosfato tricálcico	$\beta - \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	β - TCP	1.5
Hidroxiapatita deficiente en calcio	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}$ $(\text{OH})_{2-x}$	CDHA	1.5-1.6
Hidroxiapatita	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	HA	1.67
Fluoroapatita	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$	FAP	1.67
Fosfato tetracálcico	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	TTCP	2

La nucleación y crecimiento de los CaPs en los sistemas biológicos ocurre en un medio rico en iones, lo cual afecta la cinética y termodinámica de la cristalización, así como también su estabilidad. Estudiar la sustitución iónica en los CaPs permite comprender mejor el proceso de biomineralización, control de las propiedades, aumento de la bioactividad del material y liberación de iones capaces de tratar enfermedades óseas (18,21).

El modelo estructural iónico de la familia de las apatitas muestra una estructura que puede aceptar sustituyentes catiónicos y aniónicos. La sustitución induce modificaciones en la cristalinidad, morfología, parámetros de celda y estabilidad de la estructura apatítica, afectando a su vez la solubilidad en condiciones fisiológicas. Esto permite adaptar sus propiedades de bioactividad,

biocompatibilidad y adsorción para adquirir características similares a las apatitas biológicas, las cuales no son estequiométricas, tienen imperfecciones estructurales, defectos e iones (22–24).

La apatita es capaz de incorporar en su estructura atómica casi la mitad de los elementos del sistema periódico; sin embargo, el número de sustituciones iónicas posibles en las bioapatitas se ve limitado por los elementos presentes en los fluidos corporales y por los parámetros estructurales (25). Los iones conocidos y/o reportados en las apatitas óseas o de los dientes son F^- , Cl^- , Na^+ , K^+ , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+} , citrato y carbonato. Las sustituciones de iones bivalentes pueden no causar desequilibrio de carga en la red de la apatita, pero iones monovalentes como Na^+ y K^+ , sí, ocasionando vacancias adicionales o sustituciones simultáneas de cationes y aniones sin la formación de vacancias o pérdida de equilibrio de cargas. Reemplazar los iones Ca^{2+} por otros cationes ocasiona la contracción o expansión de los parámetros de red, dependiendo del tamaño iónico (22).

La mayoría de investigaciones sobre sustituciones iónicas en CaPs involucra la hidroxiapatita (HA), compuesto de composición $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, presenta una estructura hexagonal con el grupo espacial $P6_3/m$. Es uno de los mayores constituyentes de la matriz ósea, es el más estable, más denso y menos soluble de los CaPs (26), es biocompatible y bioactiva; ha sido empleada en sustitutos óseos, como fuente de calcio en suplementos alimenticios, materiales dentales, como agente de liberación de fármacos, adsorbente de cromatografía líquida y proteínas, catálisis, intercambio iónico (18,22), inhibición del crecimiento de muchos tipos de células cancerígenas, entre otros (14).

La HA sintética es un material estequiométrico con relación Ca/P de 1.67, carece de trazas de iones beneficiosos que se encuentran en el tejido duro natural, razón por la cual es considerada como un material inferior de reparación ósea, carente de habilidad para acelerar el proceso de reformación ósea (18,21). Su estructura cristalina hexagonal la componen dos sitios diferentes de cationes, Ca (I) y Ca (II), pero sólo un medio de fosfato; puede ser descrita como un ensamble de fosfatos cruzados por canales de iones OH^- , paralelos al eje cristalográfico c (Figura 1) (21).

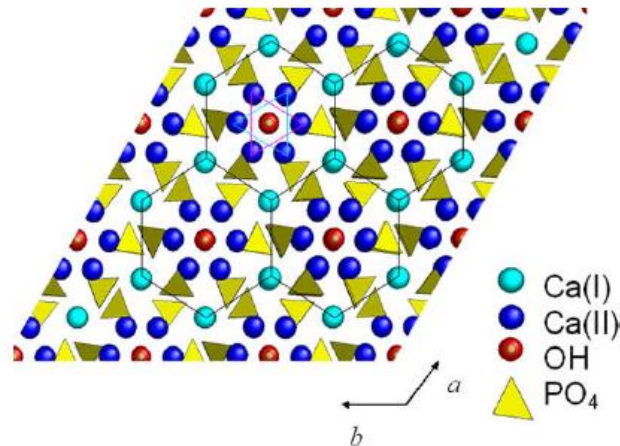


Figura 1 Estructura de la HA a lo largo del eje *c*. Las líneas negras conectan las columnas de Ca (I) en redes hexagonales. El color cian y los triángulos de color magenta conectan los átomos escalonados de Ca (II) presentes en el mismo plano, pero a diferentes distancias con respecto al eje *c*. Tomado de (21).

Las paredes de canales están formadas por átomos de Ca (II) dispuestos en un conjunto triangular escalonado. Los átomos de Ca (I) tienen diferentes medios y están posicionados en columnas paralelas a los canales de OH^- . Entre los 10 cationes, los 4 átomos de Ca (I) están fuertemente unidos a 6 oxígenos y débilmente unidos a otros 3 oxígenos (Ca (I)-O distancia de 0.255 nm), mientras que los 6 átomos de Ca (II) están rodeados por 7 oxígenos (Ca (II)-O distancia de 0.245 nm). Los átomos de Ca (I) están estrictamente alineados en columnas y cualquier cambio pequeño en las interacciones metal-oxígeno, afecta la estructura de la celda. Los átomos de Ca (II) pertenecientes a capas consecutivas están escalonados, lo cual permite desplazamientos aleatorios sin comprometer la estructura. Como consecuencia, cationes más pequeños que el Ca o cationes un poco más grandes a bajas concentraciones se sitúan preferiblemente en los Ca (I) donde están presentes las interacciones fuertes, mientras que los cationes más grandes ocuparían la posición de los Ca (II) a elevadas concentraciones (21,22).

Las sustituciones catiónicas pueden ocurrir en todos los rangos de composición, como sucede para Sr^{2+} , Cd^{2+} y Pb^{2+} ; sin embargo, en el caso de iones más pequeños como Zn^{2+} y Mg^{2+} , es limitado porque inhiben la cristalización de la HA. Las sustituciones aniónicas más importantes biológicamente, involucran F^- y Cl^- para OH^- ; CO_3^{2-} para PO_4^{3-} o OH^- . Las sustituciones de F^- son favorecidas por la propiedad de formación de puentes de hidrógeno y aumentan la estabilidad y cristalinidad (21).

Esta característica de las apatitas puede ser usada como una herramienta para desarrollar materiales que no solamente sean aplicados como agentes de formación de hueso sino también como agentes antimicrobianos (13).

1.2 Nanopartículas metálicas como agentes antibacterianos

Un agente antimicrobiano es un compuesto químico, natural o sintético, que mata o inhibe el crecimiento de los microorganismos. Los agentes que matan microorganismos se denominan agentes- *cida*, un prefijo que indica el tipo de microorganismo que mata. Se conocen agentes bactericidas, fungicidas y virucidas que matan bacterias, hongos y virus, respectivamente. Los agentes que no matan, sino que sólo inhiben el crecimiento se llaman agentes- *estáticos*, por ejemplo, agentes bacteriostáticos, fungistáticos y virustáticos (27).

Varios tipos de nanopartículas (NPs) y sus derivados han recibido gran atención por su potencial efecto antimicrobiano (es decir, antiviral, antibacterial y antifúngico) para aplicaciones como biocidas, tratamiento antibiótico y recubrimientos. NPs metálicas tales como plata (Ag), óxido de plata (Ag₂O), óxido de titanio (TiO₂), silicio (Si), óxido de cobre (CuO), óxido de zinc (ZnO), Au, óxido de calcio (CaO) y óxido de magnesio (MgO) han mostrado actividad antimicrobiana (5,28). Para comprender las propiedades antibacterianas de las NPs, es importante tener en cuenta que el mecanismo de actividad antibacteriana varía de nanopartícula a nanopartícula según su composición. Aunque para toda la variedad de NPs no se ha logrado explicar completamente su mecanismo antibacteriano, en la literatura se ha reportado que una NP de un material inherentemente antibacteriano, podría tener múltiples mecanismos de actividad antibacteriana, tales como, liberación de iones metálicos antibacterianos de la superficie de la NP y otras dependientes de las propiedades físicas antibacterianas de una NP, relacionadas a la penetración de la pared celular o daño de la membrana (29).

La Figura 2 representa los factores que influyen en los efectos antimicrobianos de los nanomateriales con NPs metálicas /óxidos metálicos, derivados de la literatura. En la esquina inferior izquierda se muestra la disolución de iones metálicos de los nanomateriales con metales, este proceso puede tomar lugar al interior o exterior celular. La esquina superior derecha, ilustra las propiedades “nano-específicas” tales como, defectos cristalinos, reactividad de la superficie que facilita la formación de radicales libres ocasionando peroxidación lipídica y deformación de las proteínas. Esquina superior izquierda, indica la activación de nanomateriales por agentes externos tales como iluminación UV, que llevan a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y sus reacciones con las moléculas biológicas. Debido a la complejidad de los procesos y la interdependencia de diferentes propiedades físicas y químicas en la efectividad del material antimicrobiano, se hace necesario identificar la contribución de cada factor según el sistema empleado (30).

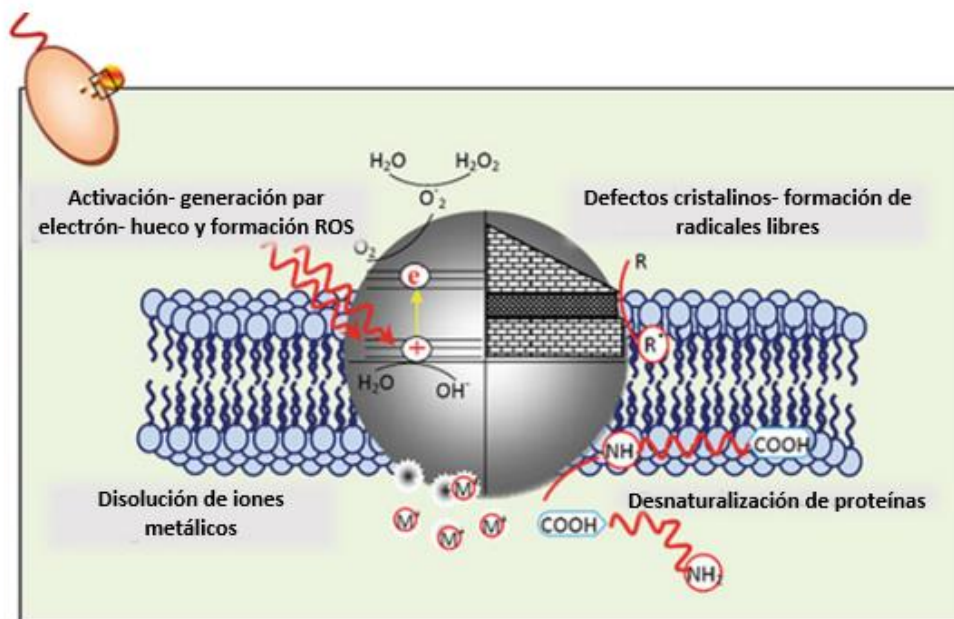


Figura 2 Factores causantes de la actividad antibacteriana de los nanomateriales con metales/óxidos metálicos. Tomado y modificado de (30)

1.2.1 Nanopartículas de Plata

La actividad antibacteriana de la Ag fue demostrada en el siglo XIX y el uso de varias formas de la Ag como control del crecimiento bacteriano en odontología, catéteres y heridas de quemaduras, es común; ha sido evaluada como un recubrimiento antimicrobiano en dispositivos ortopédicos y vasculares con cierto éxito. Un problema significativo con su aplicación es que no es esencial al huésped y puede ser tóxico (16). El mecanismo por el cual las NPs de Ag proporcionan efecto antimicrobiano es debido a su habilidad para unirse con las proteínas e interferir con procesos bactericidas y virales; además puede unirse a grupos sulfurosos tales como tioles (SH) en células de mamíferos, inactivando las proteínas de las bacterias (6,16).

Es bien conocido que iones Ag^+ y compuestos basados en Ag son altamente tóxicos a microorganismos, mostrando fuertes efectos biocidas en hasta 12 especies de bacterias, incluyendo *E.coli* (31). Otro posible mecanismo en la inhibición del crecimiento, es la formación de radicales libres en la superficie de la Ag. La generación descontrolada de radicales libres puede atacar los lípidos de la membrana y llevar a una ruptura de la membrana (32).

El efecto de las NPs de Ag depende del tipo de microorganismo, estudios han demostrado un efecto inhibitorio mayor en *E.coli* que en *S.aureus*. Resultados que sugieren que el efecto puede ser asociado a las características de la especie de bacteria; bacterias gram-positivas y gram-negativas tienen diferencias en la estructura de la membrana, la más importante es el espesor de la capa de peptidoglicano. Esta capa es una característica de la membrana de bacterias y no de células de

mamíferos; por tanto, si el efecto de las NPs de Ag está asociado con la capa de peptidoglicano, sería más fácil y más específico su uso como agente antibacteriano (32).

La mayoría de reportes en la literatura discuten la dependencia de la interacción de las NPs de Ag y las bacterias, con su tamaño; poco se conoce cómo afecta la forma de las NPs en su actividad biológica. Pal et al. demostraron que la inhibición del crecimiento de *E. coli* por la presencia de las NPs de Ag es significativamente diferente al variar la forma de las NPs. Para nanoplacas triangulares truncadas de Ag se observó casi una inhibición completa del crecimiento de la bacteria con un contenido de 1 µg. En el caso de NPs esféricas, un contenido de 12.5 µg redujo el número de colonias significativamente, mientras un contenido de 50 a 100 µg de NPs de Ag causó 100% de inhibición del crecimiento bacteriano. Las NPs con morfología de barras presentan el rendimiento más bajo, con 100 µg no hay inhibición completa (33).

1.2.2 Nanopartículas de óxido de magnesio

El magnesio (Mg), cuarto catión más abundante en el cuerpo humano, actúa como cofactor para varias enzimas y estabiliza la estructura del ADN y ARN, es esencial para muchos procesos en las células eucarióticas; las concentraciones de Mg en la dentina natural y ósea son de 1.23 wt% y 0.72 wt%, respectivamente. Fue usado por primera vez en cirugía ortopédica a principios del siglo XX, el Mg y las aleaciones de magnesio se han evaluado en aplicaciones ortopédicas y cardiovasculares (16). Comparado con TiO₂, plata, cobre y otros tipos de bactericidas sólidos, MgO NPs, son menos tóxicas y tiene buen potencial como nuevo material sólido bactericida (34). Las MgO NPs solas o en combinación con otros desinfectantes muestran excelente efecto antibacteriano y buenas propiedades fotocatalíticas por su gran área superficial específica; el Mg tiene un valor clínico significativo, puede ser introducido en los tejidos, debido a su propiedad de bajo peso, excelente conductividad térmica y calor específico (5,34).

El mecanismo de actividad antibacteriana de las NPs de MgO depende de la presencia de defectos o vacancias de oxígeno en la superficie de las NPs. La ocurrencia de reacciones de óxido-reducción en la superficie de las NPs de MgO lleva a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como, radicales superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y radicales hidroxilo (OH^{*}). Las proteínas en la pared celular de las bacterias tienen muchos enlaces peptídicos. El anión superóxido atacaría al carbonilo en los enlaces peptídicos permitiendo eventualmente la destrucción de la bacteria. Krishnamoorthy et al. atribuyeron la diferencia de la actividad bactericida presentada por las NPs de MgO en *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S.aureus*, a la producción elevada de ROS que excede la capacidad del sistema de defensa antioxidante celular causando que las células entren en un estado de estrés oxidativo; lo cual resulta en el daño de los componentes celulares, tales como, lípidos, proteínas y ADN. Las bacterias analizadas producen superóxido dismutasa, una enzima de defensa celular antioxidante que puede actuar sobre los O₂⁻ producidos por las NPs MgO, originando la formación de H₂O₂ que penetra en *E.coli* oxidando su sistema activo y matándola. Por el contrario,

otra enzima antioxidante, catalasa, es producida por *P. aeruginosa* y *S.aureus* neutralizando H_2O_2 a H_2O y O_2 , por lo tanto, son menos susceptibles (1).

Al aumentar el área superficial de las partículas de MgO incrementa la concentración de OH^- en su superficie, que a su vez conlleva a mayor concentración de O_2^- en solución y consecuentemente se obtiene mejor efectividad en la destrucción de la pared celular de la bacteria. La actividad antibacteriana de las NPs de MgO depende del tamaño de partícula. Sin embargo, cuando el tamaño de partícula es demasiado pequeño, por ejemplo inferior a 15 nm, el efecto de agregación es significativo afectando la interacción con la bacteria y por ende su eficiencia (35).

Las propiedades antibacterianas de NPs de MgO son débiles comparadas con las presentadas por materiales que tienen Ag y actividad fotocatalítica. La concentración mínima inhibitoria (CMI) de las NPs de MgO contra *E.coli* es en el rango de 50-1000 mg/mL, el cuál es mucho más alto que el de las NPs de Ag (<10 mg/L) y NPs de ZnO (~ 100 mg/mL, bajo radiación UV). Varias investigaciones han sido orientadas a mejorar la actividad antibacteriana de estas NPs, dopándolas o mediante la formación de compuestos (34,36,37).

Zhu et al. demostraron mejor actividad antibacteriana en nanocompuestos de Ag-MgO que en NPs de MgO e igual en Ag, sugiriendo un efecto sinérgico entre las NPs de Ag y MgO. La detección de ROS, producción de O_2^- es considerado el factor más importante para la promoción de la actividad antibacteriana del nanocompuesto. La presencia de NPs de Ag en la superficie de MgO acelera la transferencia de electrones y facilita la reducción de un electrón del oxígeno adsorbido, generando más cantidad de O_2^- (Figura 3) (36).

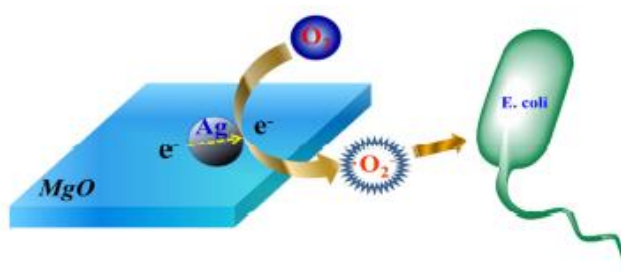


Figura 3 Mecanismo de actividad antibacteriana para nanocompuestos de Ag-MgO. Tomado de (36)

Las propiedades de superficie de las NPs de MgO son un factor importante en la generación de ROS. NPs con elevada concentración de defectos superficiales presentan la más alta cantidad de adsorbatos y formación de ROS, contrario a las NPs con menor cantidad de defectos superficiales que no exhiben ROS. A pesar de esta diferencia, ambos tipos de NPs tienden a ocasionar similar toxicidad hacia *E.coli* y *B.atrophaeus*, lo que indica que hay otro mecanismo que contribuye a la actividad antibacteriana; el cual está relacionado con la interacción del nanomaterial y las moléculas cargadas negativamente en la superficie de la bacteria, la unión de MgO a las moléculas

de la membrana celular ocasiona daño mecánico en la membrana (la elasticidad de la membrana cambia al unirse el material a las moléculas de la membrana) (38).

1.2.3 Nanopartículas de platino

Se ha demostrado que las NPs de platino (Pt) tienen la capacidad de entrar en las células; causan daño en el ADN y cambios en la respuesta antioxidante. En 1965, Rosenberg et al. publicaron un reporte en el que las sales de platino, identificadas como $[\text{PtCl}_6]^{-2}$, cuando estaban presentes en un medio libre de amonio e irradiadas con radiación ultravioleta (UV) formaron tres especies iónicas sustituidas con ligandos, cada una con diferente efecto biológico en *E.coli*; la doble carga negativa en especies $[\text{PtCl}_6]^{-2}$ fue bactericida; especies intermedias con una sola carga, $[\text{PtCl}_5\text{NH}_3]^{-}$ no presentaron efecto en *E.coli*; especies neutras $[\text{PtCl}_4\text{NH}_3]$ inhibieron la división celular sin efecto alguno en el crecimiento celular (39).

Partículas con tamaños pequeños muestran mejor actividad antibacteriana debido a la presencia de mayor cantidad de átomos en la superficie; sin embargo, se ha corroborado que la forma de las NPs, también influye. Pelka et al. demostraron que la respuesta de las células dependía de la cantidad y tamaño de NPs de Pt. A concentraciones de 80 y 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aumentó la producción de ROS, debido a la formación de agregados de partículas con un tamaño de 5-8 nm; concentraciones inferiores favorecen la difusión de las NPs dentro de las células, causando daño celular por la liberación de iones Pt^{2+} que bloquean la división celular al unirse al ADN (40). Managa et al. reportaron que NPs de Pt con morfología cúbica interactúan de manera más favorable con las células comparado con NPs hexagonales; NPs sin forma determinada limitan la penetración de la pared celular, reflejado esto en una menor actividad antibacteriana contra *S.aureus* (41).

La formación de complejos por el Pt exhibe actividad antibacteriana y antitumoral. López et al. probaron que nanocompuestos de $\text{H}_2\text{PtCl}_6/\text{SiO}_2$ y $\text{H}_2\text{PtCl}_6/\text{TiO}_2$, obtenidos por el método de sol-gel, pueden interactuar con el ADN y por tanto ser usados como alternativa en terapia local del cáncer. Las pruebas *in vitro* de reactividad al ADN e *in vivo* en tumores cerebrales C6 en ratas Wistar, indicaron que la incorporación de iones Pt en la estructura del titanio y de la sílice, mejora la reactividad al ADN debido a la presencia de defectos en la red y grupos superficiales OH. Bajas concentraciones del Pt son necesarias para obtener alta dispersión en la superficie Pt – SiO_2 y Pt – TiO_2 . Los compuestos de Pt coordinan al ADN, probablemente por la formación de enlaces con el ADN a través de hidrólisis de los grupos fosfato. Un buen contacto del material con la membrana celular permite la liberación de los compuestos de Pt y alta área superficial del material es importante (42).

Por otro lado, el platino es uno de los metales más activos para mejorar la actividad fotocatalítica bajo radiación UV, puede producir una barrera Schottky más alta entre metales facilitando la captura de electrones y dificultando la recombinación electrón-hueco (43,44).

1.3 Hidroxiapatita sustituida con nanopartículas metálicas

La HA posee varias limitaciones, entre las que se encuentra la ausencia de actividad antibacteriana que afecta su estabilidad y causa fallas en implantes. Lo cual ha generado especial interés en la incorporación de agentes antibacterianos inorgánicos como la plata (Ag^+), cobre, (Cu^{2+}), zinc (Zn^{2+}), titanio (Ti^{4+}) y óxidos metálicos (11,45).

Polvos de HA sustituida con Ag han mostrado excelente actividad antibacteriana contra *E.coli*, su efecto depende de la concentración de la Ag y su viabilidad en aplicaciones biomédicas es determinada por la citotoxicidad. A altas concentraciones de Ag las propiedades de biocompatibilidad y osteoconductividad de la HA disminuyen. La viabilidad celular de este material puede aumentar con la co-sustitución de Mg (45).

La actividad antibacteriana de iones inorgánicos es selectiva; en algunos casos no funcionan bien. HA dopada con Ti (IV) y co-sustituida con iones Ag^+ (HATiAg) y Cu^{2+} (HATiCu) presentan actividad antibacteriana con y sin radiación UVA contra *E.coli* y *S.aureus*, mientras que HA dopada con Ti (IV) y co-sustituida con Zn^{2+} (HATiZn) tiene actividad bajo radiación UVA. Esto se debe a la generación de O_2^- en ambos casos, con y sin luz; HATiZn sólo tiene acción bacteriostática, caso contrario con la presencia de iones Ag^+ y Cu^{2+} que matan la bacteria. HA, HATi sólo tienen la función de descomponer la bacteria bajo radiación UVA, pero si la radiación es débil no se forman suficientes O_2^- y ningún efecto es observado en la bacteria (46).

Nano HA multisustituida también ha sido evaluada en cultivos de bacterias *E.coli*, *S. aureus*, *Staphylococcus spp*, *Bacillus cerius* y *Candida albicans*. HA sustituida con Zn, Ag y Au tiene efecto bactericida en todas las cepas, siendo más efectivo en *S.aureus*; sin embargo, si no hay presencia de iones Ag en el compuesto, no hay efecto contra las bacterias (11).

Alshemary et al. analizaron la actividad antibacteriana de HA, SiHA, Mg-SiHA y Ni-Mg-SiHA contra *P.aeruginosa* y *E.coli*; sólo el compuesto Ni-Mg-SiHA inhibió el crecimiento de las bacterias, debido a la liberación en el medio de iones N^{2+} , los cuales son rápidamente atacados por los grupos fosfato y carboxílicos, (cargados negativamente) presentes en la superficie de la bacteria. La acumulación de iones N^{2+} en la pared celular de la bacteria inhibe la respiración de las células, también la penetración de estos iones en el citoplasma de las células ocasiona la muerte celular. Los iones N^{2+} pueden interactuar con Fe^{2+} dentro del citoplasma generando patogenicidad bacteriana o puede

unirse a grupos SH de la metionina y cisteína inhibiéndolas. Al igual, pueden unirse a los grupos PO_4^{3-} del ADN, impidiendo su replicación (12).

La incorporación de Mg en la HA permite obtener un material con propiedades antimicrobianas y larvicidas. Udhayakumar et al. observaron mayor zona de inhibición en *E.coli* que en *S.aureus* con la presencia de NPs de Mg-HA sintetizadas por el método de radiación por microondas; evaluaron el efecto de estas NPs en larvas instar de *Ae.aegypti*, *An.stephensi* y *Cx. Quinquefasciatus*, los iones Mg hacen que la estructura de las NPs sea más compatible con la capa de cutícula de los mosquitos y ocasione la ruptura de la célula; sin embargo, NPs de HA también mostraron actividad larvicida debido tal vez a las propiedades de intercambio iónico, a los enlaces O – H y a los grupos fosfato (13).

HA carbonatada y con sustitución de magnesio puede ser una apatita biológica de interés, ya que Lala et al. demostraron suficiente viabilidad celular de células de ovarios de Hamster a una concentración de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de NPs por un tiempo de incubación de 48 horas, confirmando la citocompatibilidad de este compuesto (47).

El magnesio es de gran importancia, en los tejidos calcificados, la cantidad de magnesio asociada con la fase apatítica es mayor a la encontrada al inicio del proceso de reestructuración ósea y disminuye con el aumento de la calcificación. El magnesio aumenta la cinética de nucleación de la HA; por esta razón la concentración del magnesio es más alta en el cartílago y en el hueso joven hay un crecimiento evidente, este podría ser un factor importante en los cambios cualitativos de la matriz ósea que determinan la fragilidad ósea. La deficiencia de magnesio afecta todas las etapas del metabolismo óseo, causando retardo en el crecimiento óseo, disminución de la actividad de los osteoblastos y osteoclastos y osteopenia. Consecuentemente, la incorporación de iones magnesio en la estructura de la HA es de gran interés para el desarrollo de hueso artificial (23).

No obstante, la sustitución iónica puede afectar la estructura cristalina, la carga superficial, la solubilidad, entre otras propiedades; así, es recomendable dopar con bajas concentraciones para evitar cambios en el rendimiento de la HA (22,48). El Mg tiene un efecto inhibitorio en la nucleación y crecimiento de la HA, la sustitución del Ca por el Mg sólo ocurre a rangos de composición limitados ($(\text{Mg}/\text{Mg} + \text{Ca})$ entre 5 y 7% mol) y se ve reflejada en una reducción del eje c , debido a que el radio iónico del Mg^{2+} (0.078 nm) es considerablemente más pequeño que el Ca (0.106 nm) (21,22,24).

1.4 Activación de nanomateriales antibacterianos con radiación ultravioleta

La fotocatalisis se define como “la aceleración de una fotorreacción por la presencia de un catalizador”, lo cual indica que es necesario la presencia de luz y un catalizador para llevar a cabo o acelerar una transformación química (49).

