

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO



Escuela Superior de Apan

LICENCIATURA EN INGENIERIA EN NANOTECNOLOGIA

TESIS DE LICENCIATURA

ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA INCORPORACIÓN DE PLATA EN UNA MATRIZ DE HIDROXIAPATITA PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS

Para obtener el título de
Licenciada en Ingeniería en Nanotecnología

P R E S E N T A

Nancy Lizbeth Rodríguez Morales

No de cuenta: 354019

Directores:

Dr. Jaime Santoyo Salazar

Dr. Luis Alberto Hernández Hernández

Apan, Hgo., 21 de septiembre de 2022



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
Escuela Superior de Apan
Campus Apan

MTRA. OJUKY DEL ROCÍO ISLAS MALDONADO
DIRECTORA DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DE LA U.A.E.H.
P R E S E N T E.

Por este conducto le comunico que la Comisión Revisora asignada al trabajo de tesis de la alumna de la Licenciatura en Ingeniería en Nanotecnología **Nancy Lizbeth Rodríguez Morales**, con número de cuenta 354019, quien presenta el tema **"Análisis del efecto de la incorporación de plata en una matriz de hidroxiapatita para aplicaciones biomédicas"**, después de revisar la tesis y constituida como Jurado, ha autorizado la impresión de tesis, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del Jurado:

PRESIDENTE : DR. JAIME SANTOYO SALAZAR

SECRETARIO: DR. LUIS ALBERTO HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

PRIMER VOCAL: DR. ARTURO HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

SEGUNDO VOCAL: DR. TERESA ROMERO CORTES

TERCER VOCAL: DR. JOSÉ ALFREDO PESCADOR ROJAS

Sin otro particular, le reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.

ATENTAMENTE-
"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"
Apan, Hgo., a 21 de septiembre de 2022.

ING. MINERVA ROSALES GAYOSSO
DIRECTOR DE LA ESCUELA SUPERIOR DE APAN



Carretera Apan-Calpulalpan Km. 8,
Colonia Chimalpa Tlalayote, Apan, Hidalgo; C.P. 43900
Teléfono: 771 71 72000 ext. 5800, 5801
esap@uaeh.edu.mx

www.uaeh.edu.mx

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, agradezco a mi familia por apoyarme en cada paso de mi carrera, por acompañarme en mis desvelos y animarme a continuar a pesar de las adversidades. Nada de esto hubiera sido posible sin su comprensión y cariño, los amo inmensamente.

Agradezco también a mis profesores que fueron una parte importante en mi crecimiento no solo profesional, sino también como persona. Siempre estaré en deuda con ustedes, espero algún día poder retribuir una parte de ese apoyo que me dieron.

Mi agradecimiento también va dirigido a mis amigos, gracias a ustedes pude sobrevivir a la universidad, me cuidaron y animaron a superar parte de mis miedos. Atesorare su amistad toda la vida.

Y un agradecimiento especial a mi perrito, Akamaru; gracias por no hacer tantos destrozos cuando no pude sacarte a jugar por escribir esta tesis.

RESUMEN

El incremento del padecimiento de afecciones óseas durante los últimos años ha dejado en evidencia que en la mayoría de las cirugías ortopédicas que se realizan, tienen como principal motivo de fracaso el desarrollo de infecciones asociadas al sitio quirúrgico. Esto ha motivado el avance de diversas investigaciones, que tienen como principal propósito encontrar un biomaterial que sea capaz de minimizar o erradicar el riesgo de contraer una infección nosocomial durante una intervención quirúrgica, que ponga en riesgo la vida del paciente y/o la aceptación del dispositivo o implante colocado. En este trabajo, se analizaron e identificaron los parámetros que se sugiere potencializan las propiedades biocidas, de biocompatibilidad y durabilidad de la Ag y de la HAp, mediante la revisión de diferentes literaturas para estudiar y comprender más a fondo sus propiedades, tanto de forma individual como en conjunto. Este estudio evidenció que es posible su uso en dispositivos o implantes ortopédicos, por lo que se propone el diseño de un prototipo (recubrimiento), capaz de explotar las propiedades en conjunto de la HAp y la Ag (como nanopartículas). Esto a fin de otorgarle características y propiedades mejoradas que garanticen un mayor porcentaje de aceptación del implante por parte del paciente y, a su vez, proporcione una mayor eficacia en la erradicación y prevención de infecciones nosocomiales.

ABSTRACT

In recent years in most of the orthopedic surgeries performed evidenced an increase of suffering bone conditions, being the main reason for failure the development of infections related to the surgical site. This has motivated the research development, whose main purpose is to find a biomaterial capable of minimizing or eradicating the risk of contracting a nosocomial infection during a surgical intervention, which puts the life of the patient and/or the acceptance of the device or implant in risk. In this work, has been identified and analyzed the parameters that potentiate the biocidal, biocompatibility and durability properties of Ag and HAp, by reviewing different literatures to study and understand their properties, both individually as together. This study also evidenced that its use in fabrication of orthopedic devices or implants is possible, that allows to propose the design of a prototype (coating), capable of exploiting the properties of HAp and Ag (as nanoparticles) together. This in order to improved its characteristics and properties that guarantee a higher percentage of acceptance of the implant by the patient, besides a greater efficiency in the eradication and prevention of nosocomial infections.

ÍNDICE

CONTENIDO

Dedicatoria
Resumen
Índice
Lista de Figuras
Lista de Tablas
Glosario
Motivación
Justificación
Objetivos
Hipótesis

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN

I.A	Estado del Arte	2
I.B	Hidroxiapatita	4
I.B.1	Propiedades Biomédicas	5
I.C	Nanopartículas de Plata	6
I.C.1	Propiedades Biomédicas	7
I.C.2	“Targets” sobre los que actúa	10
I.C.3	Efecto sobre las células bacterianas	13
I.D	Hidroxiapatita impurificada con Plata	18
I.D.1	Sustitución de plata en la red de hidroxiapatita	20
I.D.2	Mecanismos de acción bactericida y bacteriostático	20

CAPITULO II – SINTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES

II.A	