Óxidos metálicos semiconductores tiene especial atención por sus propiedades fotocatalíticas. Las reacciones fotocatalíticas se llevan a cabo en la superficie del semiconductor con presencia de radiación en un rango específico. Entre los fotocatalizadores típicos se encuentran materiales de óxidos semiconductores (TiO_2 , ZnO , CuO , MgO , SnO_2 , WO_3 , SiO_2 , Fe_2O_3 y Nb_2O_3 , entre otros), nanocompuestos de híbridos metálicos (CdS y ZnS) y estructuras dopadas (Ag/TiO_2 , TiO_2/CuO , TiO_2/Pt y otros)(49,50).

Los óxidos metálicos semiconductores participan en reacciones redox catalizadas por luz debido a su configuración electrónica única (tal como una banda de valencia llena y una banda de conducción vacía) y a la producción pares de electrón-hueco. La cantidad de energía de luz requerida para producir los pares de electrón-hueco dependen del tamaño de banda gap (E_g), el cual es específico para cada semiconductor. Por consiguiente, a cada fotocatalizador le corresponde un rango de longitudes de onda de luz con el cual pares electrón- hueco podrían ser inducidos por absorción de energía y foto-activación. Dependiendo de la longitud de onda de radiación ultravioleta (UV) puede dividirse en UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) y UVC (200-280 nm) (49,50).

Cuando un fotón con una energía $h\nu$ iguala o excede la energía de banda gap (E_g) del semiconductor, un electrón (e_{cb}^-) pasa de la banda de valencia (VB) a la banda de conducción (CB) dejando un hueco (h_{vb}^+). Los electrones en estado excitado de la CB y los huecos de VB pueden recombinarse en picosegundos y disipar la energía en forma de calor, o reaccionar con donantes de electrones y aceptores de electrones adsorbidos sobre la superficie semiconductor (49,50).

Por ejemplo, la energía de banda de la anatasa del TiO_2 es aproximadamente 3.2 eV, para iniciar la fotocatalisis es necesario fotones que ejerzan energía ≥ 3.2 eV. Esto implica una fuente de luz que tenga una longitud de onda inferior a 385 nm. La foto generación de pares de electrón (e^-)-hueco (h^+) sobre la superficie de TiO_2 permite que reaccionen con electrones aceptores o donadores en la superficie, tales como, moléculas de O_2 , H_2O y otros compuestos orgánicos que dan inicio a las reacciones redox. Como resultado de este proceso se tiene la formación de especies ROS que inactivan los microorganismos (49,50).

El MgO ha sido comparativamente menos estudiado a otros óxidos como TiO₂ y ZnO, posee una energía de banda gap amplia ~5.4 eV característica que lo hace menos activo fotocatalíticamente. Este óxido metálico genera luminiscencia en el rango espectral UV-violeta-azul cuando se excita ópticamente por debajo del valor del intervalo de banda, debido a la presencia de defectos nativos; también se ha reportado la formación de especies ROS en la superficie del MgO bajo radiación UV (365 nm). Aunque el MgO presenta actividad antibacteriana sin luz, se ha reportado que su actividad mejora al ser irradiado con una fuente de luz UV. Por ello, es necesario investigar el efecto de radiación sobre la actividad antibacteriana de este óxido semiconductor (38,50).

1.5 Métodos de síntesis

Dado que las propiedades de los materiales a nanoescala pueden verse afectadas por la forma y tamaño de las nanoestructuras, la eficiencia de procesos fotocatalíticos y actividad antimicrobiana dependen de estos parámetros, el control de las propiedades estructurales de NPs es crítico para el desarrollo de materiales con potenciales aplicaciones biomédicas (43).

Nanopulvos de CaPs pueden ser sintetizados por varios métodos: estado sólido, métodos químicos húmedos, proceso hidrotermal, técnicas mecanoquímicas, ondas de choque de pH, proceso de microondas, hidrotermal asistido con microemulsiones y técnicas de nanoemulsión. Diferentes modificaciones en los métodos e incluso la combinación entre ellos ha sido estudiado con el fin de obtener NPs de CaPs con un control preciso de la microestructura, tamaño y forma de partícula (22).

En la Tabla 2, se presenta la comparación entre cada uno de los métodos de síntesis, resaltando los pro y contra. Los métodos secos son adecuados para producción de grandes cantidades de polvo; en síntesis por estado sólido, los precursores son molidos y luego calcinados a altas temperaturas (1000°C). La elevada temperatura de calcinación permite obtener una estructura con alto grado de cristalinidad, pero los polvos presentan heterogeneidad en su composición, debido a los pequeños coeficientes de difusión en la fase sólida; se puede obtener diversas morfologías con tamaños usualmente micrométricos. Por ende, es un método poco apropiado para la fabricación de NPs de HA (51).

Tabla 2 Diferentes métodos para la síntesis de nanopartículas de HA. Modificado y tomado de (51)

Método	Proceso			Características de polvos					
	Cantidad de químicos	Costo	Morfología	Grado de cristalinidad	Pureza de la fase	Relación Ca/P	Tamaño	Distribución de tamaño	
Métodos secos	Estado sólido	poco	bajo	diversa	muy alto	baja	variable	micro	amplio
	Mecanoquímico	poco	bajo	diversa	muy alto	baja	no estequiométrica	nano	amplio
Métodos húmedos	Precipitación química	poco	bajo	diversa	bajo	variable	no estequiométrica	nano	variable
	Hidrólisis	poco	alto	diversa	variable	alta	estequiométrica	variable	variable
	Sol-gel	variable	variable	diversa	variable	variable	estequiométrica	nano	estrecho
	Hidrotermal	variable	alto	en general como agujas	muy alto	alta	estequiométrica	nano o micro	amplio
	Emulsiones	mucho	alto	en general como agujas	bajo	variable	no estequiométrica	nano	estrecho
	Sonoquímico	poco	bajo	diversa	variable	alta	variable	nano	estrecho
Procesos a altas temperaturas	Combustión	poco	bajo	diversa (generalmente irregular)	variable	alta	variable	nano	amplio
	Pirólisis	variable	bajo	diversa	alto	variable	estequiométrica	NPs embebidas en agregados micrométricos	variable
	Síntesis de fuentes biogénicas	poco	bajo	diversa	variable	alta	variable	variable	variable
	Combinación de procedimientos	variable	variable	diversa	alto	alta	estequiométrica	nano	variable

1.5.1 Método mecanoquímico

Este método permite obtener estructuras con diversas morfologías, alto grado de cristalinidad, baja pureza, tamaños nanométricos. Debido a la perturbación de los enlaces de las especies en la superficie como resultado de la presión, mejora la termodinámica y cinética de las reacciones entre los sólidos. Tiene las ventajas de simplicidad y reproducibilidad de un procedimiento en estado sólido para la producción en masa y las características básicas de una reacción húmeda para generar polvos con una estructura aceptable. Las principales variables del proceso incluyen el tipo de reactivos, el medio de molienda, el tipo y diámetro de las bolas de molienda, el tipo de atmósfera, la duración de las etapas de molienda, entre otras (51).

Por otra parte, las reacciones químicas húmedas tienen la ventaja de controlar su morfología y el tamaño promedio de polvo. Según los datos experimentales reportados, estas técnicas son las más factibles para la fabricación de HA nanométrica. Son realizadas por un número de rutas que involucran diversos aditivos químicos y equipos (51).

1.5.2 Método de Precipitación química

Es la ruta más simple para la síntesis de HA nanométrica. El procedimiento consiste en la adición gota a gota de un reactivo a otro con continua agitación. La relación estequiométrica Ca/P se mantiene de acuerdo a la relación en la HA (1.67). La última etapa, consiste en lavar la suspensión resultante, filtrar y secar. Los polvos obtenidos, por lo general no son estequiométricos y poseen baja cristalinidad sin forma regular; muchos factores causan estos inconvenientes, la alta afinidad química de la HA con algunos iones, la compleja naturaleza de los cristales CaP, interacciones puente de hidrógeno entre las partículas HA y el rol de los parámetros cinéticos, que dependen de las condiciones experimentales, prevaleciendo sobre los parámetros termodinámicos (51).

Estudios recientes proponen rutas alternativas basadas en varios aditivos o modificación del proceso principal del método de precipitación química. Por ejemplo, el uso de sistemas biomiméticos con plantillas, en los cuales se puede controlar significativamente, a bajas temperaturas y pHs, la morfología y cristalinidad de los polvos. En esta estrategia, varias macromoléculas actúan como plantillas temporales o centros de nucleación para modular la morfología e incrementar la cristalinidad, las macromoléculas se adsorben sobre la superficie del cristal e influyen en el crecimiento del cristal semilla (51).

La proporción de átomos en la superficie de las NPs aumenta a tamaños de partículas menores a 100 nm, lo cual incrementa la reactividad, haciendo de ellos sitios altamente reactivos. Cuando el porcentaje de átomos en la superficie aumenta, se vuelven más reactivas y menos estables. Los grupos polares de los surfactantes pueden ser adsorbidos en la superficie de las NPs, debido a las

interacciones electrostáticas, disminuyendo las interacciones partícula-partícula y evitando la formación de aglomerados (52).

Las macromoléculas más empleadas como plantillas de HA son surfactantes como bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) y polietilenglicol (PEG). Los surfactantes son moléculas anfifílicas con una parte hidrofílica y otra hidrofóbica, pueden autoensamblarse para formar micelas tan pronto como su concentración exceda la concentración micelar crítica (CMC). A ciertas concentraciones y pH, se forman micelas con una forma específica y actúan como centros para el crecimiento de cristales (51,52).

1.5.3 Método Sol- gel

Síntesis por sol- gel fue uno de los primeros métodos propuestos para la obtención de HA. Sin embargo, el recubrimiento de diferentes sustratos tiene mayor contribución al proceso de sol- gel de HA, sólo pocos estudios se han enfocado directamente en la síntesis de NPs de HA. Este método ofrece ventajas a nivel molecular en la mezcla de reactivos mejorando la homogeneidad química de los polvos; requiere bajas temperaturas de formación y fusión; los polvos obtenidos presentan una estructura estequiométrica con gran área superficial y tamaño pequeño de agregados. Estudios *in vitro*, reportaron que la biorreabsorbibilidad de la HA sintetizada por sol- gel es mayor que los polvos convencionales y cercana a la apatita biológica. Entre las mayores desventajas, se encuentra la formación de una fase secundaria (óxido de calcio, CaO), el costo elevado de algunos precursores y alta complejidad en el manejo de los mismos (51).

1.5.4 Método hidrotermal

La técnica hidrotermal ha llegado a ser una de las herramientas más importantes para el desarrollo de materiales avanzados con nanoestructuras y amplias aplicaciones en electrónica, optoelectrónica, catálisis, cerámicas, almacenamiento de datos magnéticos, biomédica, biofotónica, entre otros. El término hidrotermal es de origen geológico, el británico Sir Roderick Murchison (1792-1871) lo empleó por primera vez para describir la acción del agua a elevadas temperaturas y presiones en los cambios producidos en la corteza terrestre, llevando a la formación de varias rocas y minerales (53).

Se puede definir el proceso hidrotermal como una reacción heterogénea de solventes acuosos o mineralizadores bajo condiciones de elevadas temperaturas y presiones, para disolver y recristalizar materiales que son relativamente insolubles a condiciones normales. La palabra hidrotermal, viene del griego, hydros 'agua' y thermos 'calor' (53).

Byrappa y Yoshimura definen *hidrotermal* como cualquier reacción química llevada a cabo en un sistema cerrado en presencia de un solvente (acuoso o no acuoso) a temperatura superior a la ambiente y presión mayor a 1 atm (54). Sin embargo, algunos químicos emplean el término

solvothermal, para cualquier reacción química en presencia de un solvente no acuoso o solvente en condiciones supercríticas (53).

Algunos autores definen las reacciones hidrotermal como casos especiales de reacciones químicas de transporte. Debido a las propiedades específicas, particularmente de alta solvatación, compresibilidad y transporte de masa de estos solventes, se puede esperar la ocurrencia de diferentes tipos de reacciones (54),

- Síntesis de nuevas fases o estabilización de nuevos complejos.
- Crecimiento de cristales de varios compuestos orgánicos.
- Preparación de materiales finamente divididos y microcristales con tamaño y morfología bien definidos para aplicaciones específicas.
- Lixiviación de minerales en extracción metálica.
- Descomposición, alteración, corrosión, grabado.

En cualquier sistema hidrotermal, la acción del solvente a elevadas temperaturas y presiones es importante. El desarrollo de procesos hidrotermales depende del uso adecuado de solventes que incrementen la solubilidad de los compuestos deseados. El agua es el solvente más importante y más comúnmente usado; sin embargo, varios compuestos no presentan alta solubilidad en el agua incluso a temperatura supercrítica. Se ha observado que la presión no tiene un efecto directo en la velocidad de crecimiento de los cristales, pero puede influir en la transferencia de masa y solubilidad de los componentes (54).

Las NPs obtenidas de las condiciones hidrotermales son estequiométricas y altamente cristalinas. Además, la pureza de la fase y la relación Ca/P del precipitado de HA mejoran significativamente con el aumento de la temperatura hidrotermal (54). Los parámetros más importantes en el método hidrotermal son la temperatura, pH y tiempo de reacción. En el proceso hidrotermal la HA no cristaliza completamente a temperaturas inferiores a 120°C, pero sí a temperaturas de 160°C y tiempos de reacción mayores a 8 h (55). A pH de 10-11 se ha logrado sintetizar HA con excelentes propiedades estequiométricas y orientación estructural (56–58).

1.5.5 Método de emulsiones

El control de la morfología, el tamaño y distribución de tamaño de partícula es difícil, especialmente cuando se busca sintetizar materiales con un mínimo de aglomeración y agregación. El proceso de emulsión ha sido empleado para refinar los agregados y restringir la formación de aglomerados (51,59).

Una microemulsión es una dispersión termodinámicamente estable de dos fluidos inmiscibles; el sistema es estabilizado con la adición de surfactantes. Se conocen diferentes tipos de microemulsiones, agua en aceite (W/O) (micelas inversas) y aceite en agua (O/W) (micelas directas).

La mayoría de micelas comúnmente tienen morfología esférica (menor energía superficial), un cambio en la función y geometría de los surfactantes, también como las condiciones de solución (concentración de surfactantes, fuerzas iónicas, pH y temperatura), la forma de la micela puede cambiar a cilíndrica, lamelar, cúbica o hexagonal. La Figura 4, muestra un diagrama típico de fase para sistemas micelares, el cual indica que controlando la relación de los componentes en el sistema surfactante/agua/aceite, las fases de las micelas pueden variar ampliamente (60).

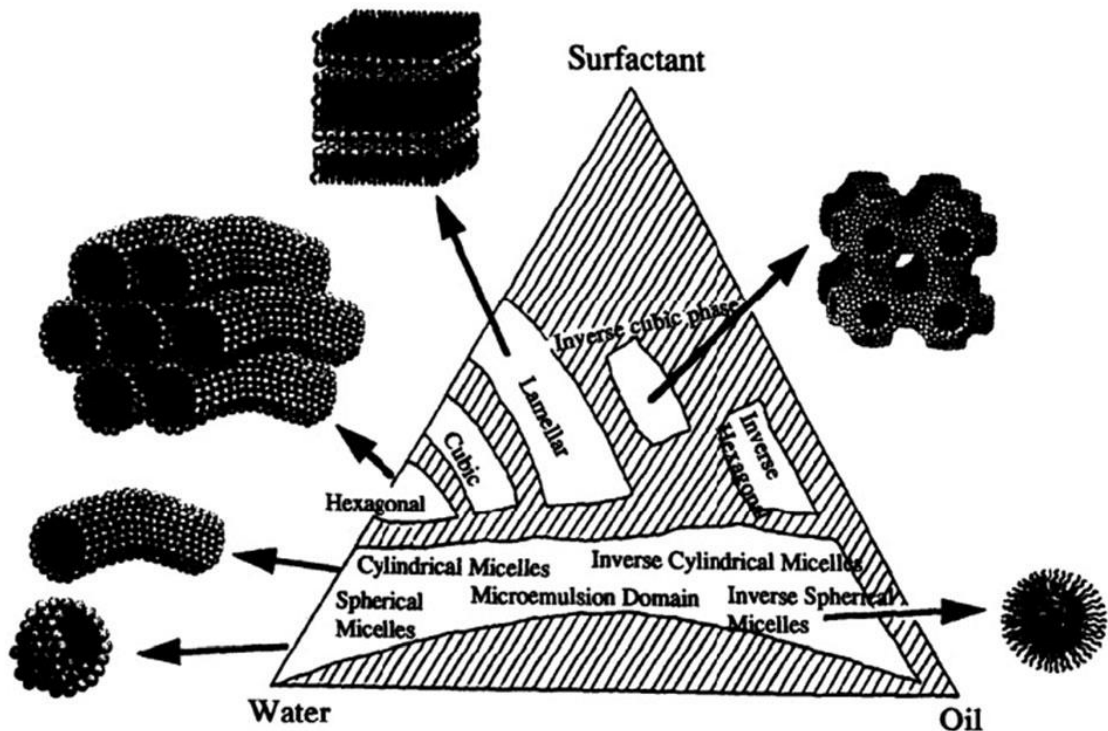


Figura 4 Diagrama de fases ternario para sistemas surfactante/agua/aceite. Tomado de (60)

Estos sistemas son dinámicos, las micelas colisionan frecuentemente al azar por movimiento Browniano y se unen para formar dímeros, que pueden intercambiar contenido y luego deshacerse de nuevo. Este proceso de intercambio es fundamental para la síntesis de NPs dentro de las micelas inversas “plantillas”, permite que diferentes reactivos solubilizados en soluciones micelares separadas reaccionen al mezclarse. Las micelas en este sistema son “nano-reactores”, proporcionan un medio adecuado para controlar la nucleación y el crecimiento. Además, en las últimas etapas de crecimiento, la estabilización estérica proporcionada por la capa del surfactante previene la formación de agregados (61).

La estructura química del surfactante es importante, peso molecular y tamaño relativo, de la parte hidrofílica con respecto a la hidrofóbica. Tres principales categorías de surfactantes han sido empleados, iónicos (catiónicos y aniónicos), no iónicos y copolímeros con varios pesos moleculares.

La diferente naturaleza química y pesos moleculares de estos surfactantes hacen posible la formación de partículas de HA con diversas geometrías: esferas, barras, discos, entre otros (51).

El CTAB ($C_{19}H_{42}BrN$) es el surfactante más popular en la síntesis de HA, las moléculas son ionizadas para crear cationes de una estructura tetraedral, seguido por la formación de una capa a través de las partes catiónicas. Alrededor de esta capa (manto) de iones, los contra iones PO_4^{3-} con las moléculas de agua pueden formar una capa difusa, iniciando el proceso de nucleación (51).

La función del CTAB como surfactante iónico es la estabilización electrostática del sistema de microemulsión, proporciona una película muy flexible que favorece el intercambio dinámico de las micelas. La incorporación de alcoholes como co-surfactantes pueden mejorar las propiedades interfaciales de la microemulsión; los alcoholes modifican los parámetros de empaquetamiento del surfactante por absorción de la película interfacial, influyendo en el radio de curvatura de las gotas de microemulsión (51).

El PEG es un polímero lineal constituido de unidades repetitivas de $(-CH_2 - CH_2 - O -)$, es muy soluble en varios solventes orgánicos polares y apolares, también como en agua. Sus residuos hidrófilos descargados y su elevada movilidad superficial conducen a una exclusión netamente estérica para estabilizar la superficie en sistemas acuosos. Por tanto, el PEG reduce la tendencia de partículas a agregarse por estabilización estérica, modifica la superficie de nanocristales y actúa como agente dispersante durante el proceso de síntesis (52).

Este polímero reduce la velocidad de liberación del calcio y retiene la formación de cristales de HA. Al ser disuelto el PEG en solución acuosa, se forma un enlace PEG-OH y luego es quelado con Ca^{2+} liberado de $Ca(NO_3)_2$ para formar enlaces PEG-O- Ca^{2+} -O-PEG. Esto luego reacciona con el PO_4^{3-} del $(NH_4)_3PO_4$ para producir núcleos de cristal de HA. Un incremento en la concentración de PEG, ocasiona que los depósitos iniciales gradualmente disminuyan y grandes cantidades son requeridas. Cuando la velocidad de liberación de calcio y la velocidad de depósito de núcleos del cristal alcanza un equilibrio dinámico, los núcleos de HA son depositados isotrópicamente y finalmente se obtienen partículas esféricas (52).

El solvente afecta la velocidad de crecimiento de las partículas, tamaño final y polidispersidad. Moléculas de solventes más pequeñas y menos voluminosas, como el ciclohexano, pueden penetrar en las cadenas del surfactante, aumentando su curvatura y rigidez (61).

En la síntesis de HA realizada en el sistema agua en aceite (W/O), en el cual las micelas inversas se encuentran dispersas en una fase oleosa continua, cada micela consiste de gotas en solución rodeadas por ciertos grupos moleculares del surfactante, formando una piscina suspendida en la fase oleosa. La adición de una segunda microemulsión que contiene otro reactivo, la fusión entre las micelas inversas causa la reacción entre los iones calcio y fosfato y finalmente la formación de cristales de HA (Figura 5) (51,61).

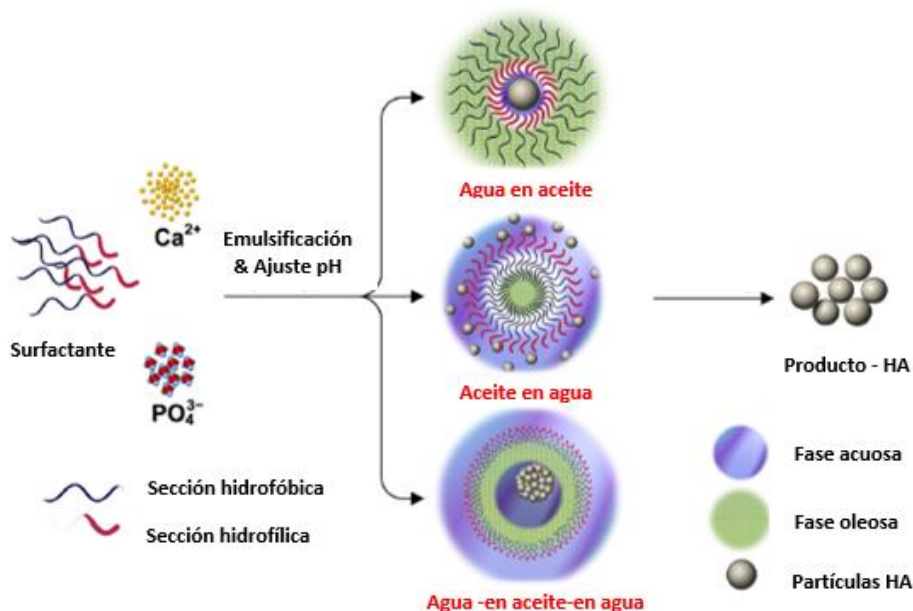


Figura 5 Rutas principales en la síntesis por el método de emulsión de NPs de HA. Modificado de (51)

La síntesis hidrotérmal asistida con microemulsiones (solvotérmal) permite obtener NPs con diferente morfología (nanobarras, nanoláminas, agujas, bigotes, entre otros). La nucleación de la HA ocurre primero a temperatura ambiente sin las micelas inversas y luego se genera la nucleación inicial para el crecimiento a elevada temperatura y presión. Las microemulsiones no sólo pueden servir como nano-reactores para controlar el tamaño y distribución de tamaño de partícula, sino también para la inhibición del exceso de aglomeración (56).

Investigaciones enfocadas en la síntesis de HA empleando el método solvotérmal incluyen el análisis de varios factores del sistema que influyen en el tamaño y control de forma de las NPs, entre ellos, el tipo de solvente, la relación molar co-surfactante/surfactante (P_o), la concentración de reactivos y la relación molar agua/surfactante (w_o). Se ha demostrado que cambios en los parámetros P_o y w_o son relevantes en la obtención de NPs con menor tamaño y morfología controlada, atribuyendo mayor influencia del parámetro w_o al control del tamaño (62,63).

1.6 Métodos de evaluación de la actividad antibacteriana

Determinar la efectividad de una nanopartícula como agente antibacteriano requiere técnicas experimentales que permitan medir la viabilidad de la bacteria después de la exposición. La técnica escogida para un estudio, depende del tipo de datos necesarios. La mayoría de métodos de evaluación usados en las publicaciones, relacionadas a evaluar la actividad antibacteriana de NPs, son adaptados de los protocolos estándar empleados en las pruebas microbiológicas *in-vitro* para antibióticos. Las pruebas de concentración mínima inhibitoria y zona de inhibición son técnicas generalmente usadas para evaluar la susceptibilidad bacteriana de las NPs, otras pruebas

sofisticadas han sido empleadas con menor frecuencia para proporcionar datos relacionados al porcentaje específico de bacterias viables en la presencia del agente antibacteriano (30).

1.6.1 Concentración mínima inhibitoria

La actividad antibacteriana se mide determinando la concentración más baja necesaria de un agente, para inhibir el crecimiento de un organismo control (pero no necesariamente la muerte), este valor recibe el nombre de concentración mínima inhibitoria (CMI). Las técnicas estándar para determinar la CMI generalmente son: dilución en agar y dilución en caldo (27,30).

En las pruebas de dilución en agar, el agente antimicrobiano se incorpora dentro del medio con agar, de manera tal que cada placa contenga una concentración de antibiótico diferente. Después de la incubación, las colonias de las bacterias son visualmente contadas. Una ausencia de colonias de bacteria significa que las bacterias son inhibidas o matadas a las concentraciones del antibiótico (27,30).

El protocolo usado en dilución en caldo consiste en un medio líquido con cantidades conocidas de bacterias y adición de diferentes concentraciones de antibiótico. Tras la incubación, se comprueba si ha habido crecimiento visible (turbidez). De acuerdo al volumen final (solución de bacteria + solución de antibiótico), la dilución en caldo puede ser categorizada como microdilución (volumen total $\leq 500 \mu\text{L}$) y macrodilución (volumen total $\geq 2 \text{ mL}$). Los resultados finales de los ensayos de CMI pueden ser dados en mg/mL, mg/L o $\mu\text{g/mL}$ dependiendo de la eficiencia del antibacteriano y de la prueba empleada. Para diferenciar si el material es bacteriostático o bactericida se extraen alícuotas de caldo y se esparcen sobre una nueva placa de agar sin material antibacteriano. Si se observan colonias después de la incubación, el material sólo es bacteriostático a esta concentración. De lo contrario, el material es bactericida (27,30).

1.6.2 Zona de inhibición

Las pruebas de zona de inhibición (ZOI, por sus siglas en inglés), también comúnmente conocidas como método de difusión en disco de Kirby-Bauer, consisten en preparar una placa Petri que contenga un medio con agar, y se inocula con un cultivo del organismo control. Se añaden cantidades conocidas del agente antibacteriano a discos de papel de filtro, que se colocan en la superficie del agar. Durante la incubación, el agente difunde desde el papel de filtro al agar, estableciendo un gradiente; la concentración del agente disminuye a medida que aumenta la distancia al papel de filtro. A una determinada distancia del disco se alcanza la CMI. A partir de ese punto hay crecimiento microbiano, pero en las proximidades del disco no se produce dicho crecimiento. Se crea entonces una zona de inhibición con un diámetro proporcional a la cantidad de

agente antimicrobiano añadido al disco, la solubilidad del agente, el coeficiente de difusión y la eficacia del agente. Ambos métodos (CMI y ZOI) están altamente correlacionados, por ende, el diámetro neto de la zona de inhibición puede ser un punto de referencia para la actividad de un antibiótico específico, siempre y cuando se use el mismo tipo de agar durante todos los experimentos (Figura 6). Este método no necesariamente indica que la bacteria muera por la presencia del material antibacteriano. El material podría prevenir el crecimiento de la bacteria (señala actividad bacteriostática) (27,30).

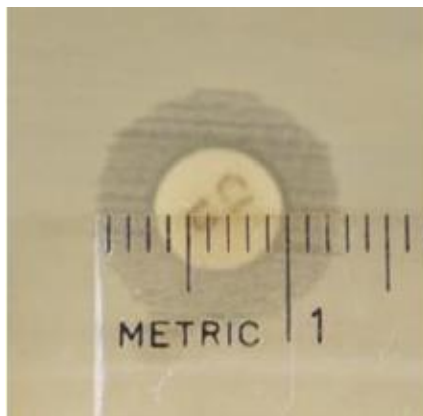


Figura 6 Zona de inhibición. Tomado de (30)

1.7 Aplicaciones de las nanopartículas antibacterianas

La selectividad de la actividad antimicrobiana de las NPs permite escoger un nanomaterial adecuado para tratar un patógeno específico. Se ha demostrado que las NPs pueden manifestar mayor actividad en bacterias Gram-negativas o en Gram-positivas, según su composición química (64).

Nanomateriales a base de NPs metálicas y óxidos metálicos, han sido aplicados en medicina, desde el tratamiento de hipertermia de cáncer a geles antibacterianos de manos. Se ha propuesto su uso para fortalecer superficies médicas susceptibles a infecciones microbianas y formación de bio-películas tales como prótesis dentales e implantes médicos, materiales de envasado de alimentos y apósitos para heridas. También son prometedores para la lucha contra patógenos de interés mundial (64).

La combinación de polímeros con NPs metálicas /óxidos metálicos generarían un material con potencial aplicación en la cavidad oral. Las caries dentales y enfermedades periodontales involucran la adherencia de bacterias y el desarrollo de bio-películas sobre la superficie natural y restaurada del diente. El uso de antimicrobianos ofrece la posibilidad de controlar la formación de estas bio-películas. Por otro lado, la incorporación de NPs en el recubrimiento de implantes dentales

proporcionarían características osteoconductoras y antimicrobianas que prevendrían la falla del implante (30).

La plata es ampliamente usada en el campo biomédico por sus excelentes propiedades antimicrobianas. Se ha propuesto en recubrimientos para equipos médicos y máscaras quirúrgicas; en cemento óseo; recubrimiento para lentes de contacto; gasas para heridas; tratamiento para el control de infección en heridas de quemaduras. Catéteres y suturas con NPs de Ag conocidas con el nombre comercial Bacti-Guard y Vicryl plus, respectivamente. Acticoat es un apósito para heridas que contiene NPs de Ag y Au producido por Smith & Nephew Inc. ACUVUE, hidrogel de Ag para lentes de contacto, diseñado por Johnson & Johnson se encuentra en ensayos clínicos (64).

Protectores solares y lociones para uso dermatológico, basadas en nanomateriales se han comercializado. El primer protector solar con nano-TiO₂ fue puesto en el mercado en 1989, y después en 1991, se propuso otro a base de NPs de ZnO (64).

A pesar de que se ha comprobado que la aplicación de las NPs es una alternativa prometedora para el tratamiento de enfermedades infecciosas, sigue siendo un desafío su uso clínico. Lo cual incluye la determinación de las dosis adecuadas según el uso terapéutico deseado, el diseño de las NPs para aumentar su biocompatibilidad y efectividad, y la evaluación de su toxicidad. La toxicidad de las NPs es una de las preocupaciones más importantes asociadas con su comercialización. La toxicidad potencial para los seres humanos no es muy conocida; sin embargo, muchos estudios *in vitro* han informado de la toxicidad de algunas NPs; NPs de Ag y ZnO han presentado toxicidad a concentraciones superiores a 11.3 µg/mL y 43 µg/mL, respectivamente; NPs de Al₂O₃, Fe₃O₄, MgO, SiO₂, TiO₂ y WO₃ no han mostrado efecto de toxicidad a concentraciones inferiores a 100 µg/mL (64).

2. Síntesis de nanocompuestos

En esta sección se especifica las etapas del proceso de síntesis hidrotermal asistido con microemulsiones (solvotermal) de los nanocompuestos de HA/MgO/Pt y se muestra los resultados referentes al comportamiento de la temperatura y presión de cada uno de los sistemas sintetizados. Es importante aclarar que, con fines comparativos en la actividad antibacteriana, nanocompuestos de HA/MgO/Ag fueron también sintetizados.

2.1 Variables y etapas del proceso solvotermal

La síntesis de nanocompuestos de HA/MgO/Pt fue llevada a cabo mediante el método solvotermal en un reactor PN 16 (Eurotechnica) con control de temperatura. Los reactivos empleados son listados en la Tabla 3. Se propone un sistema cuaternario CTAB/PEG/agua/ciclohexano; la fase oleosa la compone el ciclohexano; el CTAB y PEG son utilizados como surfactante y co-surfactante, respectivamente.

Tabla 3 Reactivos empleados en la síntesis de nanocompuestos por el método solvotermal

Nombre	Fórmula química	Proveedor	Pureza [%]
Nitrato de calcio tetrahidratado	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	J.T. Baker	99
di-Amonio hidrogenofosfato	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	Scharlau	99
Cloruro de magnesio hexahidratado	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	J.T. Baker	99
Tetracloruro de platino	PtCl_4	Merck	99
Nitrato de plata	AgNO_3	Merck	99
Hidróxido de amonio	NH_4OH	EMSURE	25
Cetilmetilamonio Bromuro	$\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{BrN}$	Applichem Panreac	98
Ciclohexano	C_6H_{12}	EMSURE	99.5
Polietilenglicol 600	$\text{HO}(\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{O})_n\text{H}$	Bell Chem Internacional S.A	99

La primera etapa de síntesis consistió en la preparación de tres disoluciones $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.5 M (S_1), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.3 M (S_2), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ con una relación molar $\text{Mg}/(\text{Mg} + \text{Ca})$ de 0.06- PtCl_4 con una relación molar $\text{Pt}/(\text{Pt} + \text{Ca})$ de 0.015 (S_3); bajo agitación magnética constante (600 rpm) se adicionó gota a gota NH_4OH hasta ajustar el pH a 10; cada sistema se dejó a estas condiciones durante 30 minutos.

Posteriormente, se agregó lentamente cada disolución, en su orden S_1 , S_2 y S_3 a una mezcla constituida por 75 mL de ciclohexano, cantidades de CTAB y PEG 600 relativas a la relación surfactante/cosurfactante a evaluar, previamente agitada durante 30 minutos a 600 rpm. La mezcla fue homogenizada mediante agitación magnética durante 1 hora a 900 rpm y el pH fue verificado.

La cinética de reacción para formar los fosfatos de calcio se encuentra controlada por la estructura de la microemulsión agua en aceite (W/O) (véase Figura 5) para el sistema CTAB/PEG/agua/ciclohexano. En este proceso se adiciona primero la solución básica de calcio, para tener estos iones disponibles en la parte interna de la microemulsión donde se encuentra el CTAB. Luego de la adición de la segunda solución básica de fosfato, por interacciones electrostáticas, los grupos fosfato tienen una atracción tanto con el calcio como con la sal de amonio cuaternario presente en el CTAB, lo cual controla el tamaño de los fosfatos de calcio que cristalizan al interior de la microemulsión (W/O) al disminuir la velocidad de reacción. Como otra alternativa de proceso, se podría considerar la adición de la solución básica de fosfato primero, pero este se acomplejaría en el CTAB, y para los grupos fosfato disponibles existiría una reacción directa con los iones de calcio, presentes en la segunda solución básica adicionada. Este otro proceso induciría a la formación de cristales más grandes, lo cual no es deseable para aplicaciones biomédicas.

Las relaciones surfactante/cosurfactante analizadas y la notación empleada para identificar cada material a una condición determinada se especifican en la Tabla 4.

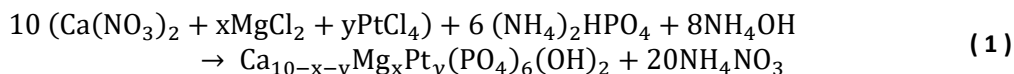
Tabla 4 Notación empleada para los nanocompuestos sintetizados a una relación surfactante/cosurfactante determinada.

Material sintetizado	Relación surfactante/cosurfactante
HAMgPt0.1	0.1
HAMgPt0.33	0.33
HAMgPt1	1
HAMgPt13	3
HAMgPt6	6
HAMgPt10	10

Considerando la dependencia de la presión con la temperatura para las fases cristalinas deseadas en los sistemas solvotermales. En la segunda etapa, se realizó el tratamiento hidrotérmal a 170°C y 15 bar (presión máxima alcanzada bajo la temperatura establecida y volumen del autoclave empleado), por un periodo de 12 horas. La emulsión obtenida fue depositada en un vaso de teflón (autoclave) que luego fue ubicado en el reactor. Transcurrido el tratamiento térmico, el reactor se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. Finalmente, el precipitado obtenido en cada caso se secó a una temperatura de 60 °C y se realizó un tratamiento térmico a 600°C durante 2 horas, con el fin de eliminar los residuos de componentes orgánicos e inducir a la estabilización de la fase.

Las relaciones estequiométricas S/C y temperatura, usadas en la síntesis, fueron seleccionados con base a trabajos reportados en la literatura para obtener HA mediante el método hidrotérmal asistido con microemulsiones (62,63).

La síntesis solvotérmal puede representarse mediante la siguiente reacción:



Una vez obtenidos los polvos se procede con la caracterización morfológica y estructural, para luego evaluar su susceptibilidad antibacteriana; en la Figura 7 se resume las etapas del proceso. Para los nanocompuestos HAAg y HAMgAg se aplicó el mismo procedimiento a una relación surfactante/cosurfactante de 6, esto debido al análisis de los resultados correspondientes a la primera etapa de actividad antibacteriana de los nanocompuestos (detallados en el apartado 4.1.1).

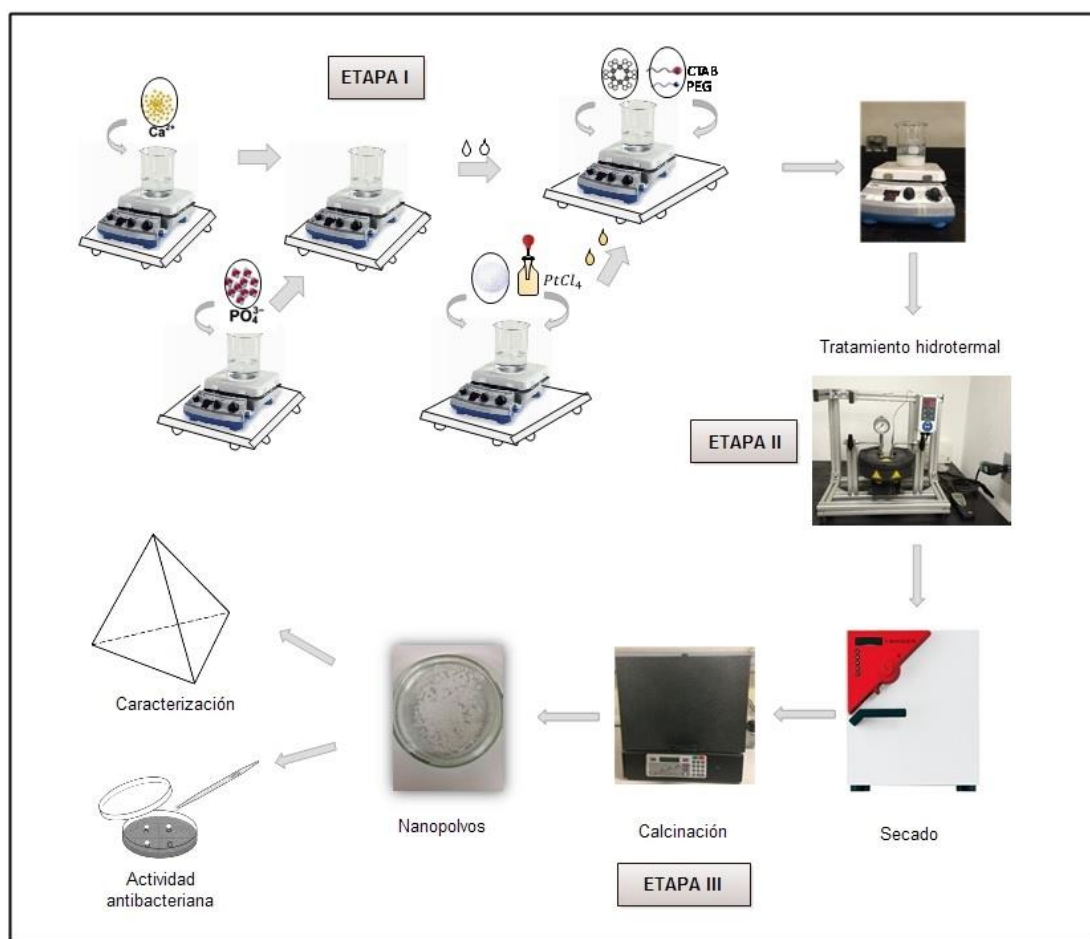


Figura 7 Descripción proceso hidrotérmal asistido por microemulsiones.

2.2 Resultados del comportamiento de temperatura y presión de cada sistema

En la Figura 8 se ilustra el comportamiento de la presión y temperatura en los diferentes procesos, resultados obtenidos del monitoreo de los sistemas durante 2 horas, tiempo en el que se alcanzó la estabilidad (temperatura de 170°C y presión de 15 bar). Se puede observar la misma tendencia en todos los sistemas; sin embargo, hay discrepancias en las magnitudes de temperatura y presión. Lo cual puede deberse a la variación en la concentración de cosurfactante, ya que, en todos los sistemas el autoclave fue llenado a un 75% de su capacidad y sometido a la misma temperatura.

Por ejemplo, a una temperatura de 145°C el sistema que presenta menor presión es el sintetizado a una relación S/C de 0.1, la cual tiene la concentración más alta de PEG. Por tanto, las fuerzas intermoleculares son más fuertes, se disminuye la volatilidad y por ende se obtiene un valor inferior en la presión del sistema; caso contrario, a una relación S/C de 10, sistema con la menor cantidad de PEG.

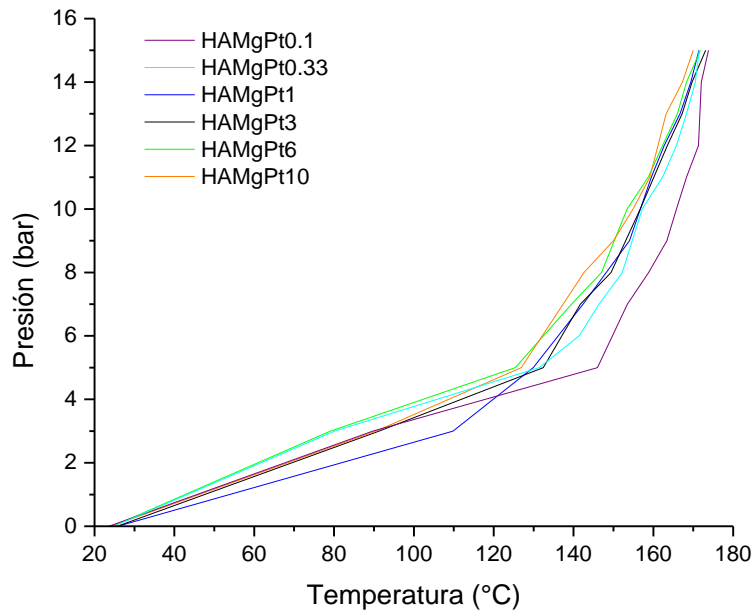


Figura 8 Diagrama comparativo de presión en función de la temperatura de cada sistema sintetizado.

3. Caracterización de nanopartículas

En esta sección se muestra los resultados de difracción de rayos X (DRX), técnica utilizada para identificar la presencia de las fases cristalinas, las propiedades estructurales (parámetros de red, distancias atómicas y tamaño de cristalito). Así como también, el análisis de los grupos químicos funcionales de interés mediante Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés). Posteriormente, se discute los resultados de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM, por sus siglas en inglés), con algunos resultados de Espectroscopía de Energía Dispersiva de rayos X (EDS, por sus siglas en inglés) y Microscopía Electrónica de Barrido de Emisión de Campo (FE-SEM, por sus siglas en inglés). Con el fin de estudiar cómo influye la incorporación de magnesio, platino y plata en la estructura y cristalinidad de la HA y lo más importante, observar el efecto de la relación surfactante/cosurfactante sobre la morfología de los nanocompuestos. Finalmente, se presentan los análisis de potencial zeta con variación en el pH.

3.1 Difracción de Rayos X

La técnica de difracción de rayos X (DRX) se basa en la interacción de la estructura cristalina de un sólido con una fuente de rayos X específica. Al incidir la radiación electromagnética sobre la superficie provista de un gran número de átomos o moléculas espaciados regularmente a intervalos aproximadamente similares a las longitudes de onda de la radiación, el cristal actúa como una rejilla de difracción. La difracción de rayos X por parte de los diferentes planos cristalinos produce una serie de reflejos que difieren en su posición e intensidad y constituyen, en su conjunto, un perfil característico del cristal que lo ha provocado. El análisis de dicho perfil, permite obtener información de la naturaleza del material y su forma cristalina. La formación de los reflejos sigue la ecuación de Bragg (65):

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad (2)$$

Donde:

n: número entero;

λ : longitud de onda de los rayos X empleado;

d: distancia entre los planos reticulares en los que se produce la reflexión;

θ : ángulo de incidencia de la radiación.

3.1.1. Metodología

Con el objetivo de realizar un análisis cristalográfico de los polvos sintetizados, se empleó un difractómetro Rigaku Miniflex con configuración Bragg-Brentano (θ - 2θ), la fuente de radiación fue un tubo de rayos X con ánodo de cobre cuya radiación generada presenta una longitud de onda $K\alpha$ de 1.5405980 Å. La configuración instrumental se presenta en la Tabla 5.

Tabla 5 Condiciones instrumentales empleadas en el análisis DRX

Parámetro	Características
Material del ánodo	Cu ($\lambda = 1.5405980\text{Å}$)
Condiciones para la generación de rayos X	40 mA, 45 Kv
Tipo de ejes de escaneo	Gonio
Posición inicial [$^{\circ}2\theta$]	4.0150
Posición final [$^{\circ}2\theta$]	79.9864
Tiempo de paso	0.0001 s
Tipo de escaneo	Continuo
Máscara	10 mm
Temperatura en el ensayo	25 °C
Radio del goniómetro	240 mm
Distancia focal-rendija de divergencia	140 mm
Filtro $K\beta$ haz incidente	Ni

La identificación de las fases y la determinación de los parámetros estructurales por el método de Rietveld fueron llevadas a cabo utilizando el software X'Pert High Score plus versión 3.0.3. Los espectros experimentales se compararon con los patrones estándar compilados por el Joint Committee on Powder Diffraction Patterns and Standards (JCPDS).

En la identificación cristalográfica se observó la reflexión de cuatro fases: HA como fase principal (JCPDS No. 01-074-0565), fosfato tricálcico (β -TCP, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, JCPDS No. 00-009-0169), óxido de magnesio (MgO, JCPDS No. 01-077-2364) y carbonato de calcio (CaCO_3 , JCPDS 01-072-1651). Todos los difractogramas presentaron picos agudos y estrechos, indicando buen grado de cristalinidad.

El ajuste teórico de los patrones de difracción se inició con la indexación de acuerdo a los JCPDS de las fases presentes y se ingresó información de datos estructurales (posiciones atómicas) proporcionadas por la base de datos Mincrust. Luego se procedió con el refinamiento de los parámetros mediante X'Pert High Score plus, en su orden: background, factores de escala de todas las fases, parámetros de desplazamiento, asimetría y forma del pico.

Los ajustes realizados a las medidas de difracción de rayos X de las muestras sintetizadas permitieron obtener los parámetros de red, estos se compararon con los obtenidos mediante la relación entre las distancias interplanares y los índices de Miller (hkl) para un sistema hexagonal calculados con la siguiente expresión (66):

$$\frac{1}{d^2} = \frac{4}{3} \frac{h^2 + hk + k^2}{a^2} + \frac{l^2}{c^2} \quad (3)$$

El grado de cristalinidad, correspondiente a la fase cristalina de HA presente en el volumen analizado se evaluó mediante la Ecuación (4), donde I_{300} es la intensidad de reflexión (300) y $V_{112/300}$ es la intensidad entre las reflexiones (112) y (300), que desaparecen completamente en muestras no cristalinas (67):

$$X_C = 1 - (V_{112/300}/I_{300}) \quad (4)$$

La estimación del tamaño de cristalito de la HA se realizó con la ecuación Debye-Scherrer (Ecuación (5)), la cual establece que el tamaño de cristalito es inversamente proporcional al ancho medio del pico máximo de difracción y al coseno del ángulo del pico máximo (66).

$$\beta = \frac{k\lambda}{FWHM \cos(\theta)} \quad (5)$$

El valor de β representa el diámetro de cristalito, k factor de forma, $\lambda = 1.5405980 \text{ \AA}$, $FWHM$ ancho medio del pico y θ es el ángulo correspondiente con el máximo del pico.

3.1.2. Efecto de la sustitución de magnesio y platino en la hidroxiapatita a una relación surfactante/cosurfactante de 1

La Figura 9 muestra el difractograma de HA1, el cual es similar al estándar (JCPDS No. 01-074-0565); sin embargo, la presencia de picos adicionales a 2θ : 23.567, 29.805, 35.969 señalan la existencia de CaCO_3 (JCPDS 01-072-1651) y picos en 2θ : 28.830, 30.931 indican que la muestra tiene $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (JCPDS No. 00-009-0169).

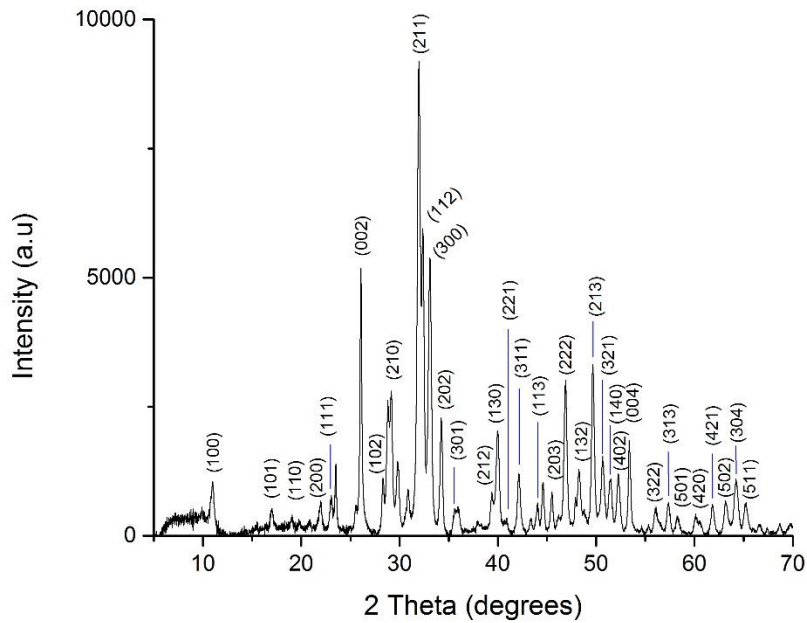
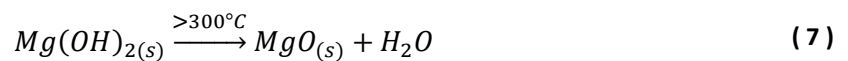
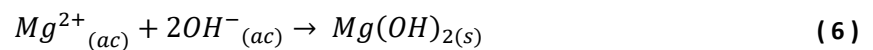


Figura 9 Difractograma de rayos X de HA1.

La Figura 10 presenta la comparación de los difractogramas en las composiciones a) HA1 y b) HAMgPt1. En el difractograma de la muestra HAMgPt1 (Figura 10b), se observan los picos estándar para HA; también se evidencian los picos de CaCO_3 y $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, pero claramente se ve el aumento en la intensidad del pico 2θ : 29.805 y aparecen picos adicionales a 2θ : 47.436, 16.782, 20.597 y 26.460; la presencia de MgO (2θ :43.091) como fase menor confirma la incorporación de iones Mg^{2+} en la estructura de HA, formado en la reacción (12):



Un mecanismo similar se podría proponer para el platino, el cual formará PtO_2 con tamaño y carga apropiados para sustituir al calcio dentro de la estructura de la HA.

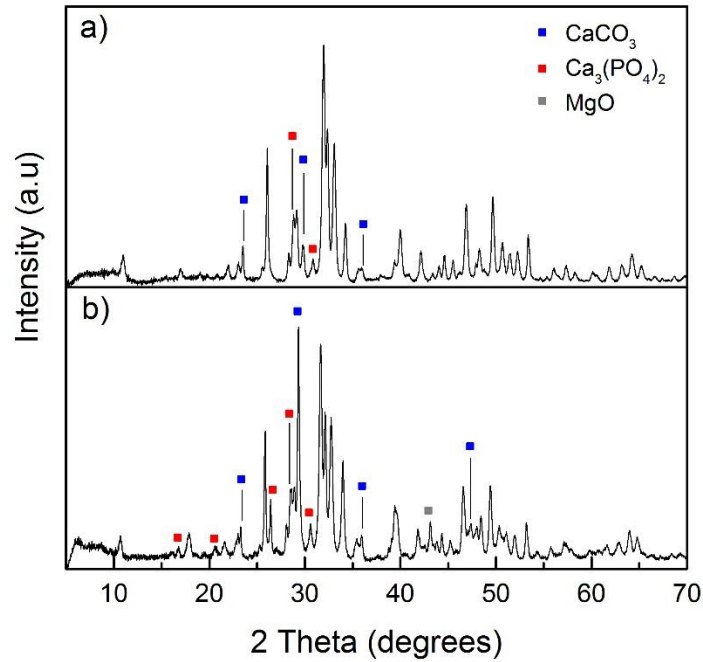


Figura 10 Difractograma de rayos X a) HA1, b) HAMgPt1.

En la Tabla 6 se encuentra consignado los parámetros de celda para HA de acuerdo al patrón estándar JCPDS No. 01-074-0565. De igual manera en las Tablas 7 y 8 se reporta los parámetros de celda para las muestras HA1 y HAMgPt1, respectivamente. Los cuales fueron calculados a partir de la Ecuación (3).

Tabla 6 Parámetros de celda para HA de acuerdo a JCPDS No. 01-074-0565.

2θ	d (Å)	h	k	l	a (Å)	c(Å)
18.817	4.71200	1	1	0	9.42400	
21.762	4.08071	2	0	0	9.42400	
25.883	3.43950	0	0	2		6.8790
28.921	3.08473	2	1	0	9.42401	
32.897	2.72047	3	0	0	9.42398	
39.791	2.26357	1	3	0	9.42399	
44.362	2.04036	4	0	0	9.42402	
48.586	1.87236	2	3	0	9.42401	
53.220	1.71975	0	0	4		6.8790
63.404	1.46583	5	1	0	9.42397	
Promedio					9.42400	6.8790

Tabla 7 Parámetros de celda de los polvos sintetizados HA1.

2 θ	d (Å) JCPDS	d (Å) (difract)	<i>h</i>	<i>k</i>	<i>l</i>	<i>a</i> (Å)	<i>c</i> (Å)	Δd (Å)
18.983	4.71200	4.67119	1	1	0	9.3424		0.04081
21.926	4.08071	4.05052	2	0	0	9.3543		0.03019
26.043	3.43950	3.41874	0	0	2		6.8375	0.02076
29.081	3.08473	3.06812	2	1	0	9.3733		0.01661
33.054	2.72047	2.70786	3	0	0	9.3803		0.01261
39.944	2.26357	2.25524	1	3	0	9.3893		0.00833
44.512	2.04036	2.03381	4	0	0	9.3938		0.00655
48.734	1.87236	1.86703	2	3	0	9.3972		0.00533
53.360	1.71975	1.71556	0	0	4		6.8622	0.00419
63.717	1.46583	1.46302	5	1	0	9.4059		0.00281
Promedio						9.3795	6.8499	

Tabla 8 Parámetros de celda para los polvos sintetizados HAMgPt1

2 θ	d (Å) JCPDS	d (Å) (difract)	<i>h</i>	<i>k</i>	<i>l</i>	<i>a</i> (Å)	<i>c</i> (Å)	Δd (Å)
18.701	4.71200	4.74104	1	1	0	9.4821		0.02904
21.637	4.08071	4.10388	2	0	0	9.4775		0.02317
25.828	3.43950	3.44678	0	0	2		6.8936	0.00728
28.777	3.08473	3.09986	2	1	0	9.4702		0.01513
32.741	2.72047	2.73304	3	0	0	9.4675		0.01257
39.615	2.26357	2.27321	1	3	0	9.4641		0.00964
44.172	2.04036	2.04867	4	0	0	9.4624		0.00831
48.384	1.87236	1.87973	2	3	0	9.4611		0.00737
53.177	1.71975	1.72105	0	0	4		6.8842	0.00130
63.326	1.46583	1.47110	5	1	0	9.4578		0.00527
Promedio						9.4679	6.8889	

Comparando el patrón de HA con los valores de distancia interplanar para cada uno de los planos (*hkl*) en las muestras HA1 y HAMgPt1, los resultados muestran una diferencia en la distancia interplanar (*d*) de angstroms, hay una disminución de este parámetro en HA1 y un aumento en HAMgPt1. Adicionalmente, la muestra de HAMgPt1 presenta un desplazamiento de los picos a valores 2 θ más pequeños comparados con la muestra HA1. Lo cual es consecuencia de la sustitución de los iones de Mg²⁺ y Pt⁴⁺, átomos con radio iónico menor al del calcio (13). De acuerdo a la Tabla 9 para HAMgPt1, la presencia de los iones causa un efecto en los parámetros de celda. Los parámetros *a* y *c* aumentan, resultados acordes a lo reportado en la literatura para HA sustituida con Mg (68), pero no hay reportes de HA con Pt o ambos como se hace en este trabajo.

Tabla 9 Parámetros de celda de las muestras sintetizadas y HA estándar (JCPDS No. 01-074-0565)

Muestras	a (Å)	c(Å)	Volumen de celda (10 ⁶ pm ³)	Grupo espacial	Sistema cristalino
HA JCPDS	9.4240	6.8790	529.09	P 63/m (176)	Hexagonal
HA1	9.3795	6.8499	521.87		
HAMgPt1	9.4679	6.8889	532.08		

La Tabla 10, muestra que el grado de cristalinidad de los polvos dopados con Mg no se ve afectado; sin embargo, el tamaño de cristalito disminuye notablemente con la presencia del Mg y Pt, varios estudios han reportado que el efecto en el tamaño de cristalito se debe a que el Mg actúa como inhibidor del crecimiento (47,68). La relación *a/c* señala que las partículas HAMgPt1 son de naturaleza anisotrópica con un alargamiento preferencial en su eje *c*, lo cual contribuye a una morfología alargada.

Tabla 10 Grado de cristalinidad de los polvos sintetizados y HA estándar (JCPDS No. 01-074-0565)

Muestras	Variable	Intensidad (%)	Cristalinidad		Tamaño de cristalito (nm)	Relación <i>a/c</i>
			<i>X_c</i>	%		
HAJCPDS	<i>V</i> _{112/300}	8.9	0.8539	85.39	-	1.39
	<i>I</i> ₃₀₀	60.9				
HA1	<i>V</i> _{112/300}	5.9	0.9101	91.01	33.70	1.39
	<i>I</i> ₃₀₀	66.11				
HAMgPt1	<i>V</i> _{112/300}	3.4	0.9651	96.51	28.49	1.37
	<i>I</i> ₃₀₀	98.53				

El análisis realizado indica cambios estructurales debidos a la sustitución iónica de la HA; reflejados en los parámetros de celda, tamaño de cristalito, cristalinidad y presencia de fases secundarias (CaCO₃ y Ca₃(PO₄)₂); los cuales podrían afectar la bioactividad, biocompatibilidad, adsorción, propiedades mecánicas y solubilidad del material. La incorporación de iones CO₃²⁻ lleva a la formación de enlaces más débiles (Ca-CO₃) que los enlaces Ca-PO₄ y la presencia de una fase más soluble - Ca₃(PO₄)₂- que la HA, aumentarían la solubilidad del material (69).

3.1.1 Efecto de la sustitución de magnesio, platino y plata en la hidroxiapatita a una relación surfactante/cosurfactante de 6

En este ítem se hace un análisis de los cambios en la estructura apatítica ocasionados por la incorporación de iones Mg^{2+} , Pt^{4+} y Ag^+ . En la Tabla 11, se resume el tamaño y carga de dichos iones.

Tabla 11 Radio atómico e iónico de Ca, Mg, Pt y Ag (70).

Elemento	Calcio (Ca)		Magnesio (Mg)		Platino (Pt)		Plata (Ag)	
Radio atómico (nm)	0.197		0.160		0.077		0.129	
Radio iónico (nm)	Ca^{2+}	0.106	Mg^{2+}	0.078	Pt^{4+}	0.063	Ag^+	0.115

A diferencia de la HA obtenida con una relación estequiométrica S/C igual a 1 (HA1), el difractograma para HA sintetizada a una relación igual a 6 (HA6) (Figura 11a) muestra sólo los picos correspondientes a la fase de HA, lo cual señala que bajo esta condición se obtuvo HA sin asocio de otras fases detectables. La sustitución de Mg y co-sustitución de CO_3^{2-} es claramente observada en las muestras de HAMg6 (Figura 11b) y HAMgPt6 (Figura 11c). La intensidad del pico 2θ : 43.146, referente a la fase MgO, aumenta en los polvos HAMgPt6 al igual que los picos de $CaCO_3$ 2θ : 29.503, 35.924. En la Figura 11d que corresponde a HAMgAg (Ag/Ag + Ca de 0.015), no se evidencia picos asociados a la presencia de Ag en la muestra, pero el pico a 2θ : 31.166 indica contenido de $Ca_3(PO_4)_2$.

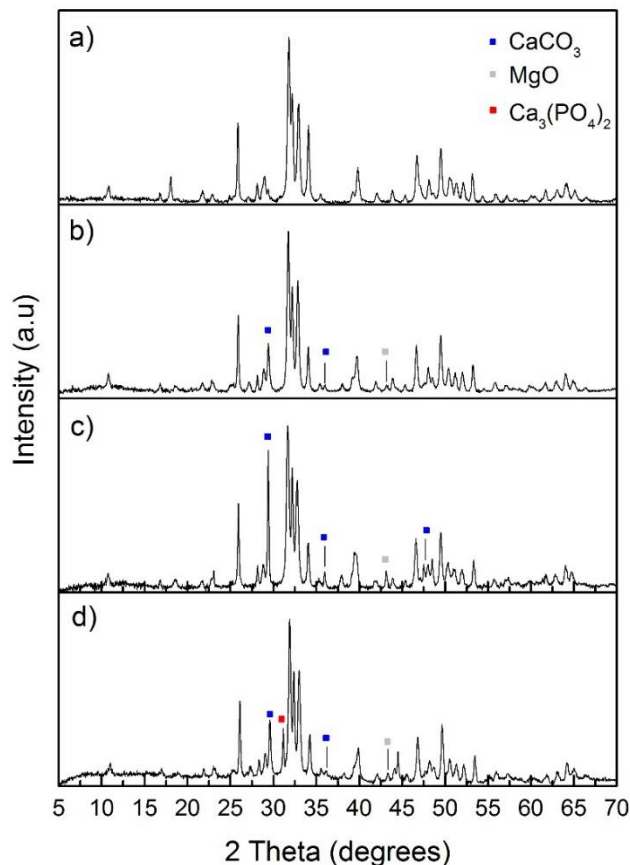


Figura 11 Difractograma de rayos X a) HA6, b) HAMg6, c) HAMgPt6, d) HAMgAg6.

El cálculo de los parámetros *a* y *c* se detalla en las Tablas 12, 13, 14 y 15 según los picos de difracción escogidos. La diferencia de la distancia interplanar entre la HA sintetizada y la HA estándar, es de angstrom; el valor de este parámetro aumenta en cada muestra sintetizada así, $d_{HA6} < d_{HAMg6} < d_{HAMgPt6}$. También es claro el desplazamiento de los picos hacia valores 2θ inferiores, efecto que es más notorio en la presencia de Mg y Pt, lo cual indicaría que en la muestra HAMgPt6 puede haber incorporación no sólo de iones Mg^{2+} sino también de Pt^{4+} .

Tabla 12 Parámetros de celda de los polvos sintetizados HA6.

2θ	d (Å) (JCPDS)	d (Å) (difract)	<i>h</i>	<i>k</i>	<i>l</i>	<i>a</i> (Å)	<i>c</i> (Å)	Δd (Å)
18.826	4.71200	4.70977	1	1	0	9.4195		0.00223
21.771	4.08071	4.07904	2	0	0	9.4201		0.00167
25.864	3.43950	3.44205	0	0	2		6.8841	0.00255
29.004	3.08473	3.08379	2	1	0	9.4211		0.00094
32.906	2.72047	2.71975	3	0	0	9.4215		0.00072
39.796	2.26357	2.26308	1	3	0	9.4220		0.00049
44.371	2.04036	2.03996	4	0	0	9.4222		0.00040
48.595	1.87236	1.87203	2	3	0	9.4223		0.00033
53.167	1.71975	1.72134	0	0	4		6.8854	0.00159
63.413	1.46583	1.46565	5	1	0	9.4228		0.00018
Promedio						9.4214	6.8847	

Tabla 13 Parámetros de celda de los polvos sintetizados HAMg6.

2θ	d (Å) (JCPDS)	d (Å) (difract)	<i>h</i>	<i>k</i>	<i>l</i>	<i>a</i> (Å)	<i>c</i> (Å)	Δd (Å)
18.822	4.71200	4.72260	1	1	0	9.4452		0.01060
21.713	4.08071	4.08969	2	0	0	9.4447		0.00898
25.885	3.43950	3.43920	0	0	2		6.8784	0.00030
28.859	3.08473	3.09127	2	1	0	9.4440		0.00654
32.826	2.72047	2.72617	3	0	0	9.4437		0.00570
39.808	2.26357	2.26822	1	3	0	9.4434		0.00465
44.383	2.04036	2.04451	4	0	0	9.4432		0.00415
48.482	1.87236	1.87615	2	3	0	9.4431		0.00379
53.233	1.71975	1.71936	0	0	4		6.8774	0.00039
63.264	1.46583	1.46875	5	1	0	9.4427		0.00292
Promedio						9.4438	6.8779	

Tabla 14 Parámetros de celda de los polvos sintetizados HAMgPt6.

2θ	d (Å) (JCPDS)	d (Å) (difract)	<i>h</i>	<i>k</i>	<i>l</i>	<i>a</i> (Å)	<i>c</i> (Å)	Δd (Å)
18.778	4.71200	4.73363	1	1	0	9.4673		0.02163
21.663	4.08071	4.09905	2	0	0	9.4664		0.01834
25.917	3.43950	3.43506	0	0	2		6.8701	0.00444
28.794	3.08473	3.09810	2	1	0	9.4649		0.01337
32.752	2.72047	2.73211	3	0	0	9.4643		0.01164

39.617	2.26357	2.27309	1	3	0	9.4636	0.00952
44.168	2.04036	2.04886	4	0	0	9.4633	0.00850
48.373	1.87236	1.88011	2	3	0	9.4630	0.00775
53.310	1.71975	1.71705	0	0	4	6.8682	0.00270
63.118	1.46583	1.47180	5	1	0	9.4624	0.00597
Promedio						9.4644	6.8692

Comparado con las muestras dopadas con Mg o ambos Mg y Pt, los polvos de HAMgAg6 tienen valores 2θ mayores y distancias interplanares inferiores, se observan cambios más significativos en los parámetros de celda (Tabla 15). Estos resultados y la presencia de la fase de fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), indican la incorporación del ion plata Ag^+ en la HA que al ser un ion con tamaño mayor al ion de calcio ocasiona dichos cambios.

Tabla 15 Parámetros de celda de los polvos sintetizados HAMgAg6.

2θ	d (Å) (JCPDS)	d (Å) (difract)	h	k	l	a (Å)	c (Å)	Δd (Å)
18.961	4.71200	4.67655	1	1	0	9.3531		0.03545
21.896	4.08071	4.05609	2	0	0	9.3671		0.02462
26.102	3.43950	3.41119	0	0	2		6.8224	0.02831
29.105	3.08473	3.07327	2	1	0	9.3890		0.01146
32.993	2.72047	2.71273	3	0	0	9.3972		0.00774
39.863	2.26357	2.25964	1	3	0	9.4076		0.00393
44.417	2.04036	2.03794	4	0	0	9.4128		0.00242
48.626	1.87236	1.87093	2	3	0	9.4168		0.00143
53.455	1.71975	1.71274	0	0	4		6.8510	0.00701
63.383	1.46583	1.46628	5	1	0	9.4269		0.00045
Promedio						9.3963	6.8367	

La sustitución de Mg en la HA genera cambios en los parámetros de celda del sistema hexagonal, el parámetro a y el volumen de celda aumentan, c disminuye (Tabla 16). La diferencia de estos parámetros entre HAMg6 y HAMgPt6 podría deberse a la incorporación de Pt^{4+} en la estructura de la HA. Indicando la formación de HA multi-sustituida; sin embargo, los picos 2θ : 39.693, 46.343 correspondientes al patrón estándar del Pt JCPDS No. 00-001-1311 coinciden con picos de HA y el pico a 2θ : 67.310 no aparece.

Tabla 16 Parámetros de celda de las muestras sintetizadas y HA estándar (JCPDS No. 01-074-0565)

Muestras	a (Å)	c (Å)	Volumen de celda (10^6 pm^3)	Grupo espacial	Sistema cristalino
HAJCPDS	9.4240	6.8790	529.09		
HA6	9.4214	6.8847	529.69		
HAMg6	9.4438	6.8779	530.62	P 63/m (176)	Hexagonal
HAMgPt6	9.4644	6.8692	532.25		
HAMgAg6	9.3963	6.8367	522.73		

La sustitución del ion Ca^{2+} por otros iones puede ocasionar la contracción o expansión de los parámetros de red, dependiendo del tamaño de los iones. Por tanto, se podría suponer que cationes grandes modifiquen el volumen de celda y aumenten el parámetro a . Contrario a esto, la presencia del ion Ag^+ causó una disminución del parámetro a (véase Tabla 16). La sustitución de un catión divalente por uno monovalente originaría un desequilibrio de carga en la estructura apatítica que podría ser neutralizado con la formación de vacancias y en consecuencia la reducción de este parámetro (69).

Los resultados de la Tabla 17 exhiben que el grado de cristalinidad de las muestras sintetizadas no se ve afectado por la presencia de Mg y Pt. El tamaño de cristalito disminuyó, el comportamiento es similar al observado en la relación S/C de 1, la sustitución y co-sustitución de la HA por ambos iones ocasiona dichos cambios. Por el contrario, al dopar la HA con Ag el grado de cristalinidad disminuye y el tamaño de cristalito aumenta.

Tabla 17 Grado de cristalinidad de los polvos sintetizados y HA estándar (JCPDS No. 01-074-0565)

Muestras	Variable	Intensidad (%)	Cristalinidad		Tamaño de cristalito (nm)	Relación a/c
			Xc	%		
HAJCPDS	$V_{112/300}$	8.9	0.8539	85.39	-	1.39
	I_{300}	60.9				
HA6	$V_{112/300}$	4.3	0.9041	90.41	37.63	1.37
	I_{300}	44.73				
HAMg6	$V_{112/300}$	1.9	0.9612	96.12	36.17	1.37
	I_{300}	48.25				
HAMgPt6	$V_{112/300}$	3.6	0.9191	91.91	33.39	1.38
	I_{300}	44.99				
HAMgAg6	$V_{112/300}$	6.7	0.8213	82.13	42.78	1.37
	I_{300}	37.6				

La relación a/c para HA dopada con Mg o ambos, Mg y Pt, indica una reducción en el espesor del cristal, lo que induciría a unas estructuras más aplanadas y alargadas. En el caso de HA con incorporación de iones Mg^{2+} y Ag^+ , al haber una disminución en a y c , se esperaría estructuras más redondeadas.

El efecto de la sustitución de Mg y/o Pt sobre los parámetros de red en la HA es notable. En términos de problemas biológicos, un cambio en c sería más efectivo porque la HA crece principalmente en la dirección c (71). En la relación S/C de 1 se observó un aumento en los parámetros a y c , contrario a los resultados obtenidos en la relación S/C de 6, donde el parámetro c disminuyó. Se ha reportado cambios irregulares en el parámetro a y disminución, aumento o ningún cambio en c . Las discrepancias presentadas en varios estudios son atribuidas al método de síntesis y a la concentración de los iones, puesto que influyen en qué posición se dará la sustitución, es decir, en Ca (I) o en Ca (II). Por ejemplo, para HA sustituida con 5% de Mg, se ha encontrado que la reducción

en el volumen de celda es más significativa cuando el Mg sustituye al Ca (I) y el parámetro c no disminuye cuando la sustitución del Mg es en el Ca (II) (13,72–74).

En esta investigación no se realizó un análisis cuantitativo de la proporción de las diferentes fases presentes en el material, se requiere hacer un estudio estructural profundo y emplear otras técnicas de caracterización. No obstante, un fosfato de calcio bifásico (constituido de HA y $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) dopado con iones como Mg son de interés porque podrían presentar mejores propiedades mecánicas y biológicas que HA pura. Se ha demostrado que HA dopada con MgO tiene mejor resistencia a la compresión, mayor dureza y estabilidad térmica, menor velocidad de reabsorción y degradación que HA pura (75); la presencia de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ como fase secundaria induce a una microestructura más porosa (74); características que los hacen más apropiados para biomateriales y sus aplicaciones (76).

3.1.2 Efecto de la relación surfactante/cosurfactante en la composición hidroxiapatita dopada con magnesio y platino

El difractograma de los polvos HAMgPt10 (Figura 12b) muestra los picos correspondientes a HA de acuerdo al patrón estándar; presenta un pico en 2θ : 43.146 (MgO) al igual que la muestra HAMgPt3 (Fig. 12a) pero de menor intensidad. Los picos de reflexión de esta fase, no se observan en las muestras con relación S/C de 0.33 y 0.1, la intensidad de los picos de CaCO_3 disminuye. En estas muestras las distancias interplanares son inferiores a las obtenidas en HAMgPt1, HAMgPt6 y HAMgPt10 (Tablas 18 y 19); en HAMgPt0.33 no hay una diferencia significativa en las posiciones 2θ de la HA (Tabla 21), los parámetros a , c y el volumen de celda son muy similares a los del patrón estándar de HA (Tabla 22); caso contrario en HAMgPt0.1, se observa una diferencia mayor con el patrón estándar (Tabla 20) y el pico de reflexión 2θ : 29.503 de CaCO_3 tiene mayor intensidad comparado con el de HAMgPt0.33. Estos resultados señalarían que a relaciones con mayor cantidad de cosurfactante no se lograría incorporar con éxito los iones Mg y/o Pt en la estructura apatítica y que las diferencias en las distancias interplanares se deben a la presencia de CaCO_3 ; empero un comportamiento similar fue reportado por Lijuan et al. no observaron un cambio aparente en los difractogramas de HA y HAMg; sin embargo, un leve ensanchamiento de los picos en HAMg y los resultados EDS les permitió corroborar la incorporación de iones Mg en la estructura apatítica (77).

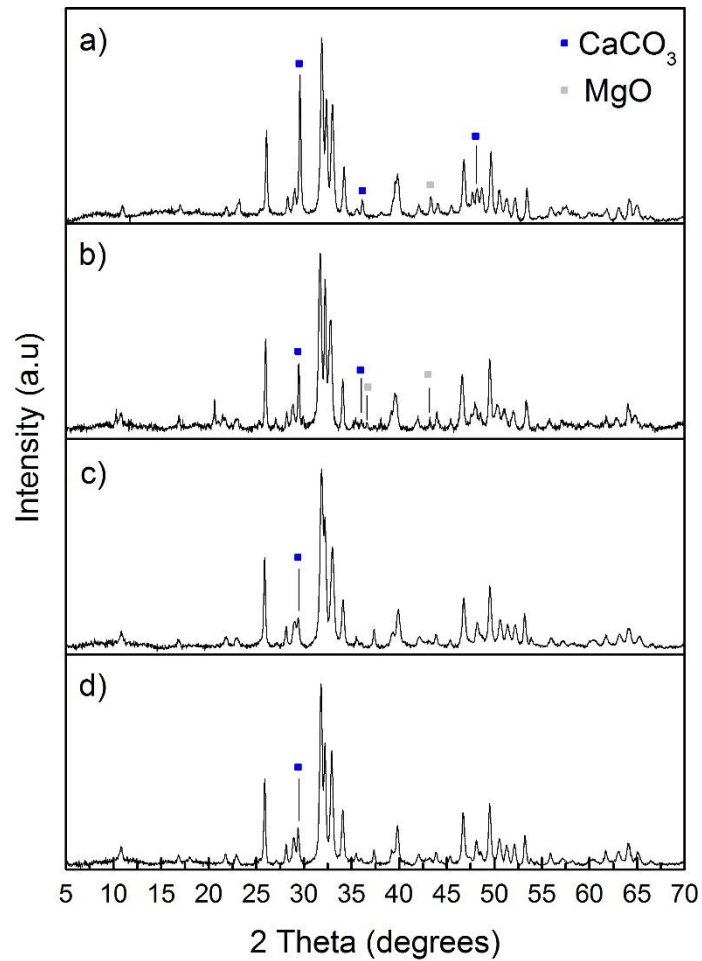


Figura 12 Difractograma de rayos X a) HAMgPt3, b) HAMgPt10, c) HAMgPt0.1, d) HAMgPt0.33

Tabla 18 Parámetros de celda de los polvos sintetizados HAMgPt3

2θ	d (Å) (JCPDS)	d (Å) (diffract)	h	k	l	a (Å)	c(Å)	Δd (Å)
18.948	4.71200	4.67978	1	1	0	9.3596		0.03222
21.884	4.08071	4.05822	2	0	0	9.3721		0.02249
26.073	3.43950	3.41493	0	0	2		6.8299	0.02457
29.022	3.08473	3.07426	2	1	0	9.3920		0.01047
32.985	2.72047	2.71338	3	0	0	9.3994		0.00709
39.857	2.26357	2.25994	1	3	0	9.4089		0.00363
44.413	2.04036	2.03810	4	0	0	9.4136		0.00226
48.752	1.87236	1.87102	2	3	0	9.4173		0.00134
53.415	1.71975	1.71394	0	0	4		6.8558	0.00581
63.387	1.46583	1.46618	5	1	0	9.4262		0.00035
Promedio						9.3986	6.8428	

Tabla 19 Parámetros de celda de los polvos sintetizados HAMgPt10

2 θ	d (Å) (JCPDS)	d (Å) (difract)	h	k	l	a (Å)	c(Å)	Δd (Å)
18.799	4.71200	4.72826	1	1	0	9.4565		0.01626
21.736	4.08071	4.09556	2	0	0	9.4583		0.01485
25.962	3.43950	3.42926	0	0	2		6.8585	0.01024
28.878	3.08473	3.09687	2	1	0	9.4611		0.01214
32.760	2.72047	2.73148	3	0	0	9.4621		0.01101
39.720	2.26357	2.27305	1	3	0	9.4635		0.00948
44.279	2.04036	2.04904	4	0	0	9.4641		0.00868
48.364	1.87236	1.88043	2	3	0	9.4646		0.00807
53.361	1.71975	1.71554	0	0	4		6.8622	0.00421
63.091	1.46583	1.47235	5	1	0	9.4659		0.00652
Promedio						9.4620	6.8603	

Tabla 20 Parámetros de celda de los polvos sintetizados HAMgPt0.1

2 θ	d (Å) (JCPDS)	d (Å) (difract)	h	k	l	a (Å)	c(Å)	Δd (Å)
18.891	4.71200	4.69373	1	1	0	9.3875		0.01827
21.890	4.08071	4.06710	2	0	0	9.3926		0.01361
25.898	3.43950	3.43760	0	0	2		6.8752	0.00190
28.995	3.08473	3.07703	2	1	0	9.4005		0.00770
32.970	2.72047	2.71454	3	0	0	9.4034		0.00593
39.865	2.26357	2.25954	1	3	0	9.4072		0.00403
44.436	2.04036	2.03713	4	0	0	9.4091		0.00323
48.660	1.87236	1.86969	2	3	0	9.4106		0.00267
53.165	1.71975	1.72140	0	0	4		6.8856	0.00165
63.654	1.46583	1.46431	5	1	0	9.4142		0.00152
Promedio						9.4031	6.8804	

Tabla 21 Parámetros de celda de los polvos sintetizados HAMgPt0.33

2 θ	d (Å) (JCPDS)	d (Å) (difract)	h	k	l	a (Å)	c(Å)	Δd (Å)
18.815	4.71200	4.71253	1	1	0	9.4251		0.00053
21.759	4.08071	4.08111	2	0	0	9.4249		0.00040
25.874	3.43950	3.44065	0	0	2		6.8813	0.00115
28.919	3.08473	3.08495	2	1	0	9.4247		0.00022
32.894	2.72047	2.72065	3	0	0	9.4246		0.00018
39.789	2.26357	2.26369	1	3	0	9.4245		0.00012
44.360	2.04036	2.04045	4	0	0	9.4244		0.00009
48.713	1.87236	1.87244	2	3	0	9.4244		0.00008
53.203	1.71975	1.72025	0	0	4		6.8810	0.00050
63.578	1.46583	1.46588	5	1	0	9.4243		0.00005
Promedio						9.4246	6.8812	

Tabla 22 Parámetros de celda de las muestras sintetizadas y HA estándar (JCPDS No. 01-074-0565)

Muestras	a (Å)	c(Å)	Volumen de celda (10 ⁶ pm ³)	Grupo espacial	Sistema cristalino
HAJCPDS	9.4240	6.8790	529.09		
HAMgPt3	9.3986	6.8428	523.45	P 63/m (176)	Hexagonal
HAMgPt10	9.4620	6.8603	531.90		
HAMgPt0.1	9.4031	6.8804	528.83		
HAMgPt0.33	9.4246	6.8812	529.35		

Los resultados consignados en la Tabla 23, indican que la variación en la relación S/C influye en el grado de cristalinidad de las muestras sintetizadas, así como también en el tamaño de cristalito. Al comparar estos resultados con los reportados en las Tablas 10 y 16, el grado de cristalinidad disminuye en el siguiente orden, de acuerdo a la relación S/C, 1>3>0.1>0.33>6>10. Este comportamiento señala que el parámetro de síntesis (S/C) podría favorecer la incorporación de los iones en la HA, así a mayor sustitución el grado de cristalinidad disminuye, como lo está reportado en la literatura (21,22,78).

Tabla 23 Grado de cristalinidad de los polvos sintetizados y HA estándar (JCPDS No. 01-074-0565)

Muestras	Variable	Intensidad (%)	Cristalinidad		Tamaño de cristalito (nm)	Relación a/c
			Xc	%		
HAJCPDS	$V_{112/300}$	8.9	0.8539	85.39	-	1.39
	I_{300}	60.90				
HAMgPt3	$V_{112/300}$	1.9	0.9510	95.10	33.83	1.37
	I_{300}	39.15				
HAMgPt10	$V_{112/300}$	9.9	0.7956	79.56	30.93	1.38
	I_{300}	48.72				
HAMgPt0.1	$V_{112/300}$	2.1	0.9476	94.76	31.91	1.37
	I_{300}	40.88				
HAMgPt0.33	$V_{112/300}$	2.6	0.9465	94.65	37.14	1.37
	I_{300}	48.03				

3.1.3. Conclusiones parciales del análisis de difracción de rayos X

La incorporación de iones Mg^{2+} , Pt^{4+} y Ag^+ generan cambios en los parámetros de celda y tamaño de cristalito de la HA, evidenciándose un efecto mayor con la presencia del ion Ag^+ , lo cual puede deberse a la diferencia en magnitud de su radio iónico, generando inestabilidad en la HA y favoreciendo la formación de la fase de $Ca_3(PO_4)_2$. Este comportamiento depende de la relación S/C, a una proporción 1:1 permite la incorporación de iones Mg^{2+} y Pt^{4+} , observándose un incremento en la intensidad del pico correspondiente a la fase de MgO y presencia de $Ca_3(PO_4)_2$.

Proporciones iguales de surfactante y cosurfactante, y mayor cantidad de surfactante causan aumento en los parámetros a , c y volumen de celda. Por el contrario, a concentraciones de 3 y 6 se observan cambios variables en a y disminución en c , de lo cual se esperaría estructuras con menor espesor a una relación S/C de 3.

Sistemas sintetizados a concentraciones altas de cosurfactante inducen a la formación de HA con características similares a la HA estándar con aumento preferencial en el eje c y libre de fases secundarias.

3.2 Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier

La espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) se basa en el hecho de que al interactuar radiación infrarroja con la muestra, genera en ésta cambios en el estado vibracional de las moléculas. Estos modos de vibración son movimientos particulares del conjunto de átomos que conforman la molécula, independientes unos de otros y con su frecuencia de vibración específica, dando lugar a un espectro característico. Donde la posición y forma de las bandas obtenidas determinará los grupos funcionales existentes en la muestra (79).

El comportamiento de los sólidos en el infrarrojo puede observarse mediante técnicas de reflectancia. Siendo la espectrometría de reflectancia difusa (diffuse reflection infrared Fourier transformation spectroscopy, DRIFT) una herramienta óptima para generar espectros en el infrarrojo directamente sobre muestras rugosas, porosas o pulverizadas con un mínimo de preparación de la misma (79).

3.2.1 Metodología

Con el propósito de identificar los modos de vibración de las moléculas presentes en los polvos sintetizados, se realizaron medidas en un equipo de Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier Infrarroja de Reflectancia Difusa (DRIFT, equipo Shimadzu IRTracer-100), con un número de barridos de 16, una resolución 4 cm^{-1} y un rango de números de onda de $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$.

Inicialmente, se pulverizó 1 mg de cada uno de los polvos a analizar y se trituraron en un mortero de ágata con 0.1 g de bromuro de potasio (KBr) para espectrofotometría infrarroja, previamente secado en una estufa, puesto que es un reactivo altamente higroscópico. Luego, las mezclas fueron ubicadas en un portamuestras y se procedió con el análisis.

3.2.2 Efecto de la adición de magnesio y platino en la estructura de hidroxiapatita para una relación surfactante/cosurfactante de 6

La Figura 13 muestra un espectro característico de HA carbonatada. Las bandas de vibración a 482 cm^{-1} en el espectro representan la vibración de tensión asimétrica (ν_2). Los dobletes a 571 y 604 cm^{-1} son atribuidos a los modos de vibración de torsión $O - P - O$ (ν_4). La banda a 968 cm^{-1} es el resultado de vibración de tensión simétrica (ν_1) de los enlaces $P - O$, mientras las bandas entre 1045 cm^{-1} , 1101 cm^{-1} representan la vibración de estiramiento asimétrico $P - O$ (ν_3) (47). Entre 1520 y 1410 cm^{-1} aparece una banda relativamente ancha debido al modo de vibración de estiramiento de los grupos carbonato (ν_3) se deben a sustituciones tipo B de los iones PO_4^{3-} por CO_3^{2-} . La banda aguda a 880 cm^{-1} corresponde al modo de vibración de enlace (ν_2) de $C - O$ de los grupos carbonato, es característico de carbonatación tipo A en la HA, las bandas a $3574\text{--}3696\text{ cm}^{-1}$ confirman sustitución tipo A de OH^- por CO_3^{2-} (80). Una banda ancha alrededor de 3400 cm^{-1} y otras

bandas entre $1640\text{-}1995\text{ cm}^{-1}$ son debidas a la presencia de agua adsorbida en la HA. La banda a 2500 cm^{-1} corresponde a absorción de CO_2 (48).

En particular, en el espectro de la fase apatítica las áreas correspondientes a las bandas de absorción OH^- a 3572 y 630 cm^{-1} disminuyen por la presencia de magnesio y platino. También el ion Mg^{2+} provoca un ensanchamiento de las bandas características de los grupos fosfatos. Por el contrario, la muestra que contiene Mg y Pt exhibe bandas más estrechas y de menor intensidad.

Considerando una línea base para los tres interferogramas, la intensidad de las vibraciones de los grupos fosfato se presenta en orden decreciente $\text{HAMgPt6} > \text{HAMg6} > \text{HA6}$. Se aprecia un aumento en la intensidad de las bandas de CO_3^{2-} en la HAMg6 y HAMgPt6, indicando mayor cantidad de carbonato en estas muestras, comportamiento comúnmente observado en la incorporación de iones Mg^{2+} en la HA (81).

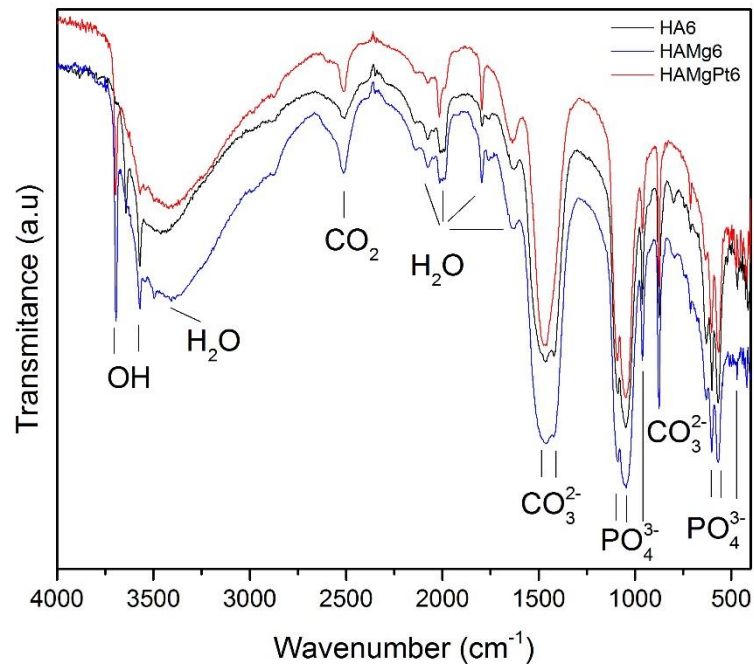


Figura 13 Espectros FTIR muestras sintetizadas a una relación S/C de 6 a) HA6, b) HAMg6, c) HAMgPt6

La Figura 14 muestra la comparación de los interferogramas de HAMgPt6, HAMgAg6 y HA6. La presencia de los iones Ag^+ en la estructura de la HA se ve reflejada en la ausencia de los picos a 3572 y 630 cm^{-1} correspondientes a vibraciones de los grupos OH^- , el ensanchamiento de las bandas de los grupos carbonato y fosfato. De lo cual se podría inferir un reducido ordenamiento de los grupos fosfato y en consecuencia una HA con fases secundarias o menor grado de cristalinidad, resultado acorde con los análisis de DRX. Puesto que en el difractograma de la muestra HAMgAg6 se identificó

la fase de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ y una cristalinidad de 82.13%, que comparada con la obtenida para HAMgPt6 (91.91%), es inferior.

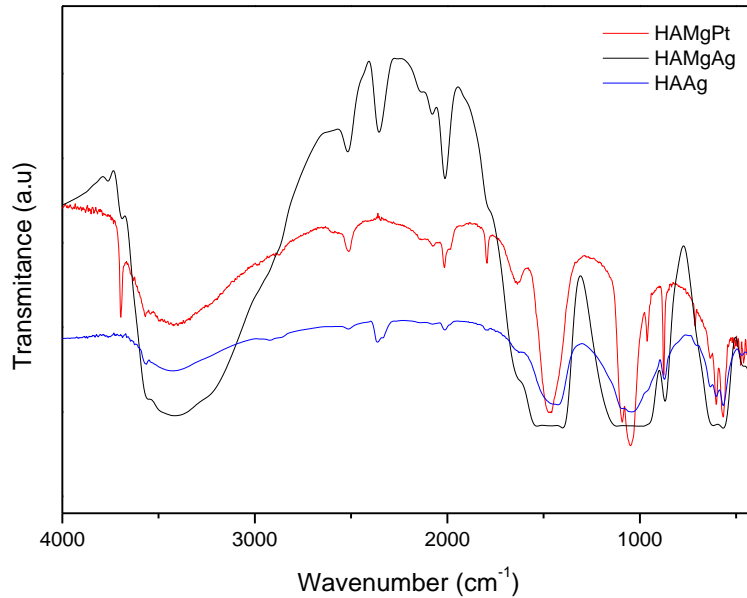


Figura 14 Espectros FTIR muestras sintetizadas a una relación S/C de 6 a) HAMgPt6, b) HAMgAg6, c) HAAg

3.2.3 Efecto de la relación surfactante/cosurfactante en la hidroxiapatita sustituida con magnesio y platino

Los espectros de infrarrojo, al igual que en las composiciones presentadas en 3.2.2, exhiben bandas típicas de HA carbonatada. En la Tabla 24 se resume cada modo de vibración y la frecuencia asignada de acuerdo a (47,80).

Tabla 24 Picos de absorción observados en el espectro FTIR de las muestras sintetizadas

Modo de vibración	Frecuencia cm^{-1}
$\text{PO}_4^{3-} (\nu_1)$	968
$\text{PO}_4^{3-} (\nu_2)$	482
$\text{PO}_4^{3-} (\nu_3)$	1045-1101
$\text{PO}_4^{3-} (\nu_4)$	571-604
$\text{CO}_3^{2-} (\nu_2)$	880
$\text{CO}_3^{2-} (\nu_3)$	1520-1410
OH^-	3572-630
CO_2	2500
H_2O	3400-1640-1995

Para la composición de HA dopada con magnesio y platino, en la Figura 15 se presenta los interferogramas con relación S/C de 1, 3, 6 y 10. Donde se puede observar diferencias notables en la forma e intensidad de los picos al variar la relación S/C. El análisis de los espectros fue realizado a una línea base.

El pico a 3572 cm^{-1} correspondiente a grupos OH^- estructurales de la HA, no se observa en las composiciones con relación S/C de 1 y 10. La banda de los grupos carbonato es intensa en las composiciones 3 y 6, lo cual evidencia una HA carbonatada tipo A. De acuerdo a las bandas de los grupos fosfato, en las relaciones S/C de 1, 3 y 6 esta banda es muy definida, por el contrario, ésta se presenta en una forma incipiente para la composición 10. La trilliza de HA ($571, 604$ y 630 cm^{-1}) se presenta en forma evidente para las composiciones 6 y 3, y no está definida para las composiciones 1 y 10. Esto indicaría para estas últimas o una baja cristalinidad o la formación de otras fases de fosfatos diferentes a la HA. Al comparar los DRX, en la muestra S/C de 1 hay formación de fosfato tricálcico, como fase secundaria, y la de relación S/C de 10 presenta el grado de cristalinidad más bajo (79.56%). Por el contrario, en las muestras con relación S/C de 3 y 6, indican mayor orientación estructural a una HA carbonatada.

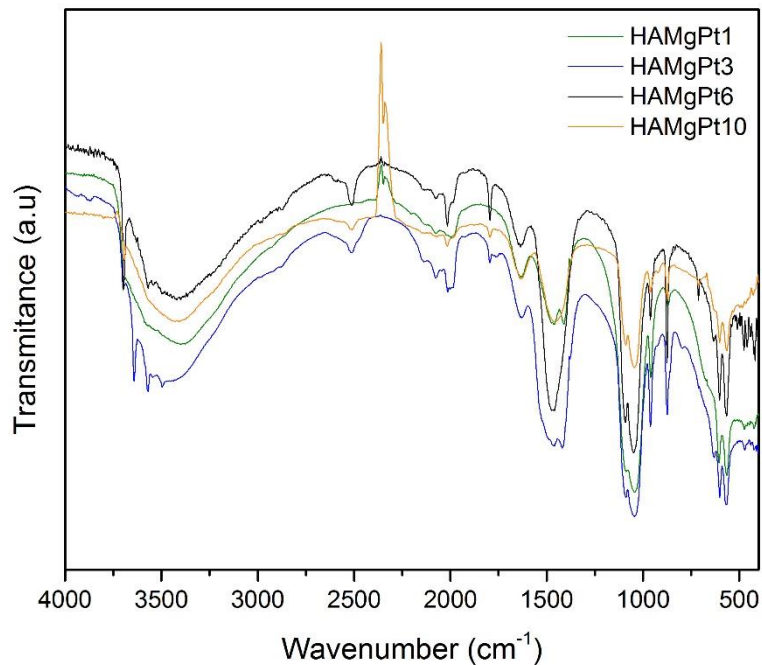


Figura 15 Comparación espectros FTIR de las muestras sintetizadas a diferentes relaciones S/C

3.2.4 Efecto del cosurfactante en la composición de hidroxiapatita dopada con magnesio y platino

En el espectro de la Figura 16 se aprecia las bandas de OH⁻ en 3572 cm⁻¹ y 630 cm⁻¹, se observa vibraciones más pronunciadas a una relación S/C de 0.33. Aunque ambas composiciones tienen un comportamiento similar en la banda 1520-1410 cm⁻¹, es notable la formación de HA carbonatada tipo A con mayor proporción a una relación S/C de 0.33. Las bandas a 1091, 1050, 602 y 561 cm⁻¹ evidencian el ordenamiento estructural de los grupos fosfato y en asociación con la presencia de OH⁻ estructural confirma la formación de HA. Resultados acordes con los de DRX, un cambio en el cosurfactante no es influyente en la estructura de la fase apatítica.

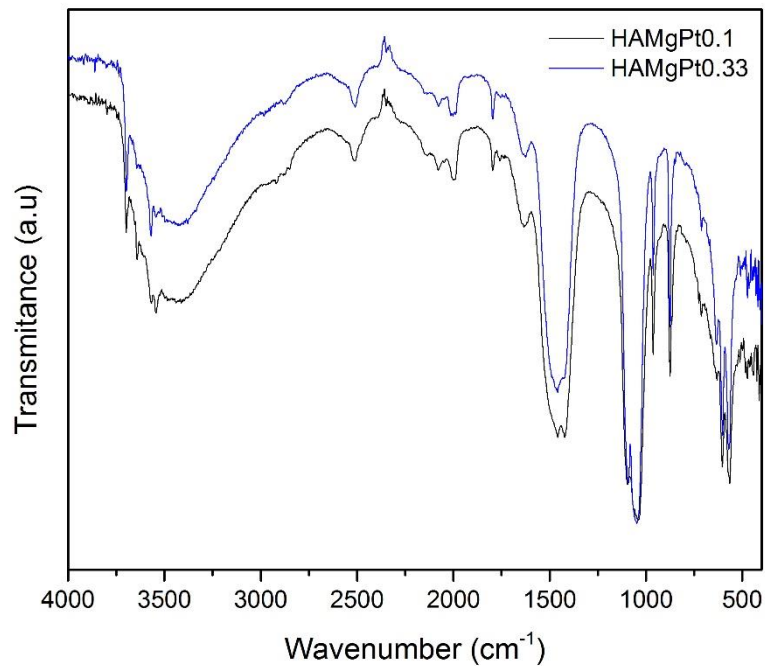


Figura 16 Comparación espectros FTIR de las muestras sintetizadas a relaciones S/C de 0.1 y 0.33

3.2.5. Conclusiones parciales del análisis de Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier

Las relaciones S/C y la incorporación de iones Mg^{2+} , Pt^{4+} y Ag^+ , permiten obtener HA carbonatada con diferentes características. La presencia de iones con radios iónicos inferiores al calcio muestra interferogramas con bandas estrechas y reducción de los grupos OH^- estructurales. Por el contrario, el espectro de HA dopada con un ion de mayor radio iónico podría ocasionar mayor desequilibrio en la estructura, lo cual se ve reflejado en el ensanchamiento de las bandas de los grupos carbonato, la ausencia del pico a 630 cm^{-1} y reducido ordenamiento de los grupos fosfato.

Proporciones surfactante/cosurfactante de 1 y 10 favorecen la incorporación de los iones en la HA induciendo a la formación de fases secundarias o disminución en el grado de cristalinidad, corroborando lo obtenido en el análisis por DRX. No obstante, composiciones de 3 y 6 permiten la formación de HA con alto contenido de grupos carbonato.

3.3 Microscopía Electrónica

La evaluación visual directa de materiales es uno de los requerimientos clave para determinar las características funcionales de cualquier material; permite obtener información de concentración de las nanopartículas, distribución de tamaño, forma, fases y grado de agregación, parámetros cruciales en el análisis de un material.

3.3.1 Microscopía electrónica de barrido

En Microscopía electrónica de barrido- MEB (SEM, por sus siglas en inglés) el material es iluminado con electrones cuya longitud de onda es inferior a la de luz, lo cual permite obtener imágenes altamente amplificadas de la superficie de un material. Su funcionamiento está basado en recorrer la muestra con un haz de electrones, esta interacción genera electrones retrodispersados y electrones secundarios que son contados por detectores, llevando a la formación de micrografías. No sólo información topográfica es obtenida sino también datos concernientes a la composición química del material, al tener incorporado un sistema de micro-análisis por energía dispersiva de rayos X (EDS) (79).

- **Metodología**

Los análisis por microscopía electrónica de barrido se llevaron a cabo en un equipo JEOL JSM-6490LV con un sistema de micro-análisis químico por energía dispersiva de rayos X (EDS). Una pequeña cantidad de muestra es agregada a etanol, las suspensiones obtenidas se dejaron en un baño de ultrasonido durante 10 minutos. Luego, se depositó una gota de cada suspensión en un sustrato, posteriormente se hizo un recubrimiento con oro y finalmente se procedió con las lecturas. El tamaño de partícula fue obtenido del análisis de las micrografías SEM a través del software ImageJ 1.5.

- **Efecto de la relación surfactante/cosurfactante y de los iones dopantes en la hidroxiapatita**

En las micrografías SEM de HA sintetizada a diferentes relaciones S/C y dopada con Mg y Pt (Figuras 17 y 18) se puede apreciar la formación de aglomerados de partículas muy finas que se encuentran en el rango de los nanómetros. La Figura 17a. muestra que partículas de HA con morfología esférica y ligeramente alargada forman aglomerados esféricos con un tamaño de 0.85 μm ; en la Figura 17c y e se observa arreglos desordenados de NPs de HA. Al aumentar la relación S/C a 6 y 10, aparentemente no hay un cambio significativo en la morfología de partículas de HA; sin embargo, al variar este parámetro la proporción de aspecto (relación longitud/diámetro) cambia. A una relación S/C de 3 y 6 (Figura 17 a y c) la proporción de aspecto promedio es 1.2 en partículas con un tamaño de ~58 nm y 66 nm, respectivamente; a una relación S/C de 10 se obtienen NPs con una

proporción de aspecto promedio de 2.0 (longitudes de 60-160 nm y diámetros de 30-80 nm). Al incrementar la concentración de surfactante aumenta el tamaño de partícula y genera morfologías que pasan de esféricas a alargadas, al reducirse la proporción de cosurfactante.

Los espectros EDS señalan la presencia de Ca, P y O en las muestras de HA sintetizada a una relación S/C de 3, 6 y 10 (Figuras 17 b, d y f); también, aparece un pico de menor intensidad asociado a aluminio (Al), indicando la existencia de impurezas.

Las NPs obtenidas a una relación S/C de 10 presentan diámetros similares a los reportados en la literatura para síntesis hidrotérmica de HA con un sistema ternario CTAB/PEG/agua (82). Sin embargo, la relación de aspecto difiere notablemente; bajo el sistema cuaternario propuesto en este trabajo (CTAB/PEG/ciclohexano/agua), las micrografías SEM señalan partículas con una relación de aspecto inferior a las observadas en el sistema ternario (relaciones de aspecto entre 15-20) a una concentración de 10% de PEG (82).

Los tamaños de las partículas de HA sintetizada se encuentran en el rango de 30-160 nm (HA3: 58 nm, HA6: 66 nm, HA10: 30-160 nm); NPs de HA con estas dimensiones podrían ser de gran interés para aplicaciones dentales o en reparación ósea. Puesto que los cristales de HA en los huesos tienen 30-50nm de longitud, 15-30 nm de ancho y en el esmalte de los dientes, la HA se encuentra en forma de barras de 25-10 nm de espesor con longitudes de 100 nm a micrómetros (83).

La estructura y propiedades de las NPs de HA son determinantes en la interacción con los organismos vivos; su actividad se ve afectada por la aglomeración, ya que se disminuye el área superficial y en consecuencia la efectividad. Según lo observado en las micrografías SEM a menor relación S/C se forman agregados, de lo cual se podría inferir que el desempeño de las NPs obtenidas a estas condiciones fuera menor al de las obtenidas a relaciones S/C altas. Por tanto, se hace necesario realizar más estudios para comprender la influencia del tamaño y estructura como futuro biomaterial; también es importante tener en cuenta, que aunque las NPs de HA pueden cumplir su función, podrían penetrar organismos biológicos fácilmente y potencialmente afectar la fisiología de cualquier célula en el cuerpo (83).

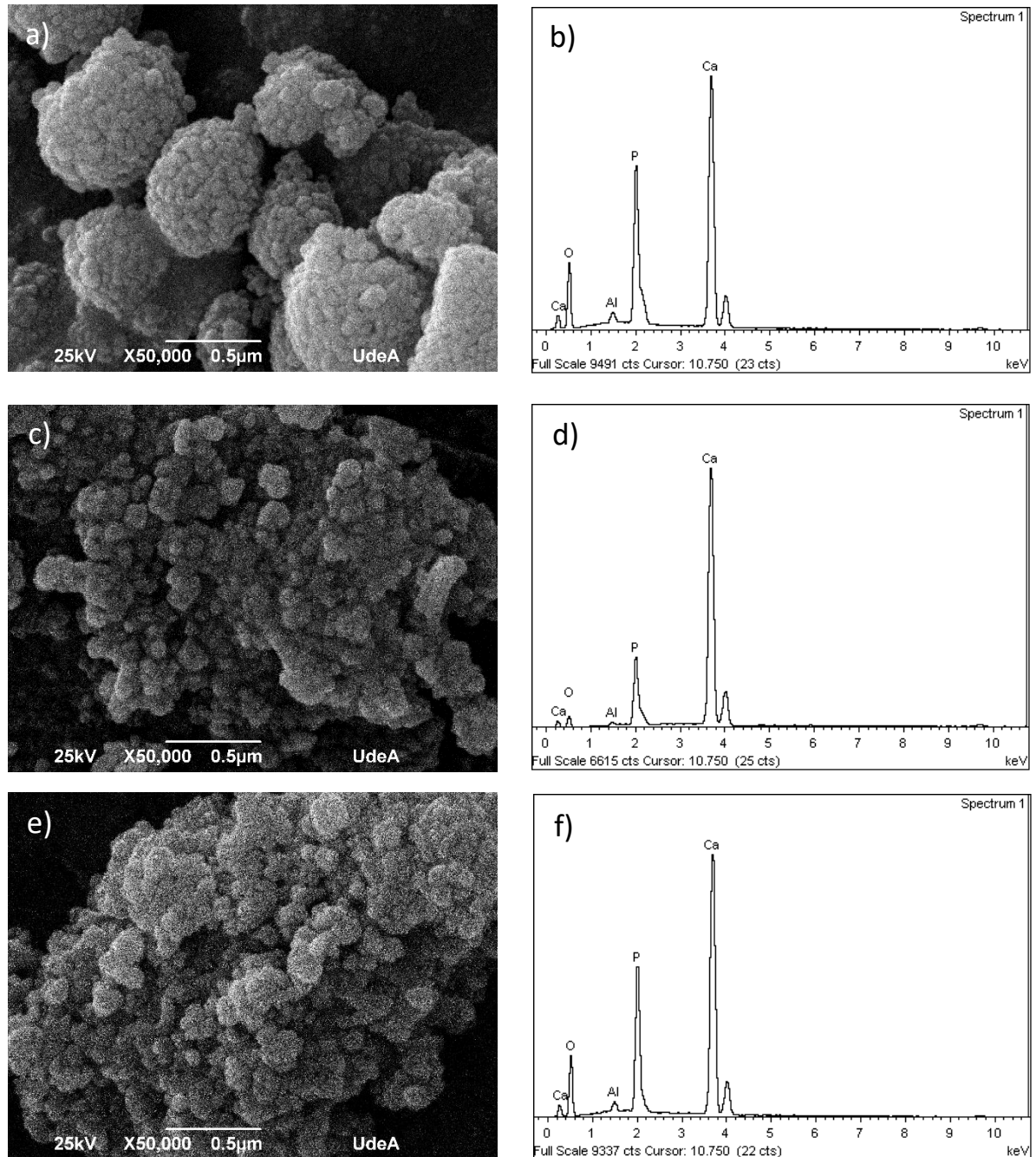


Figura 17 Micrografías SEM y espectros EDS a-b) HA3, c-d) HA6, e-f) HA10

La incorporación de iones Mg en la HA a diferentes relaciones S/C (Figuras 18a y c) muestra partículas más alargadas a una relación S/C de 6 (longitud de 70-250 nm y diámetro 35-90 nm) que las obtenidas a una relación S/C de 10 (longitud de 50-180 nm y diámetro de 40-85 nm). HA dopada con Mg y Pt a una proporción igual de surfactante y cosurfactante presenta la tendencia a formar aglomerados ordenados de tamaño micrométrico (~0.8 µm) y partículas con un tamaño promedio de 51 nm (Figura 18e).

El análisis elemental claramente revela la presencia de Ca, P, Mg y O en los sólidos de HA dopada con Mg (Figuras 18 b y d); Ca, P, Mg, Pt y O en la estructura de HA dopada con Mg y Pt (Figura 18f). Debido a que esta técnica es semicuantitativa y a la existencia de fases secundarias no se procedió con los cálculos de relación Ca/P.

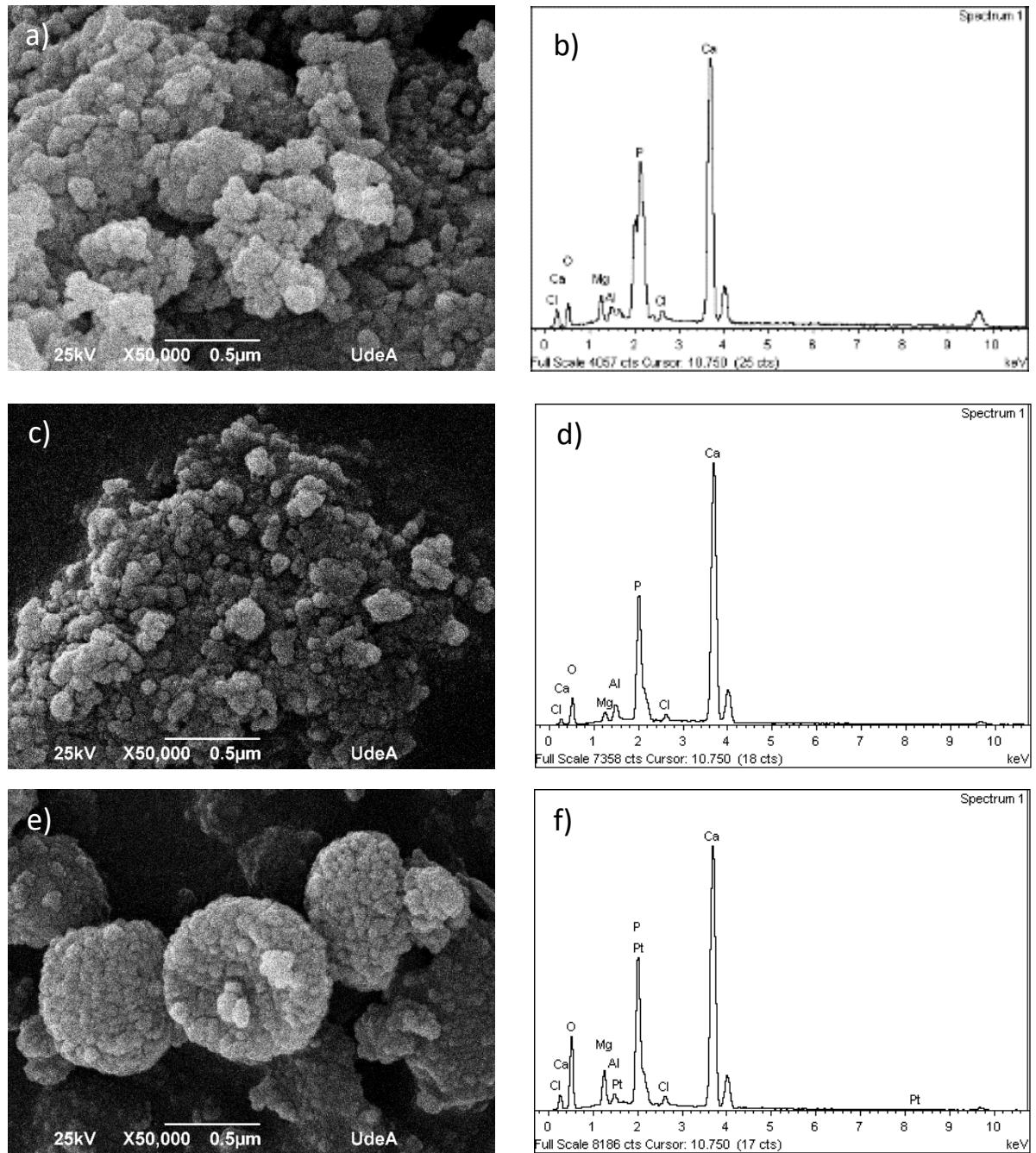


Figura 18 Micrografías SEM y espectros EDS a-b) HAMg6, c-d) HAMg10, e-f) HAMgPt1

3.3.2 Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo

Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM, por sus siglas en inglés), es una de las técnicas de más alta resolución para visualización de materiales a nanoescala. Por definición, el FE-SEM involucra el uso de una fuente de emisión de campo también llamada emisor de campo de cátodo frío usualmente compuesto de alambre de tungsteno (W) que libera electrones. Dentro de la columna de alto vacío estos electrones, llamados primarios, son enfocados y desviados por lentes electrónicas para producir un haz de barrido estrecho que bombardea el objeto. Como resultado, los electrones secundarios se emiten desde cada punto del objeto. El ángulo y velocidad de estos electrones secundarios se relaciona con la estructura superficial del objeto. Un detector captura los electrones secundarios y produce una señal electrónica. Esta señal se amplifica y se transforma en una imagen digital (84).

- **Metodología**

Cabe aclarar que en esta técnica se emplearon dos equipos, debido a la disponibilidad del mismo. El análisis de las micrografías fue realizado con el software ImageJ 1.5.

La lectura de las muestras de HA dopada con Mg y Pt a una relación S/C de 0.1, 0.33, 1 y 10 fueron llevadas a cabo en un equipo FE-SEM JSM 7100F y las sintetizadas a una relación S/C de 3 y 6 fueron realizadas con un equipo FE-SEM JEOL 7100. La preparación de la muestra consistió en suspensión de los polvos en etanol y sonicación durante 10 minutos. Posteriormente una gota de la suspensión se pone sobre un sustrato y se espera que se seque para ser llevada al equipo e iniciar el análisis.

- **Efecto de la relación surfactante/cosurfactante en hidroxiapatita dopada con magnesio y platino**

La Figura 19 claramente revela la influencia que tiene la relación S/C en la morfología de las NPs, pasando de esferas, barras y placas. Al variar la concentración de PEG, se obtienen partículas con una relación de aspecto menor; la Figura 19a (S/C de 0.1) indica la formación de partículas con una relación de aspecto más baja (proporción longitud/diámetro en un rango de 2-3) longitud de 20-120 nm, diámetro de 10-40 nm; también hay presencia de partículas esféricas con un diámetro de 10-20 nm. A diferencia de ésta, en la Figura 19b (S/C de 0.33) se observa partículas esféricas (diámetro aproximadamente de 50 nm) que coexisten con partículas de alta relación de aspecto (proporción longitud/diámetro de 7) longitud de 50-350 nm, diámetro de 30-50 nm; la existencia de estas dos morfologías posiblemente corresponde a las fases de HA y CaCO₃ detectadas por DRX. Una proporción 1:1 de CTAB y PEG induce a la formación de partículas con morfología de láminas (longitud 60-200 nm y ancho 40-150 nm) y otras partículas con morfología más redondeada (Figura 19c) que podrían relacionarse con las fases de HA, CaCO₃, fosfato tricálcico y MgO, según a lo encontrado en DRX; al aumentar la relación S/C a 10 (Figura 19d), las partículas presentan una

relación de aspecto mayor (proporción longitud/diámetro en un rango de 2-5), prima la morfología de barras sobre esferas (longitud entre 80-200 nm y diámetro de 50-85 nm), posiblemente relacionadas con las fases detectadas de HA, CaCO_3 y MgO .

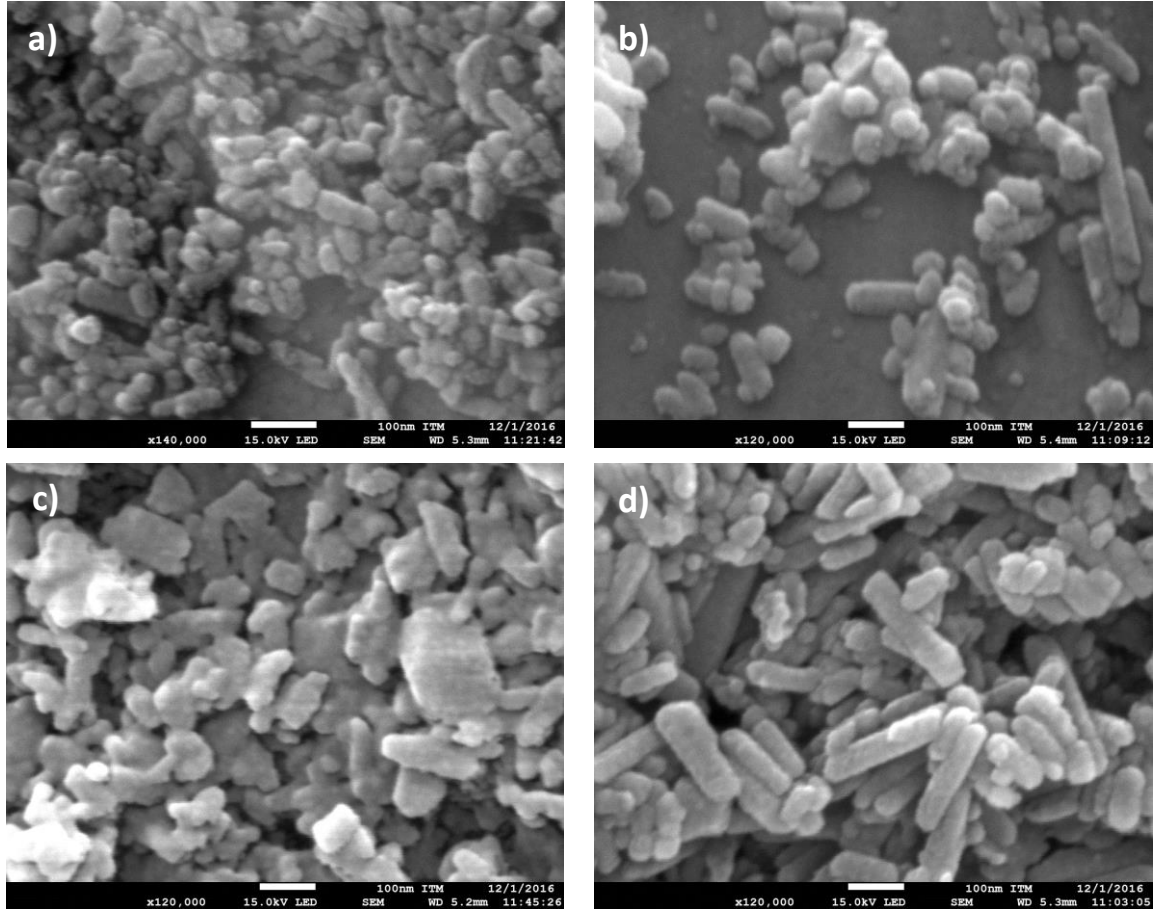


Figura 19 Micrografías FESEM de HAMgPt sintetizada a diferentes relaciones S/C a) HAMgPt0.1, b) HAMgPt0.33, c) HAMgPt1, d) HAMgPt10.

A una relación S/C de 3 (Figura 20) las partículas presentan una relación de aspecto en un rango de 2-5; tienen una longitud de 95-300 nm y diámetro de 40-90 nm. Bajo esta condición se obtienen NPs con menor espesor y prima una morfología similar a dendritas. HA con este tipo de morfología fue sintetizada por Liu et al. mediante el método de precipitación química asistida con los surfactantes CTAB y PEG, los autores sugirieron que la adición de estos surfactantes a concentraciones adecuadas actúan como plantillas y permiten la formación de partículas con morfología específica (85). De acuerdo a esto, la carga y estructura de los surfactantes CTAB y PEG orientan el crecimiento de los cristales; el PEG -un surfactante no iónico- puede formar en solución acuosa cadenas largas y el CTAB ioniza completamente en solución acuosa dando lugar a un catión con estructura tetraédrica que bajo cierta concentración tiende a formar micelas elongadas o de barras. Por tanto, a una relación S/C de 3, las partículas crecen a lo largo de esas cadenas largas y como dendritas al unirse los iones Ca^{2+} , PO_4^{3-} y OH^- (85).

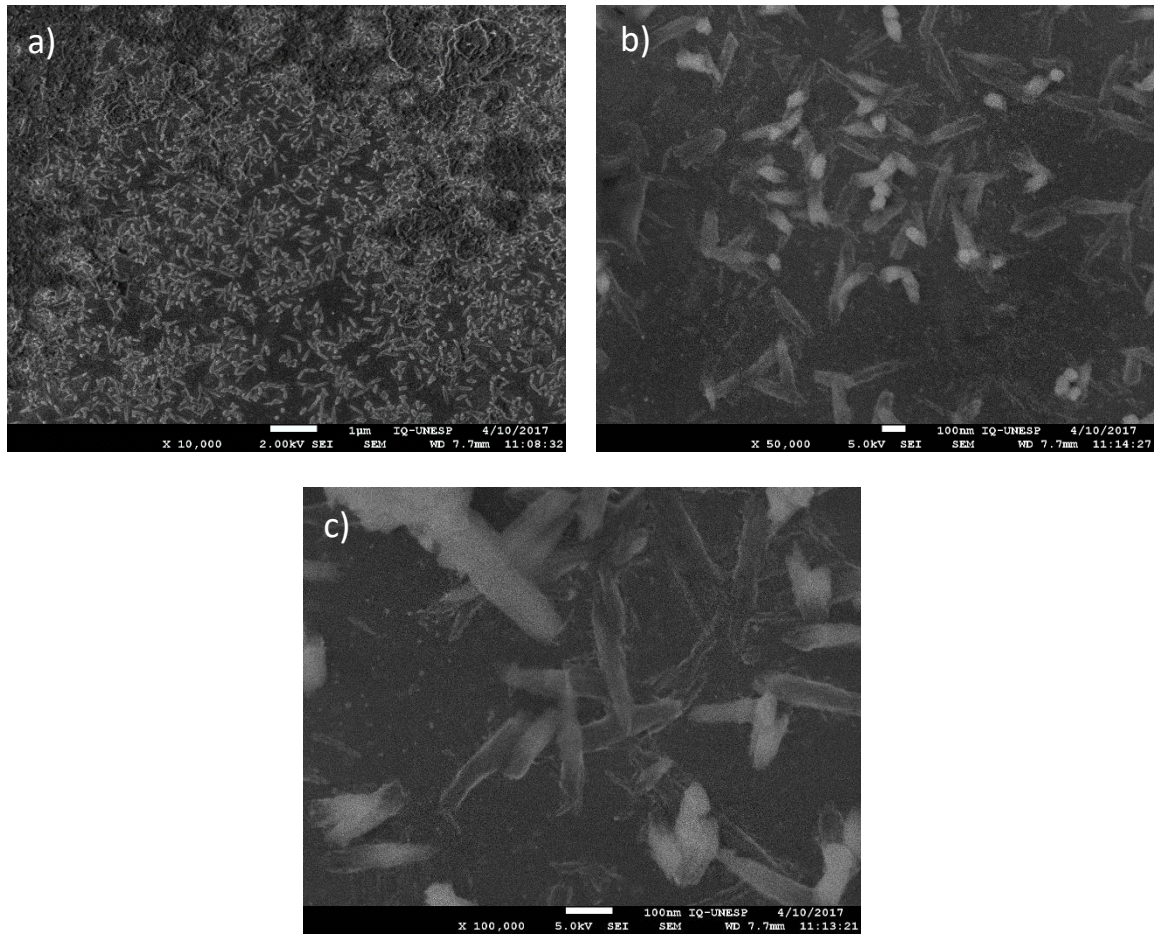


Figura 20 Micrografías FE-SEM a diferentes aumentos de HAMgPt3 a) 10000X, b) 50000X, c) 100000X

En la Figura 21 se observa la tendencia de las NPs, sintetizadas a una relación S/C de 6, a conformar agregados, lo cual puede deberse a su tamaño, tienen una longitud entre 40-85 nm y un diámetro de 20-40 nm. En ésta se evidencia morfologías de placas, formas alargadas e irregulares.

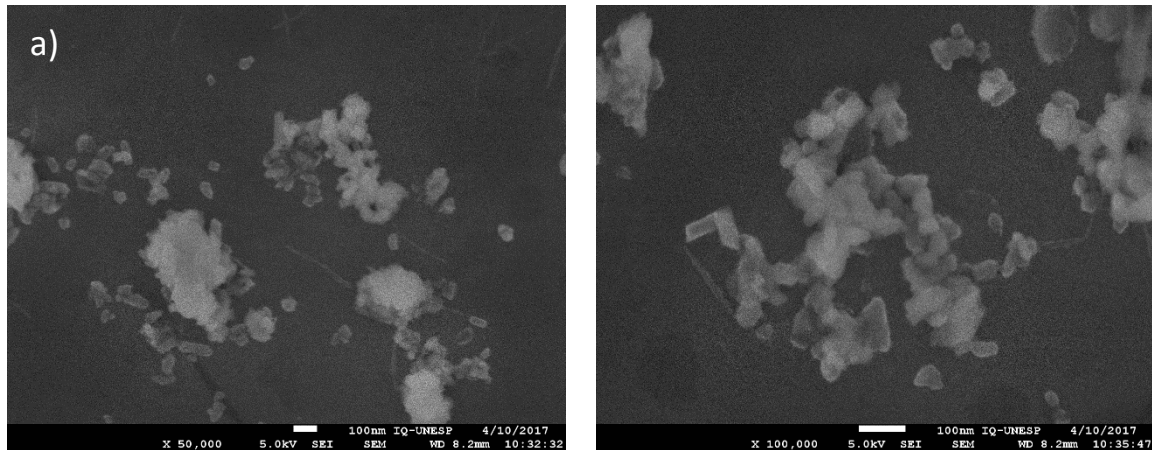


Figura 21 Micrografías FE-SEM a diferentes aumentos de HAMgPt6 a) 50000X, b) 100000X

- **Efecto del dopado con magnesio y plata en la hidroxiapatita sintetizada a una relación surfactante/cosurfactante de 6**

A diferencia de la muestra de HA dopada con Mg y Pt, se observan partículas más pequeñas. Hay presencia de partículas esféricas con un diámetro aproximado de 22nm que coexisten con partículas más alargadas que tienen una longitud en un rango de 20- 65 nm y diámetro de 20-30 nm (Figura 22).

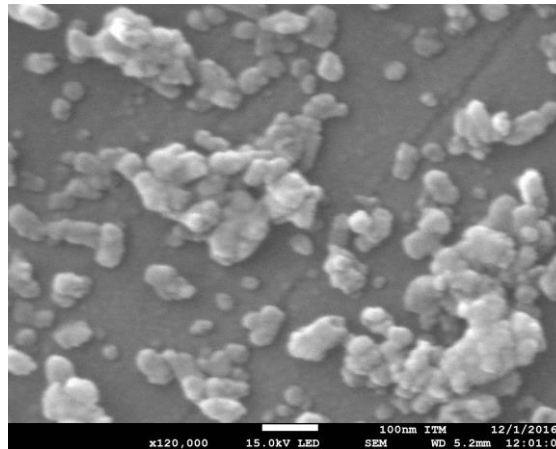


Figura 22 Micrografía FE-SEM de HAMgAg sintetizada a una relación S/C

En el campo de la medicina, las NPs son ampliamente estudiadas, su tamaño es similar al de la mayoría de moléculas biológicas. Lo que las hace candidatas de interés para su aplicación en investigaciones biomédicas *in vivo* e *in vitro*. El resultado de su integración en el campo de la medicina ha permitido su aplicación, principalmente en liberación de fármacos, sensores, implantes y como agentes antimicrobianos (86).

Las NPs tienen la versatilidad de ser incorporadas en diferentes productos; usar polímeros con NPs amplía su aplicación como portadores de fármacos y factores de crecimiento para tratar mejor los defectos óseos y promover la cicatrización de heridas (4). Por otro lado, la producción de adhesivos para ortodoncia y resinas dentales con NPs que posean actividad antimicrobiana, podrían ser útiles en disminuir la formación de caries, que en la mayoría de casos son las principales causantes de resultados no deseados en este tipo de procedimientos (87,88).

El tamaño, área superficial, forma, composición química y solubilidad de las NPs determinan la respuesta biológica, por consiguiente, su aplicación es selectiva. El tamaño influye en la penetración y retención de las NPs en los tumores; NPs con tamaños inferiores a 50 nm pueden penetrar los tumores, contrario a NPs de 100 nm que tienden a localizarse principalmente en la periferia del tumor y alrededor de los vasos sanguíneos, obstaculizando su entrada y función (86). Para ilustrar lo descrito, en la Tabla 25, se muestra la aplicación de algunas NPs reportadas en la literatura.

Tabla 25 Nanopartículas y su aplicación biomédica

Composición química	Tamaño Promedio (nm)	Forma	Aplicación biomédica
AuNPs	1.9	-	Detección de cáncer (89)
	5	-	Liberación de fármacos (89)
	60	barras	Imágenes fotoacústicas (89)
	14	esférica	Detección de tuberculosis (86)
Tiopronina con AuNPs	50-100	esférica	Tratamiento para el cáncer (89)
PEG con AuNPs	33	-	Tratamiento VIH(86)
AuNPs conjugadas con péptidos	13-123	esféricas y hexagonales	
	5-22	esféricas	
	50	Ovaladas, triangulares, pentagonales y hexagonales	Inhibición de células de cáncer de mama (86)
	30	esféricas	Antimicrobiano-Inhibición <i>E. coli</i> , <i>S.aureus</i> (86)
	100	-	Apósitos antibacterianos para heridas (90)
	30-50	-	Antimicrobiano-Inhibición <i>E. coli</i> , <i>P.aeruginosa</i> (86)
Ag NPs	50	-	Inhibición VIH (86)
	50	-	Lentes de contacto antimicrobiano
			Recubrimiento de catéteres
			Implantes

			Apósitos para heridas de quemaduras (86)
	5-8	-	Detección de cáncer (86)
	>100		Prevención de pérdida ósea (86)
Pt NPs	1-18	esféricas, cúbicas, en forma de flor	Efecto bacteriostático (86)
	34		Efecto citotóxico en células cancerígenas (86)
	5-20	esféricas	Tratamiento contra el parkinson (86)
Andamios de fosfatos de calcio con PtNPs	Andamios de 100-400 μm	-	Injertos óseos (91)
	50		Máscaras quirúrgicas antimicrobianas (5)
TiO ₂	17	-	Antimicrobiano-Inhibición <i>E. coli</i> (5)
	13,40,60	-	Antimicrobiano-Inhibición <i>S. aureus</i> (5)
ZnO	12	-	Antimicrobiano-Inhibición <i>E. coli</i>
	100	-	Antimicrobiano-Inhibición <i>E. coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> (5)
Cu	9	-	<i>S. aureus</i>
Fe ₃ O ₄	8	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Resina compuesta HA-polidopamina-NPs de Ag	200	Nanofibras de HA	Resina dental con propiedades antibacterianas (87)
	10- 20	Nanoesferas de Ag	
HA/Ag	55-65 nm	esféricas	Adhesivo para ortodoncia (88)

Al comparar la información consignada en la Tabla 25 con las NPs sintetizadas en esta investigación (Tabla 26); los diferentes tamaños y morfologías obtenidos indican que las NPs podrían ser aplicadas en biomedicina. El conocimiento de estas propiedades es un primer paso para comprender las posibles disimilitudes en el comportamiento como nanomateriales.

Tabla 26 Tamaño y forma de las nanopartículas sintetizadas

Muestras sintetizadas	Tamaño de partícula (nm)	Forma
HA3	58	esféricas
HA6	66	esféricas
HA10	longitud: 60-160 nm diámetro: 30-80 nm	alargada
HAMg6	longitud: 70-250nm diámetro: 35-90 nm	esféricas- alargada
HAMg10	longitud: 50-180 nm diámetro: 40-85 nm	esféricas- alargada

HAMgPt1	51 longitud: 60-200 nm ancho: 40-150 nm	esféricas, láminas
HAMgPt0.1	longitud: 20-120 nm diámetro:10-40 nm	esféricas- alargada
HAMgPt0.33	50 nm longitud: 50-350 nm diámetro: 30-50 nm	esféricas barras
HAMgPt10	longitud: 80-200 nm diámetro: 50-85 nm	barras
HAMgPt3	longitud: 95-300 nm diámetro: 40-90 nm	dendritas
HAMgPt6	longitud: 40-85 nm diámetro:20-40 nm	placas, formas alargadas e irregulares
HAMgAg6	longitud: 20- 65 nm diámetro de 20-30 nm.	esféricas- alargada

3.3.3 Conclusiones parciales del análisis de Microscopía electrónica

Las micrografías SEM mostraron que la variación de la relación S/C es determinante en el grado de agregación de las partículas, ya que a medida que aumenta esta relación la tendencia a formar aglomerados con morfología esférica disminuye.

La incorporación simultánea de Mg y Pt o Mg y Ag en la HA lleva a una disminución en el tamaño de partícula, parámetro que también es afectado por la concentración de CTAB.

Las partículas sintetizadas tienen tamaño comparable al de las apatitas biológicas y a las NPs metálicas o de óxidos metálicos que han demostrado ser aplicables en el campo biomédico. Lo cual genera mayor interés en realizar pruebas necesarias para evaluar su efectividad como biomaterial.

3.4 Potencial Zeta

El potencial zeta es una medida de la magnitud de la atracción electrostática entre las partículas, es uno de los parámetros que influye en la aplicación y función de un material. Esta técnica brinda información de la causa de dispersión o agregación, es ampliamente aplicada para la formulación de emulsiones, suspensiones y dispersiones. Para fines de actividad antibacteriana, es considerado uno de los factores más relevantes, ya que de este depende la interacción de las nanopartículas con las bacterias (92).

3.4.1. Metodología

Por disponibilidad instrumental, las medidas fueron realizadas en un equipo NanoPlus marca Micromeritics para las muestras sintetizadas, HAMgPt a relaciones S/C de 0.33 y 3. Se prepararon soluciones de agua destilada con la cantidad de muestra necesaria para alcanzar una concentración de 0.01% (p/v). Las curvas de potencial zeta se monitorearon entre pH 2 y pH 12.

3.4.2. Efecto de la relación surfactante/cosurfactante en el potencial zeta

En la Figura 23 se observa el potencial zeta de las muestras de HAMgPt0.33 y HAMgPt3, como función del pH. En ésta, se evidencia un comportamiento de ambas muestras hacia valores de potencial zeta positivos en pHs ácidos (Zona 1) y valores negativos en pHs básicos (Zona 2). En el caso de HAMgPt0.33 el punto isoeléctrico (P.I) o potencial zeta cero se alcanza a un pH de 9 mientras que en HAMgPt3 se encuentra a pH de 7. La presencia de mayor cantidad de PEG desplaza el potencial hacia valores más positivos (12 mV) y a menor concentración se obtienen valores más negativos de potencial zeta (-20mV). Lo cual podría estar relacionado a la incorporación de iones en la HA; como se observó en los difractogramas en las muestras de HAMgPt0.33 no hay presencia de fases de MgO y los picos correspondientes a la fase CaCO_3 son inferiores en intensidad comparados con HAMgPt3. Una mayor sustitución de los iones Ca^{2+} por Mg^{2+} y Pt^{4+} generaría mayor desequilibrio en la estructura de la HA favoreciendo la co-sustitución de iones CO_3^{2-} por los OH^- , resultado reflejado en un potencial zeta más negativo.

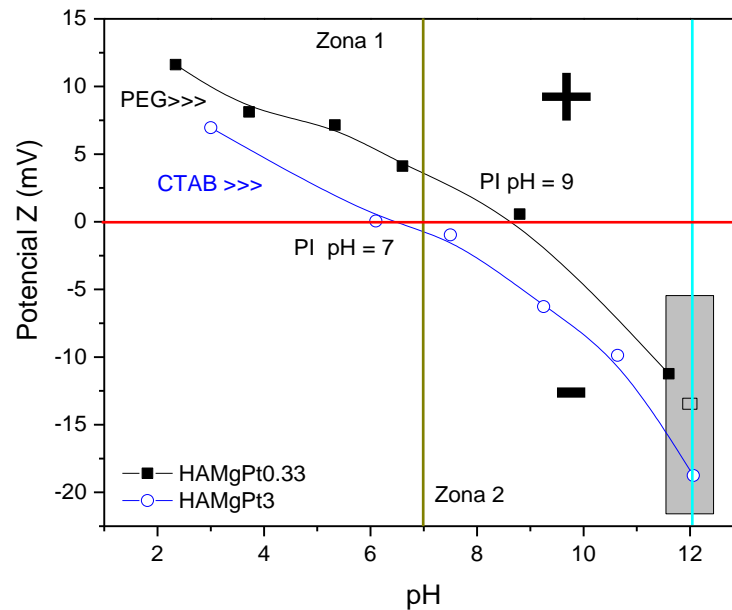


Figura 23 Distribución de potencial Z (mV) vs pH de la muestras dispersas en agua a una concentración de 0.01% (p/v)

El potencial zeta podría influir en la interacción entre las NPs y membranas celulares. NPs cargadas negativamente tendrían menor interacción electrostática con las bacterias cuya superficie posee cargas negativas. Por otro lado, NPs con un potencial zeta entre -10 mV y +10 mV son consideradas aproximadamente neutras, mientras NPs con potenciales mayores a +30 mV o menores que -30 mV son fuertemente catiónicas y aniónicas, respectivamente (29). De acuerdo a esto, las NPs de HAMgPt0.33 y HAMgPt3 a condiciones de pH ácidos son neutras, lo cual se vería reflejado en la actividad antibacteriana.

3.4.3. Conclusiones parciales potencial zeta

La relación estequiométrica surfactante/cosurfactante es un parámetro determinante en el potencial zeta de las nanopartículas de HAMgPt. A menor concentración de PEG las nanopartículas presentan un potencial zeta más negativo.

Tanto a pHs ácidos como a mayor cantidad de PEG las nanopartículas de HAMgPt podrían ser consideradas neutras, condición que dificultaría su interacción con las bacterias.

Nanopartículas de HAMgPt3 tendrían mínima interacción electrostática con bacterias con carga negativa en la superficie, lo que indicaría que es necesario emplear relativamente más altas concentraciones de NPs para producir un efecto antibacteriano.

4 Actividad antibacteriana

En este capítulo se presenta aspectos relacionados al estudio de susceptibilidad antibacteriana de las diferentes NPs frente a una bacteria Gram-negativa y Gram-positiva mediante antibiograma por difusión con discos. El desarrollo de este análisis se lleva a cabo en tres etapas; la Etapa I involucra la evaluación de sensibilidad de las NPs de HAMgPt sintetizadas a diferentes relaciones S/C contra la bacteria *E.coli*, en esta etapa se define cuál nanopartícula tiene mayor actividad; en la Etapa II, se mide la resistencia de NPs de HA, HAMg, HAMgPt, HAMgAg- que mostraron mejores resultados, según la relación S/C - contra la bacteria *E.coli* y *S. mutans*. Esto con el fin de identificar si existe un efecto sinérgico entre el Mg y el Pt, y comparar la sensibilidad del material propuesto (HAMgPt) con HAMgAg, un material que presenta uno de los iones metálicos más efectivo en resistencia antibacteriana. Por último, en la Etapa III, se hace el mismo análisis de la Etapa II bajo radiación UV.

4.1 Efecto de la relación surfactante/cosurfactante en la susceptibilidad antibacteriana de hidroxiapatita dopada con magnesio y platino

El microorganismo empleado para las pruebas fue una bacteria gram-negativa, *E. coli* (ATCC 8739). Inicialmente se llevó a cabo la siembra de la cepa en agar nutritivo en forma de estrías, la cual se incubó a 37°C en un periodo de 24 horas. Posterior a este periodo de incubación, de la caja de Petri que contenía la cepa activada, se seleccionó de una a tres colonias con asa de siembra y se transfirieron a un tubo de ensayo que contenía 5 mL de medio de cultivo Luria-Bertani (LB), la solución se homogenizó y constantemente se evaluó la turbidez, para garantizar que fuera ópticamente comparable al patrón estándar de 0.5 McFarland que corresponde aproximadamente a una población de $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ unidades formadoras de colonia (UFC)/mL (13,93,94).

Posteriormente, se inoculó la superficie de una caja de Petri que contenía Agar Mueller Hinton frotando suavemente la superficie con un hisopo impregnado de la suspensión ajustada y para asegurar una distribución homogénea del inóculo se hizo el procedimiento rotando la caja aproximadamente 60° (13,93,94).

Después de 15 minutos, se distribuyeron en la superficie de las cajas de Petri inoculadas los discos de papel filtro de 6 mm estériles, a los cuales previamente se les había adicionado 30 µL de la solución madre de cada nanopartícula a evaluar y se habían dejado secar en una caja de Petri cerrada. El control positivo fue un disco con Tego 51.

Los ensayos se realizaron con soluciones madre, cuyas concentraciones fueron de 5mg/mL, 11 mg/mL, 14 mg/mL y 28 mg/mL. Cada solución se preparó adicionando la cantidad en mg de los

polvos sintetizados a 9 mL de agua destilada estéril y se dejaron 1 hora en baño de ultrasonido, esto con el fin de dispersar los polvos en la solución.

Las placas se incubaron invertidas a 37°C durante 24 horas. Luego de este periodo se realizó la lectura de los halos de inhibición incluyendo el diámetro de los discos. Todos los ensayos de actividad antibacteriana se realizaron tres veces.

4.1.1 Resultados de actividad antibacteriana

Debido a que los ensayos realizados con soluciones madre de concentración 5 mg/mL, 11 mg/mL y 14 mg/mL no presentaron resultados evidentes; en la primera, no se observó halo de inhibición, en la segunda un halo no muy bien definido y en la tercera halos muy pequeños; los resultados presentados en este apartado corresponden a los de solución madre con concentración de 28 mg/mL, ya que a esta condición se observó claramente la zona de inhibición (Figura 24).

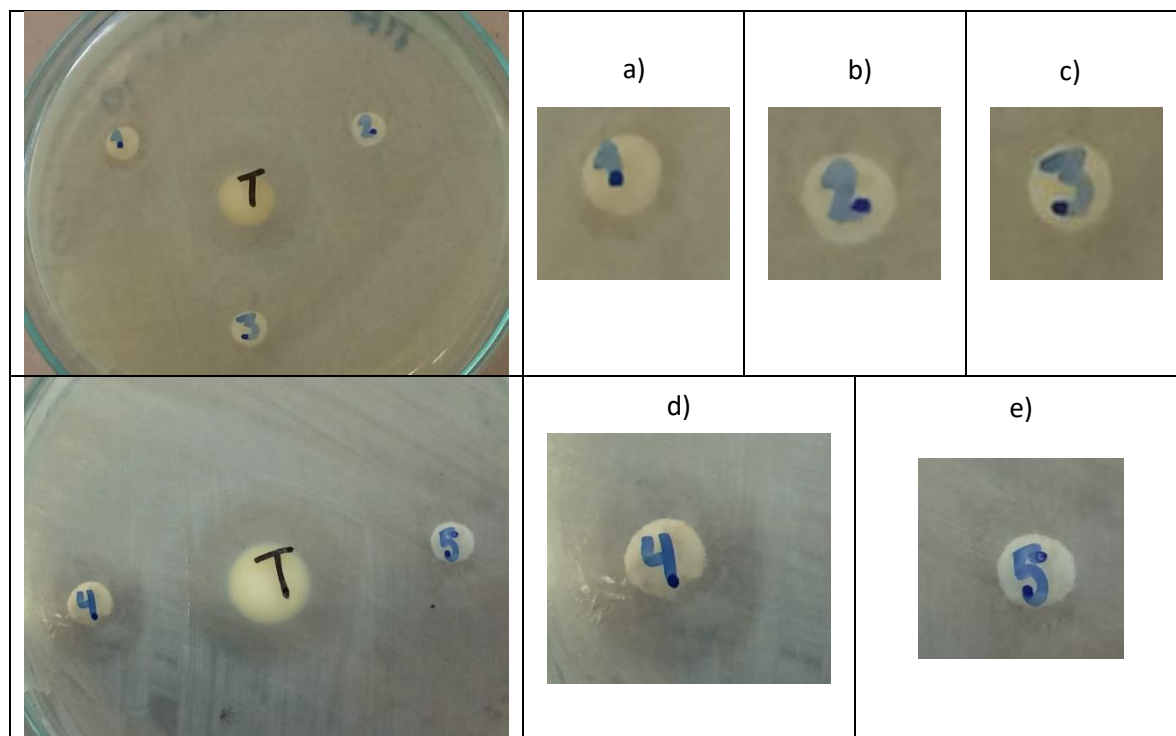


Figura 24 Resultados antibiograma frente a *E.coli* a) HAMgPt10, b) HAMgPt0.1, c) HAMgPt0.33, d) HAMgPt6, e) HAMgPt3

Tabla 27 Resultados actividad antibacteriana de las muestras

Cepa	Muestras	ZOI (mm)
<i>E. coli</i>	HAMgPt1	Ninguno
	HAMgPt3	10.0 ± 0.5
	HAMgPt6	13.6 ± 0.9
	HAMgPt10	8.5 ± 0.2
	HAMgPt0.1	Ninguno
	HAMgPt0.33	Ninguno
	Tego 51	22.8 ± 0.1

A mayores contenidos de CTAB, donde priman morfologías de nanoestructuras alargadas y está presente la fase de MgO, hubo formación de zonas de inhibición. Sin embargo, al comparar la intensidad de los picos correspondientes a esta fase en los difractogramas, en la muestra con relación S/C de 1 se tiene el pico de mayor intensidad, pero al no presentar actividad antibacteriana, indica que el factor determinante en este comportamiento es la morfología.

Las NPs sintetizadas a relaciones S/C de 3 y 6, presentan morfologías con orificios muy poco redondeados, a diferencia de las sintetizadas a una relación S/C de 10. Lo cual podría influir en el resultado de actividad antibacteriana, puesto que nanopartículas con este tipo de morfología podrían penetrar con mayor facilidad en la pared celular de la bacteria.

En la Figura 25, se ilustra el comportamiento ya discutido de los nanocompuestos HAMgPt, sintetizados a diferentes relaciones S/C, frente a *E. coli* y en la Tabla 28, se resume los resultados obtenidos de DRX, SEM y susceptibilidad antibacteriana.

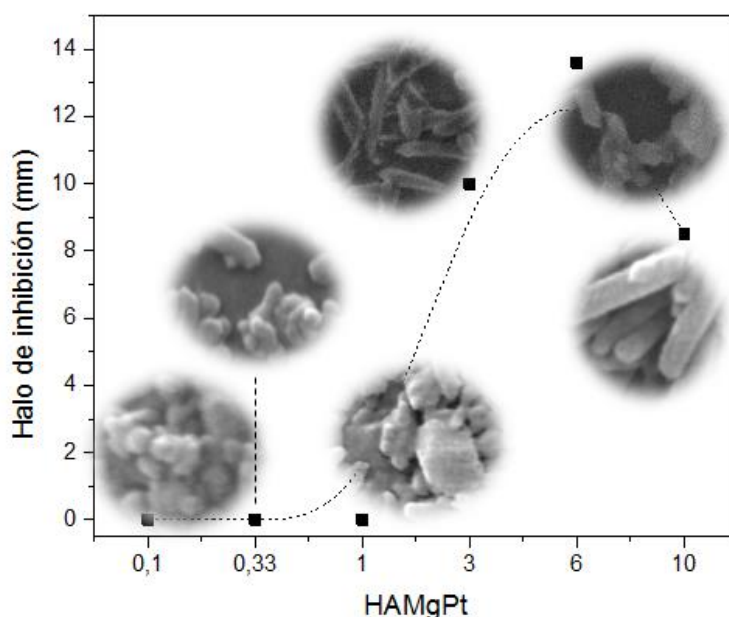
**Figura 25** Actividad antibacteriana vs morfología de los nanocompuestos

Tabla 28 Resultados de las técnicas de caracterización de las nanopartículas sintetizadas

Muestras	ZOI (mm)	Tamaño de partícula SEM (nm)	Morfología	Fases	X _C (%)	β (nm)
HAMgPt0.1	-	longitud: 20-120 diámetro: 10-40 esferas: 20	alargada esférica	HA CaCO ₃	94.76	31.91
HAMgPt0.33	-	longitud: 50-350 diámetro: 30-50 esferas: 50	alargada esférica	HA CaCO ₃	94.65	37.14
HAMgPt1	-	longitud: 60-200 ancho: 40-150	láminas alargada	HA CaCO ₃ Ca ₃ (PO ₄) ₂ MgO	96.5	28.49
HAMgPt3	10.0 ± 0.5	longitud: 95-300 diámetro: 40-90	dendritas	HA CaCO ₃ MgO	95.10	33.83
HAMgPt6	13.6 ± 0.9	longitud: 40-85 diámetro: 20-40	láminas alargadas irregulares	HA CaCO ₃ MgO	91.91	33.39
HAMgPt10	8.5 ± 0.2	longitud: 80-200 diámetro: 50-85	barras esferas	HA CaCO ₃ MgO	79.56	30.93

4.1.2 Conclusiones parciales del efecto de la relación estequiométrica surfactante/cosurfactante en la actividad antibacteriana

Hidroxiapatita con fase de carbonato de calcio, obtenida bajo relaciones S/C de 0.1 y 0.33, presentan morfologías, tamaños y grado de cristalinidad que podrían beneficiar su acción bactericida. No obstante, un efecto positivo contra las bacterias no fue observado, resultado que señala la importancia de la fase de MgO en la propiedad antibacteriana del material.

Nanopartículas de HAMgPt3, HAMgPt6 y HAMgPt10, difieren en tamaño y morfología. Como bien se sabe a menor tamaño de partícula mayor área superficial y por ende más actividad, se esperaría mejor susceptibilidad antibacteriana en HAMgPt6 seguido por HAMgPt10 y por último HAMgPt3; sin embargo, HAMgPt3 mostró un efecto mayor comparado con HAMgPt10, cuyo tamaño de partícula es inferior. Lo cual indica que el resultado de la susceptibilidad antibacteriana se ve afectado principalmente por la morfología, corroborándose así que este parámetro es fundamental para favorecer la interacción partícula- bacteria.

4.2 Efecto de los dopantes en la actividad antibacteriana de la hidroxiapatita

En esta etapa se empleó una bacteria gram-positiva *S. mutans* (ATCC 25175) y gram negativa *E.coli* (ATCC 8739). La metodología empleada es similar a la descrita en la Etapa I. La cepa de *S. mutans* fue sembrada en agar BHI (infusión cerebro-corazón, "brain-heart", Scharlau) e incubada a 37°C bajo condiciones anaerobias durante 24 horas. Posteriormente, este cultivo se transfirió a un tubo de ensayo con solución salina, se homogenizó y se ajustó la turbidez de la suspensión hasta alcanzar un valor de 750 NTU (unidad nefelométrica de turbidez) correspondiente a aproximadamente 1×10^9 UFC/mL. A partir de esta suspensión de bacterias, se preparó 1×10^8 UFC/mL en solución salina y se inoculó con un hisopo en agar Mueller Hinton. Finalmente, los discos conformados con los polvos sintetizados y previamente esterilizados, se depositaron sobre el agar. Por último, las placas se colocaron en frascos herméticamente sellados con una vela para generar una atmósfera libre de oxígeno y se incubaron a 37°C durante 24 horas (94). El control negativo fue el disco de HA6 y positivo el disco de HAMgAg6. En el caso de las cepas de *E.coli* se realizó el mismo procedimiento, sin condiciones anaerobias. Todos los ensayos se hicieron por triplicado.

El proceso de conformación de las pastillas se realizó empleando dos moldes con diámetros de 10 y 5 mm (Figura 26). Para obtener discos de 10 mm se adicionó al molde 100 mg de polvo, luego se llevó a una prensa y se sometió a una presión de 2000 psi. De igual manera, se obtuvieron discos de 5 mm con 30 mg de polvo y una presión de 1000 psi.

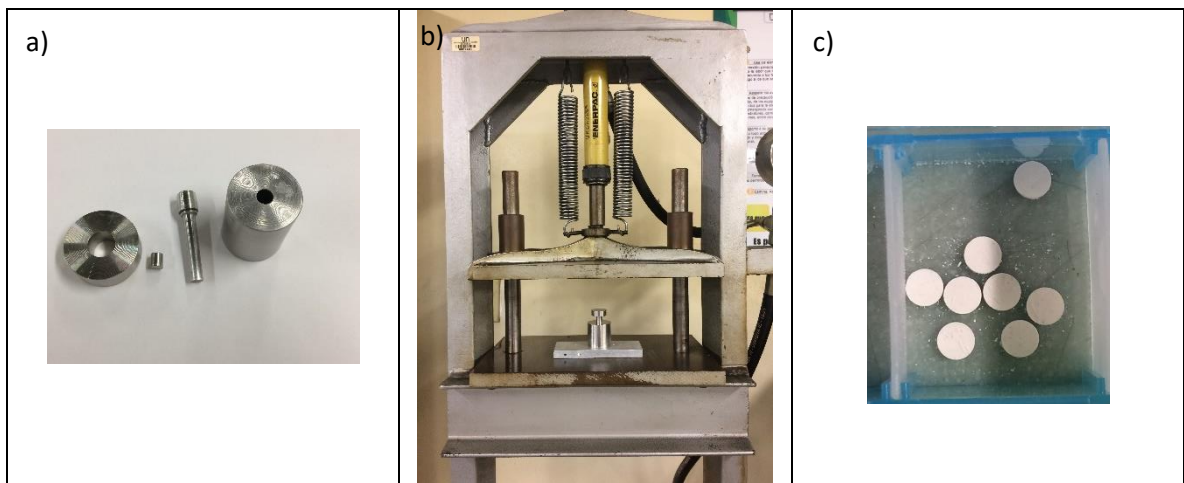


Figura 26 Proceso compactación de polvos a) molde, b) prensado, c) discos

4.2.1 Resultados de actividad antibacteriana

En la Figura 27 se muestra los resultados de la actividad antibacteriana de HA, HAMg y HAMgPt sintetizados a una relación S/C de 6. Puesto que, a esta relación en la Etapa I, se obtuvo mayor efecto sobre la bacteria *E. Coli*. De acuerdo a estos resultados, las muestras de HA y HAPt no tienen actividad antibacteriana.

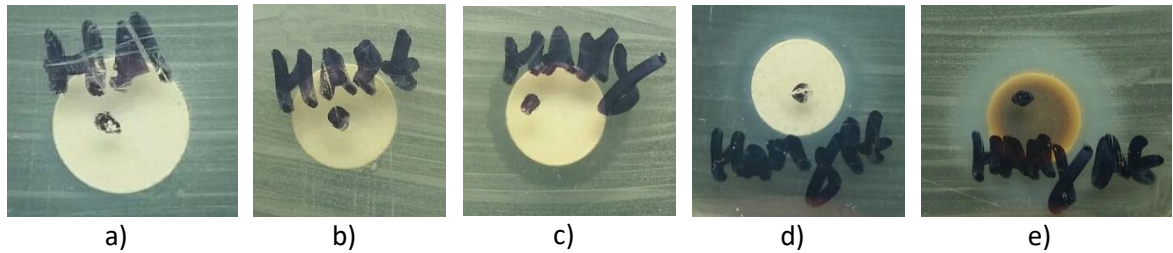


Figura 27 Actividad antibacteriana frente a *S. mutans* a) HA6, b) HAPt6, c) HAMg6, d) HAMgPt6, e) HAMgAg6

Las NPs que presentan mayor actividad bacteriostática son las que tienen Mg y Ag. Además, no se observa un efecto positivo del Pt sobre la bacteria, las zonas de inhibición de HAMg y HAMgPt son aproximadamente de la misma magnitud (Tabla 29). De lo cual puede inferirse, que no existe un efecto sinérgico entre el Mg y Pt, pero sí entre el Mg y la Ag.

Tabla 29 Medida halos de inhibición

Cepa	Muestras	ZOI (mm)
<i>S. mutans</i>	HA6	Ninguno
	HAPt6	Ninguno
	HAMg6	14 ± 1
	HAMgPt6	13.8 ± 0.7
	HAMgAg6	17 ± 1

En la Figura 28, se presenta los resultados obtenidos con pastillas de 5 mm de diámetro y con ambas cepas; el comportamiento de las NPs difiere según el tipo de bacteria, se puede observar un mayor efecto en la bacteria gram positiva. Esto se debe a las diferencias en las características estructurales, la presencia de una membrana celular externa en la bacteria gram-negativa, que rodea la capa de peptidoglicano, dificulta el acceso de las NPs, generando mayor resistencia.

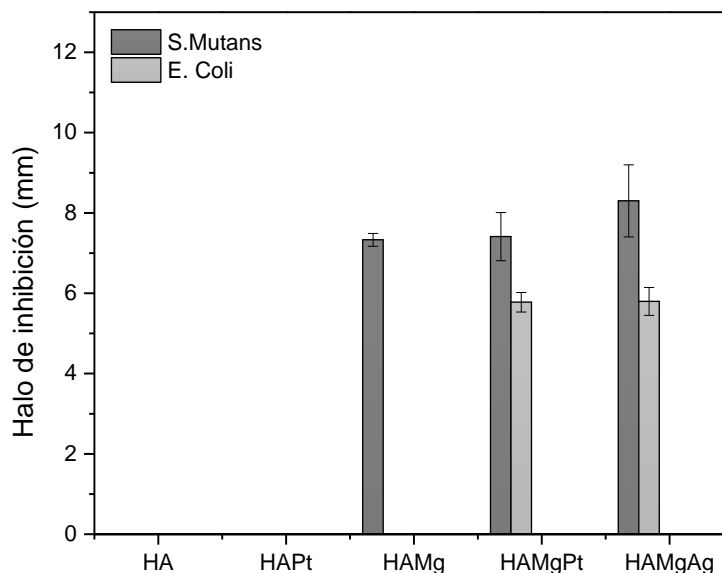


Figura 28 Susceptibilidad antibacteriana de las nanopartículas sintetizadas frente a *S. Mutans* y *E. Coli*.

4.2.2 Conclusiones parciales del efecto de los dopantes en la actividad antibacteriana

HA dopada con Mg presentó mayor actividad antibacteriana contra *S. mutans*, corroborándose así que las diferencias en las propiedades estructurales de los microorganismos gram-positivos y gram-negativos influye en la acción de las NPs. El efecto bacteriostático fue sinérgicamente mejorado por la combinación con iones Ag^+ , comportamiento no observado con Pt.

Los resultados sugieren que HA dopada con Pt no podría ser usada como agente bactericida, se hace necesario evaluar la concentración de Pt para establecer mejores condiciones que favorezcan su actividad, y comprender su mecanismo de acción.

4.3. Efecto de la radiación ultravioleta en la susceptibilidad antibacteriana de hidroxiapatita dopada con magnesio y platino

Los ensayos se realizaron siguiendo el protocolo descrito en las etapas anteriores. Adicionalmente, los discos conformados con los polvos sintetizados (5mm de diámetro), fueron previamente irradiados con una lámpara UV Rayonet Photochemical Reactor Lamp, RPR 3500 A, con una potencia de 8W y emisión de luz de 350 nm (verificada con espectrofotómetro Ocean Optics p200); la potencia de radiación de la lámpara fue caracterizada a 1 cm con un radiómetro PM100A (Thorlabs), obteniéndose 5.70 mW/cm². La radiación fue efectuada durante 1 hora a una distancia de 1cm de los polvos sintetizados, como se muestra en la Figura 29.

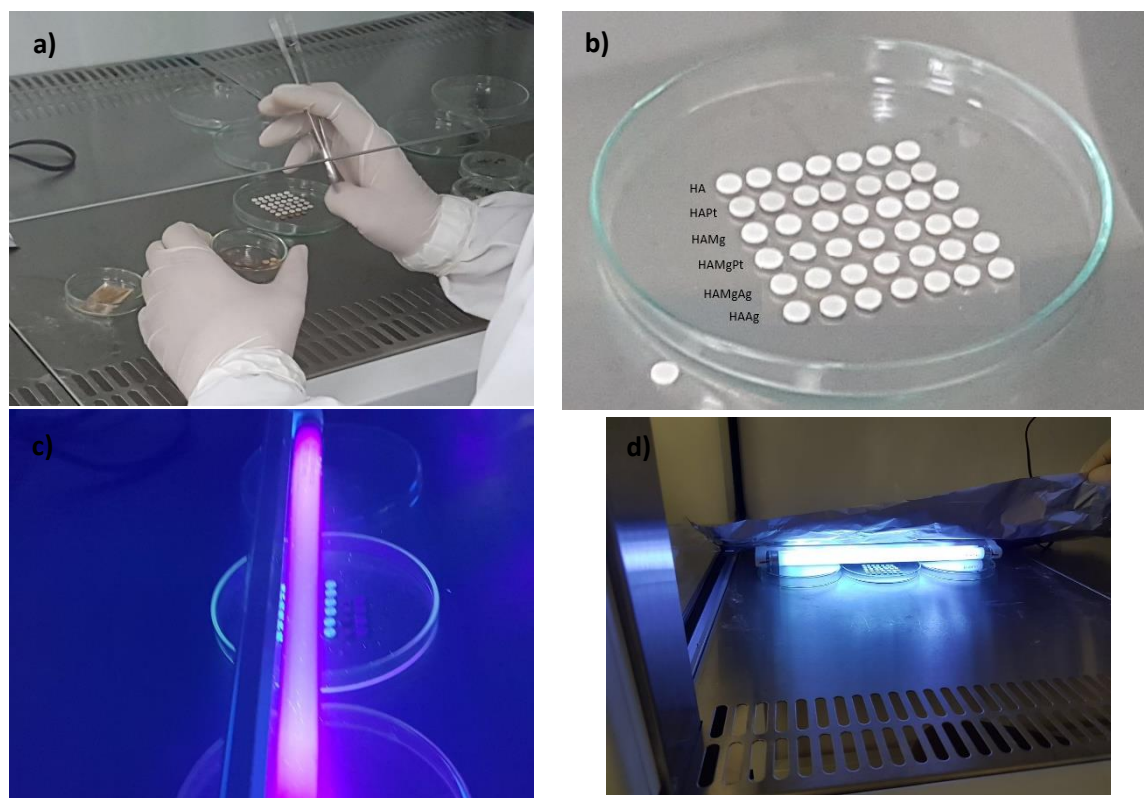


Figura 29 Montaje etapa de radiación UV de las muestras sintetizadas, a) Ubicación de las pastillas, b) rotulación, c) Radiación UV y d) aislamiento.

4.3.1 Resultados de actividad antibacteriana

En la Figura 30 se compara los resultados de actividad antibacteriana de las diferentes NPs frente a *S. Mutans* bajo ambas condiciones, con y sin radiación UV. Al igual que lo obtenido en la etapa anterior (Tabla 29), NPs de HA y HAPt no presentan actividad antibacteriana. Las NPs de HAMg y HAMgPt, mostraron zona de inhibición de igual tamaño, indicando un efecto positivo, atribuido a la presencia de MgO.

Con el fin de corroborar el efecto sinérgico entre Mg y Ag, observado en la etapa anterior, se realizaron las pruebas adicionando el material HAAg. El compuesto HAMgAg tuvo mayor efecto inhibitorio comparado con el generado por los compuestos HAAg y HAMg, este resultado indica que la acción conjunta de los iones es superior a la acción de cada uno por separado.

Las NPs de HAAg sin radiación UV generaron una zona de inhibición de (6.1 ± 0.5) mm, resultado comparable con el obtenido por Ahmad et al. quienes alcanzaron halos de inhibición de (6.33 ± 0.58) mm, con discos de 5mm de diámetro y una concentración de 5% de NPs de HAAg (88).

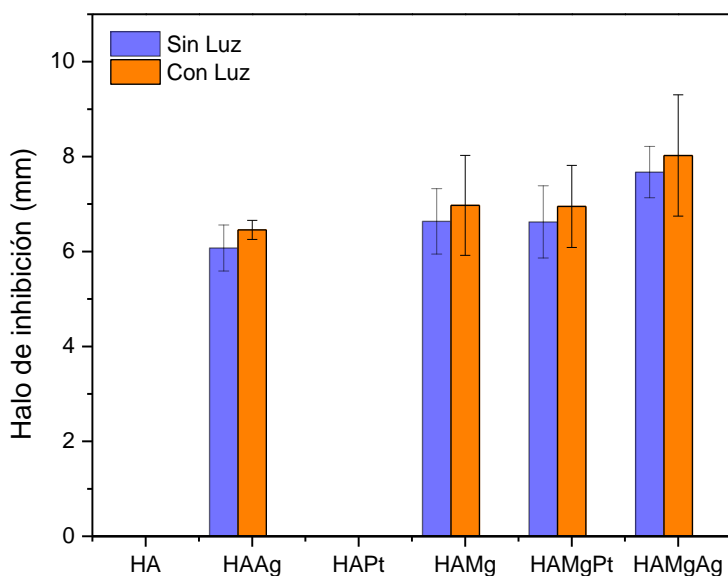


Figura 30 Susceptibilidad antibacteriana de las nanopartículas sintetizadas frente a *S. Mutans*, con y sin radiación UV.

A diferencia de los resultados obtenidos con la bacteria *S. Mutans*, las NPs de HAMg no mostraron susceptibilidad antibacteriana frente a *E. Coli* y las NPs de HAAg, HAMgPt y HAMgAg presentaron

aproximadamente una zona de inhibición del mismo tamaño (Figura 31). El comportamiento observado en las NPs de HAAg y HAMgAg, permite afirmar que la inhibición del crecimiento bacteriano es debido a la presencia de Ag, ya que no se evidencia efecto inhibitorio en las NPs de HAMg, ni un aumento en la zona de inhibición de HAMgAg. Un resultado similar fue reportado por Gopi et al. obtuvieron zonas de inhibición de 11-13 mm para HAAg y de 10-13 mm para HAAg co-sustituida con Mg; sin embargo, concluyeron que si bien, la presencia de Mg no afecta la actividad antibacteriana del material, sí aumenta la viabilidad celular (45).

Por otro lado, la actividad antibacteriana de las NPs de HAMgPt y la no existencia de este efecto en las NPs de HAPt y HAMg, señala que la susceptibilidad antibacteriana se debe a la presencia de Mg y Pt.

Los resultados obtenidos en ambos tipos de bacterias, muestran un aporte positivo de la radiación UV en la actividad antibacteriana, siendo más significativo en *S. Mutans* que en *E. Coli*.

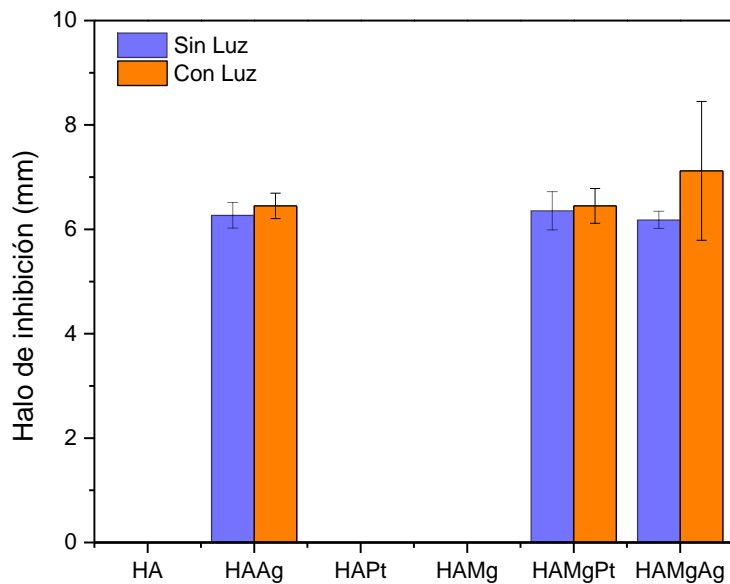


Figura 31 Susceptibilidad antibacteriana de las nanopartículas sintetizadas frente a *E. Coli*, con y sin radiación UV.

Con el fin de comprender cómo la fotocatalisis del material mejora el efecto bacteriostático, la Figura 32, ilustra el mecanismo de fotocatalisis para el MgO con base al mecanismo propuesto por An et al. para el TiO₂ (49).

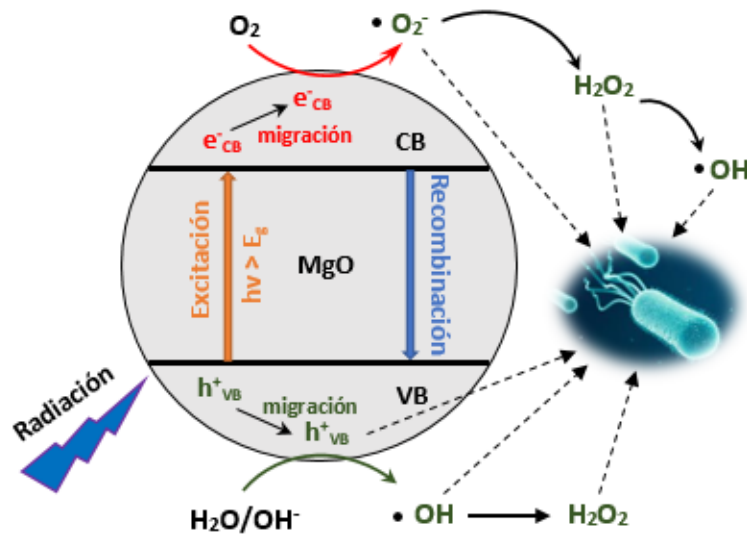
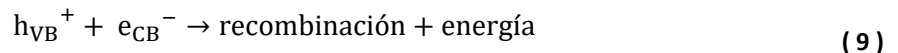


Figura 32 Mecanismo de fotocatalisis del MgO bajo radiación UV. Adaptado de (49).

El mecanismo de fotocatalisis está constituido por cuatro etapas (49),

Radiación: la energía se convierte en energía química llevando a la generación de pares e^- , h^+ .

Separación y recombinación de pares e^- , h^+ : los e^- fotoexcitados pasan a la banda de conducción (CB) dejando la separación pares e^- , h^+ (Ecuación (8)). Sin embargo, el e^- fotogenerado y h^+ pueden recombinarse rápidamente, liberando energía en forma de calor o protones (Ecuación (9)).



Los e^- y h^+ sin recombinar migran a la superficie del material y desencadenan reacciones fotoquímicas para producir especies reactivas secundarias (ROS) o directamente oxidar/reducir los sustratos adsorbidos por el material.

Reacciones h^+ : en la banda de valencia (VB), los h^+ migran a la superficie y son atrapados por los grupos OH, lo cual se conoce como un radical hidroxilo adsorbido superficialmente.

Reacciones e^- : en la banda de conducción, el O_2 actúa como aceptor de e^- para atrapar los e_{CB}^- y así prevenir la recombinación $e^- - h^+$. En este proceso se forma $\cdot\text{O}_2^-$ y se lleva a cabo una serie de reacciones para producir H_2O_2 .

Durante el proceso fotoquímico, los e^-/h^+ fotogenerados y la producción de ROS tales como $\cdot\text{O}_2^-$, $\cdot\text{OH}$ y H_2O_2 podrían ser los responsables en el aumento de la actividad antibacteriana (49).

4.3.2 Conclusiones parciales del efecto de la radiación ultravioleta en la susceptibilidad antibacteriana

Al no observarse efecto inhibitorio de HA en ambas bacterias, se corrobora que la actividad de los diferentes materiales se debe a la incorporación de los metales (Mg, Pt y Ag); sin embargo, la concentración de estos metales también es relevante.

En las NPs de HAAg hay una relación molar $Ag/(Ag + Ca)$ de 0.015 y en las NPs de HAPt una relación molar $Pt/(Pt + Ca)$ de 0.015; el resultado negativo observado en las NPs de HAPt frente a ambas bacterias, señala que la concentración de Pt no es suficiente para inhibir el crecimiento de las bacterias, es decir, no se alcanza la concentración mínima inhibitoria (CMI); caso contrario al de las NPs de HAAg.

Una relación molar de $Mg/(Mg + Ca)$ de 0.06 en HAMg, es una condición suficiente para inhibir el crecimiento en *S. Mutans*. Por el contrario, para alcanzar un efecto positivo en *E. Coli*, es necesario aumentar la concentración de Mg o la presencia de otro metal, como se observó en las NPs de HAMgPt.

Los resultados indican que dopar HAMg con Pt no se obtiene una mejor respuesta a la actividad antibacteriana al llevarse a cabo el proceso de fotocátalisis. Lo cual se contrapone a lo reportado en la literatura- el Pt es uno de los metales más activos para mejorar la fotocátalisis- ya que, el Pt facilita la captura de e^- , impidiendo la recombinación por $e^- - h^+$, mejorando la transferencia de h^+ y posibles e^- a O_2 adsorbido en la superficie del material, lo que aumentaría la actividad fotocatalítica del MgO y en consecuencia potenciaría sus propiedades antibacterianas; sin embargo, este comportamiento no fue observado bajo las condiciones propuestas en este trabajo. Esto resalta la importancia de evaluar el contenido óptimo de Pt o replantear las condiciones del proceso de radiación.

Conclusiones

El método solvotermal en presencia de diferentes proporciones de surfactante y cosurfactante permitió obtener polvos de HA/MgO/Pt con diferentes morfologías y características estructurales. Los análisis de DRX, FTIR y microscopía electrónica revelaron la influencia de este parámetro no sólo en la morfología de las nanopartículas sino también en la formación de fases de carbonato de calcio, óxido de magnesio y fosfato tricálcico.

A proporciones equivalentes de CTAB y PEG, así como mayor contenido de CTAB se presenta una inestabilidad en la estructura de la hidroxiapatita, lo cual se ve reflejado en la formación de fosfato tricálcico y disminución en la cristalinidad, respectivamente. Este comportamiento también es generado por la sustitución del ion plata, cuyo radio iónico es mayor al del calcio. No obstante, mayores cantidades de PEG conducen a la formación de una fase apatítica de alta cristalinidad, libre de fosfato tricálcico y óxido de magnesio.

Con esta investigación se corrobora la influencia que tiene la relación surfactante/ cosurfactante en el control de la morfología de sistemas bajo condiciones solvotermales. Igual cantidad de CTAB y PEG inducen a la formación de placas alargadas, concentraciones intermedias ocasionan reducción en el eje c y cambios variables en el parámetro a de la estructura apatítica, originando nanoestructuras alargadas con menor espesor. A elevado contenido de CTAB prima la morfología de barras y a altas concentraciones de PEG las nanopartículas tienden a ser más redondeadas.

De acuerdo a las pruebas antibacterianas, nanocompuestos de HAMgPt sintetizados a relaciones surfactante/cosurfactante de 3, 6 y 10 tienen un comportamiento de agente bacteriostático. Siendo mayor el efecto en la relación surfactante/cosurfactante de 6, zona de inhibición más grande, las nanopartículas a esta condición tienen una fase de HA altamente cristalina y morfología de placas principalmente.

La diferencia en la susceptibilidad antibacteriana entre nanopartículas de HAMg y HAMgAg, no es tan significativa, lo cual indica que HAMg podría ser un material más biocompatible, menos tóxico y con potenciales aplicaciones en la cavidad oral.

El efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano causado por las nanopartículas de HAAg, HAMg, HAMgPt y HAMgAg aumentó bajo condiciones de radiación ultravioleta. Empero, el comportamiento no difiere notablemente de los resultados obtenidos sin radiación, lo cual sugiere, que para efectos prácticos se evalué la necesidad de realizar o no la etapa de preactivación.

La incorporación de platino en la HA no causa efecto inhibitorio en *S. Mutans*, pero en *E. Coli* el efecto es positivo, debido a la acción en conjunto con el magnesio. Así, el nanocompuesto de

HAMgPt podría ser aplicado como agente antibacteriano contra infecciones causadas por esta bacteria gram negativa.

Bajo las condiciones establecidas en el proceso de síntesis de las nanopartículas, la presencia de hidroxiapatita carbonatada se debe al proceso de calcinación realizado a temperatura inferior a 1000°C. Este tipo de hidroxiapatita ha generado especial interés para aplicaciones en implantes óseos, puesto que la presencia de carbonatos afecta la solubilidad de la hidroxiapatita, característica que permitiría mejorar la velocidad de regeneración ósea tras la implantación.

Recomendaciones

Es necesario realizar pruebas posteriores que permitan estudiar la cinética de crecimiento bacteriano *in vitro*, uno de los procedimientos más utilizados es el método clásico basado en el recuento de unidades formadoras de colonia en placa. Esto con el fin de corroborar si el material es bactericida o sólo es bacteriostático; también permitiría comprender los mecanismos de acción de los nanocompuestos.

Evaluar la citotoxicidad de los nanocompuestos para obtener información acerca de su biocompatibilidad. Adicionar pruebas para determinar la producción de especies reactivas de oxígeno, por ejemplo, Resonancia de Espín Electrónico (RSE); solubilidad y propiedades de superficie de las nanopartículas sintetizadas.

Efectuar ensayos de susceptibilidad antibacteriana variando la concentración de platino en los nanocompuestos de HAPt con el fin de identificar la concentración mínima inhibitoria.

A. Anexo: Divulgación investigación

Resultados parciales de esta investigación se presentaron en:

The Society For Biomaterials 2017 Annual Meeting where materials become medicine, Minneapolis, Minnesota- April 5-8, 2017. Poster: Antibacterial properties of magnesium and platinum doped hydroxyapatite nanoparticles.

International Conference on Nano-materials, Functional and Composite Materials (ICNFCM 2017), Hong Kong, China. Paper Title: Synthesis of magnesium oxide-substituted hydroxyapatite nanoparticles as antibacterial nanomaterial for biomedical applications.

Bibliografía

1. Krishnamoorthy K, Manivannan G, Kim SJ, Jeyasubramanian K, Premanathan M. Antibacterial activity of MgO nanoparticles based on lipid peroxidation by oxygen vacancy. *J Nanoparticle*. 2012;14(9):1063.
2. World Health Organ. Antimicrobial resistance. 2014;61(3):383–94.
3. Cavalieri F, Tortora M, Stringaro a, Colone M, Baldassarri L. Nanomedicines for antimicrobial interventions. *J Hosp Infect*. 2014;88(4):183–90.
4. Sekhon BS, Kamboj SR. Inorganic nanomedicine--part 2. *Nanomedicine*. 2010;6(5):612–8.
5. Dizaj SM, Lotfipour F, Barzegar-Jalali M, Zarrintan MH, Adibkia K. Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014;44:278–84.
6. Schrand AM, Rahman MF, Hussain SM, Schlager JJ, Smith D a, Syed AF. Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2010;2(5):544–68.
7. Wang X, Wu HF, Kuang Q, Huang R Bin, Xie ZX, Zheng LS. Shape-dependent antibacterial activities of Ag₂O polyhedral particles. *Langmuir*. 2010;26(4):2774–8.
8. Talebian N, Amininezhad SM, Doudi M. Controllable synthesis of ZnO nanoparticles and their morphology-dependent antibacterial and optical properties. *J Photochem Photobiol B Biol*. 2013;120:66–73.
9. Laha D, Pramanik A, Laskar A, Jana M, Pramanik P, Karmakar P. Shape-dependent bactericidal activity of copper oxide nanoparticle mediated by DNA and membrane damage. *Mater Res Bull*. 2014;59:185–91.
10. Nathanael a. J, Lee JH, Mangalaraj D, Hong SI, Rhee YH. Multifunctional properties of hydroxyapatite/titania bio-nano-composites: bioactivity and antimicrobial studies. *Powder Technol*. 2012;228:410–5.
11. Mocanu A, Furtos G, Rapuntean S, Horovitz O, Flore C, Garbo C, et al. Synthesis; characterization and antimicrobial effects of composites based on multi-substituted hydroxyapatite and silver nanoparticles. *Appl Surf Sci*. 2014;298:225–35.
12. Alshemary AZ, Akram M, Goh YF, Tariq U, Butt FK, Abdolahi A, et al. Synthesis, characterization, in vitro bioactivity and antimicrobial activity of magnesium and nickel doped silicate hydroxyapatite. *Ceram Int*. 2015;41(9):11886–98.
13. Udhayakumar G, Muthukumarasamy N, Velauthapillai D, Santhosh SB. Magnesium incorporated hydroxyapatite nanoparticles : Preparation , characterization , antibacterial and larvicidal activity. *Arab J Chem*. 2016.
14. Ezhaveni S, Yuvakkumar R, Rajkumar M, Sundaram NM, Rajendran V. Preparation and Characterization of Nano-Hydroxyapatite Nanomaterials for Liver Cancer Cell Treatment. *J Nanosci Nanotechnol*. 2013;13(3):1631–8.
15. Xu JL, Khor KA, Sui JJ, Zhang JH, Chen WN. Protein expression profiles in osteoblasts in response to differentially shaped hydroxyapatite nanoparticles. *Biomaterials*. 2009;30(29):5385–91.
16. Robinson DA, Griffith RW, Shechtman D, Evans RB, Conzemius MG. In vitro antibacterial properties of magnesium metal against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Acta Biomater*. 2010;6(5):1869–77.
17. Kumari L, Li WZ, Vannoy CH, Leblanc RM, Wang DZ. Synthesis, characterization and optical properties of Mg(OH)₂ micro-/nanostructure and its conversion to MgO. *Ceram Int*.

- 2009;35(8):3355–64.
18. Akram M, Ahmed R, Shakir I, Ibrahim WAW, Hussain R. Extracting hydroxyapatite and its precursors from natural resources. *J Mater Sci*. 2014;49(4):1461–75.
 19. Dorozhkin S V. Calcium orthophosphates in nature, biology and medicine. *Materials (Basel)*. 2009;2(2):399–498.
 20. Lin K, Wu C, Chang J. Advances in synthesis of calcium phosphate crystals with controlled size and shape. *Acta Biomater*. 2014;10(10):4071–102.
 21. Boanini E, Gazzano M, Bigi a. Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature. *Acta Biomater*. 2010;6(6):1882–94.
 22. Šupová M. Substituted hydroxyapatites for biomedical applications: A review. *Ceram Int*. 2015;41(8):9203–31.
 23. Bertinetti L, Tampieri A, Landi E, Martra G, Coluccia S. Punctual investigation of surface sites of HA and magnesium-HA. *J Eur Ceram Soc*. 2006;26(6):987–91.
 24. Ren F, Leng Y, Xin R, Ge X. Synthesis, characterization and ab initio simulation of magnesium-substituted hydroxyapatite. *Acta Biomater*. 2010;6(7):2787–96.
 25. Hughes JM, Rakovan J. The Crystal Structure of Apatite, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{F},\text{OH},\text{Cl})$. *Rev Mineral Geochemistry*. 2002;48(1):1–12.
 26. Treccani L, Yvonne Klein T, Meder F, Pardun K, Rezwani K. Functionalized ceramics for biomedical, biotechnological and environmental applications. *Acta Biomater*. 2013;9(7):7115–50.
 27. Michael T Madigan, John M. Martinko PVD& D p. C. Brock *Biología de los microorganismos*. Duodécima edición. Pearson Educación S.A.2009.1296p
 28. Malarkodi C, Rajeshkumar S, Paulkumar K, Vanaja M, Gnanajobitha G, Annadurai G. Biosynthesis and Antimicrobial Activity of Semiconductor Nanoparticles against Oral Pathogens. *Bioinorg Chem Appl*. 2014;2014:347167.
 29. Seil JT, Webster TJ. Antimicrobial applications of nanotechnology: Methods and literature. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:2767–81.
 30. Cioffi N, Rai M. *Nano-Antimicrobials*. Springer Heidelberg Dordrecht London New York. 2012. 562 p.
 31. Zhao G, Stevens SE. Multiple parameters for the comprehensive evaluation of the susceptibility of *Escherichia coli* to the silver ion. *BioMetals*. 1998;11(1):27–32.
 32. Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park SJ, Lee HJ, et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med*. 2007;3(1):95–101.
 33. Pal S, Tak YK, Song JM, Chen X, Schluesener HJ. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 2008;176(1):1–12.
 34. Jin T, He Y. Antibacterial activities of magnesium oxide (MgO) nanoparticles against foodborne pathogens. *J Nanoparticle Res*. 2011;13(12):6877–85.
 35. Huang L, Li D-Q, Lin Y-J, Wei M, Evans DG, Duan X. Controllable preparation of Nano-MgO and investigation of its bactericidal properties. *J Inorg Biochem*. 2005;99(5):986–93.
 36. Zhu X, Wu D, Wang W, Tan F, Wong PK, Wang X, et al. Highly effective antibacterial activity and synergistic effect of Ag-MgO nanocomposite against *Escherichia coli*. *J Alloys Compd*. 2016.
 37. Vidic J, Stankic S, Haque F, Ciric D, Le Goffic R, Vidy A, et al. Selective antibacterial effects of mixed ZnMgO nanoparticles. *J Nanopart Res*. 2013;15(5):1595.
 38. Leung YH, Ng AMC, Xu X, Shen Z, Gethings LA, Wong MT, et al. Mechanisms of antibacterial activity of MgO: Non-ROS mediated toxicity of MgO nanoparticles towards *Escherichia coli*. *Small*. 2014;10(6):1171–83.

39. Rosenberg B, Renshaw E, Vancamp L, Hartwick J, Drobnik J. Platinum-induced filamentous growth in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1967;93(2):716–21.
40. Asharani P V, Xinyi N, Hande MP, Valiyaveetil S. DNA damage and p53-mediated growth arrest in human cells treated with platinum nanoparticles. *Nanomedicine.* 2010;5(1):51–64.
41. Managa M, Antunes E, Nyokong T. Conjugates of platinum nanoparticles with gallium tetra – (4-Carboxyphenyl) porphyrin and their use in photodynamic antimicrobial chemotherapy when in solution or embedded in electrospun fiber. *Polyhedron.* 2014;76:94–101.
42. López T, Figueras F, Manjarrez J, Bustos J, Alvarez M, Silvestre-Albero J, et al. Catalytic nanomedicine: a new field in antitumor treatment using supported platinum nanoparticles. *In vitro* DNA degradation and *in vivo* tests with C6 animal model on Wistar rats. *Eur J Med Chem.* 2010;45(5):1982–90.
43. Zielińska-Jurek A, Wei Z, Wysocka I, Szweda P, Kowalska E. The effect of nanoparticles size on photocatalytic and antimicrobial properties of Ag-Pt/TiO₂ photocatalysts. *Appl Surf Sci.* 2015;353:317–25.
44. Chen HW, Ku Y, Kuo YL. Effect of Pt/TiO₂ characteristics on temporal behavior of o-cresol decomposition by visible light-induced photocatalysis. *Water Res.* 2007;41(10):2069–78.
45. Gopi D, Shinyjoy E, Kavitha L. Synthesis and spectral characterization of silver/magnesium co-substituted hydroxyapatite for biomedical applications. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc.* 2014;127:286–91.
46. Hu C, Guo J, Qu J, Hu X. Efficient destruction of bacteria with Ti(IV) and antibacterial ions in co-substituted hydroxyapatite films. *Appl Catal B Environ.* 2007;73(3):345–53.
47. Lala S, Ghosh M, Das PK, Das D, Kar T, Pradhan SK. Magnesium substitution in carbonated hydroxyapatite: Structural and microstructural characterization by Rietveld's refinement. *Mater Chem Phys.* 2016;170:319–29.
48. Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, Bizios R. Hydroxylapatite with substituted magnesium, zinc, cadmium and yttrium . II . Mechanisms of osteoblast adhesion. 2001;0–5.
49. An T, Zhao H, Wong PK. *Advances in Photocatalytic Disinfection.* Springer-Verlag GmbH German; 2017. 315 p.
50. Yemmireddy VK, Hung Y-C. Using Photocatalyst Metal Oxides as Antimicrobial Surface Coatings to Ensure Food Safety-Opportunities and Challenges. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2017;0:1–15.
51. Sadat-Shojai M, Khorasani MT, Dinpanah-Khoshdargi E, Jamshidi A. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta Biomater.* 2013;9(8):7591–621.
52. Mallakpour S, Madani M. A review of current coupling agents for modification of metal oxide nanoparticles. *Prog Org Coatings.* 2015;86:194–207.
53. Byrappa K, Adschiri T. Hydrothermal technology for nanotechnology. *Prog Cryst Growth Charact Mater.* 2007;53(2):117–66.
54. Byrappa K, Yoshimura M. *Handbook of Hydrothermal Technology.* Noyes publications. 2001. 1-52 p.
55. Guang S, Ke F, Shen Y. Controlled Preparation and Formation Mechanism of Hydroxyapatite Nanoparticles under Different Hydrothermal Conditions. *J Mater Sci Technol.* 2015;31(8):852–6.
56. Lin K, Chang J, Cheng R, Ruan M. Hydrothermal microemulsion synthesis of stoichiometric single crystal hydroxyapatite nanorods with mono-dispersion and narrow-size distribution. *Mater Lett.* 2007;61(8–9):1683–7.
57. Liu J, Ye X, Wang H, Zhu M, Wang B, Yan H. The influence of pH and temperature on the morphology of hydroxyapatite synthesized by hydrothermal method. *Ceram Int.* 2003;29(6):629–33.

58. Sun Y, Guo G, Tao D, Wang Z. Reverse microemulsion-directed synthesis of hydroxyapatite nanoparticles under hydrothermal conditions. *J Phys Chem Solids*. 2007 Mar;68(3):373–7.
59. López-Quintela MA, Tojo C, Blanco MC, García Rio L, Leis JR. Microemulsion dynamics and reactions in microemulsions. *Curr Opin Colloid Interface Sci*. 2004;9(3–4):264–78.
60. Liu Y, Goebel J, Yin Y. Templated synthesis of nanostructured materials. *Chem Soc Rev*. 2013;42(7):2610–53.
61. Eastoe J, Hollamby MJ, Hudson L. Recent advances in nanoparticle synthesis with reversed micelles. *Adv Colloid Interface Sci*. 2006;128–130(2006):5–15.
62. Wang Y, Lai C, Wei K, Tang S. Influence of temperature, ripening time, and cosurfactant on solvothermal synthesis of calcium phosphate nanobelts. *Mater Lett*. 2005;59(8–9):1098–104.
63. García C, García C, Paucar C. Controlling morphology of hydroxyapatite nanoparticles through hydrothermal microemulsion chemical synthesis. *Inorg Chem Commun*. 2012;20(1):90–2.
64. Khan ST, Musarrat J, Al-Khedhairi AA. Countering drug resistance, infectious diseases, and sepsis using metal and metal oxides nanoparticles: Current status. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2016;146:70–83.
65. Clearfield A, Reibenspies J, Bhuvanesh N. Principles and Applications of Powder Diffraction. 2008. 400 p.
66. Waseda Y, Matsubara E, Shinoda K. X-Ray Diffraction Crystallography. New York: Springer Heidelberg Dordrecht London; 2011. 322 p.
67. Farzadi A, Solati-Hashjin M, Bakhshi F, Aminian A. Synthesis and characterization of hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate nanocomposites using microwave irradiation. *Ceram Int*. 2011;37(1):65–71.
68. Farzadi A, Bakhshi F, Solati-Hashjin M, Asadi-Eydivand M, Osman NAA. Magnesium incorporated hydroxyapatite: Synthesis and structural properties characterization. *Ceram Int*. 2014;40(4):6021–9.
69. Šupová M. Substituted hydroxyapatites for biomedical applications: A review. *Ceram Int*. 2015;41:9203–31.
70. Cossio MLT, Giesen LF, Araya G, Pérez-Cotapos MLS, Vergara RL, Manca M, et al. Química Chang. Mc.Graw Hill, décima edición. 2012. 81-87 p.
71. Kanzaki N, Onuma K, Treboux G, Tsutsumi S, Ito A. Inhibitory Effect of Magnesium and Zinc on Crystallization Kinetics of Hydroxyapatite (0001) Face. *Cell*. 2000;(1):4189–94.
72. Laurencin D, Almora-Barrios N, de Leeuw NH, Gervais C, Bonhomme C, Mauri F, et al. Magnesium incorporation into hydroxyapatite. *Biomaterials*. 2011;32(7):1826–37.
73. Bigi A, Falini G, Foresti E, Ripamonti A, Gazzano M, Roveri N. Magnesium influence on hydroxyapatite crystallization. *J Inorg Biochem*. 1993;49(1):69–78.
74. Stipniece L, Salma-Ancane K, Borodajenko N, Sokolova M, Jakovlevs D, Berzina-Cimdina L. Characterization of Mg-substituted hydroxyapatite synthesized by wet chemical method. *Ceram Int*. 2014;40(2):3261–7.
75. Kalita SJ, Bhatt H a. Nanocrystalline hydroxyapatite doped with magnesium and zinc: Synthesis and characterization. *Mater Sci Eng C*. 2007;27(4):837–48.
76. Gozalian A, Behnamghader A, Daliri M, Moshkforoush A. Synthesis and thermal behavior of Mg-doped calcium phosphate nanopowders via the sol gel method. *Sci Iran*. 2011;18(6):1614–22.
77. Xu L, Jiang L, Jiang L, Xiong C. Synthesis of Mg-substituted hydroxyapatite nanopowders: Effect of two different magnesium sources. *Mater Lett*. 2013;106(3):246–9.
78. Lijuan X, Liuyun J, Chengdong X, Lixin J. Effect of different synthesis conditions on the

- microstructure, crystallinity and solubility of Mg-substituted hydroxyapatite nanopowder. *Adv Powder Technol.* 2014;25(3):1142–6.
79. Kaufmann EN. *Materials Characterization.* 2003;1341.
 80. Elliott JC, Holcomb DW, Young RA. Infrared determination of the degree of substitution of hydroxyl by carbonate ions in human dental enamel. *Calcif Tissue Int.* 1985;37(4):372–5.
 81. Suchanek WL, Shuk P, Byrappa K, Riman RE, TenHuisen KS, Janas VF. Mechanochemical-hydrothermal synthesis of carbonated apatite powders at room temperature. *Biomaterials.* 2002;23(3):699–710.
 82. Salarian M, Solati-Hashjin M, Shafiei SS, Salarian R, Nemati ZA. Template-directed hydrothermal synthesis of dandelion-like hydroxyapatite in the presence of cetyltrimethylammonium bromide and polyethylene glycol. *Ceram Int.* 2009;35(7):2563–9.
 83. Dorozhkin S V. Nanosized and nanocrystalline calcium orthophosphates. *Acta Biomater.* 2010;6(3):715–34.
 84. Newbury D, Joy D, Lyman C, Echlin P, Lifshin E, Michae J, et al. *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis.* 2013.
 85. Liu Y, Hou D, Wang G. A simple wet chemical synthesis and characterization of hydroxyapatite nanorods. *Mater Chem Phys.* 2004;86(1):69–73.
 86. Rai M, Ingle AP, Birla S, Yadav A, Santos CA Dos. Strategic role of selected noble metal nanoparticles in medicine. *Crit Rev Microbiol.* 2015;0(0):1–24.
 87. Ai M, Du Z, Zhu S, Geng H, Zhang X, Cai Q, et al. Composite resin reinforced with silver nanoparticles-laden hydroxyapatite nanowires for dental application. *Dent Mater.* 2016;1–11.
 88. Sodagar A, Akhavan A, Hashemi E, Arab S, Pourhajibagher M, Sodagar K, et al. Evaluation of the antibacterial activity of a conventional orthodontic composite containing silver/hydroxyapatite nanoparticles. *Prog Orthod.* 2016;17(1):40.
 89. Yamada M, Foote M, Prow TW. Therapeutic gold, silver, and platinum nanoparticles. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2015;7(3):428–45.
 90. Abdelgawad AM, Hudson SM, Rojas OJ. Antimicrobial wound dressing nanofiber mats from multicomponent (chitosan/silver-NPs/polyvinyl alcohol) systems. *Carbohydr Polym.* 2014;100:166–78.
 91. Eid K, Eldesouky A, Fahmy A, Shahat A, Abdelaal R. Calcium Phosphate Scaffold Loaded with Platinum Nanoparticles for Bone Allograft. *Biomed Sci.* 2013;242–9.
 92. Gabor F. “Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery.” *Sci Pharm.* 2011;79(3):701–2.
 93. Velmurugan P, Anbalagan K, Manosathyadevan M, Lee K-J, Cho M, Lee S-M, et al. Green synthesis of silver and gold nanoparticles using *Zingiber officinale* root extract and antibacterial activity of silver nanoparticles against food pathogens. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2014;1935–43.
 94. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: Approved standard - Eleventh edition. Vol. 32. 2012. 1-58 p.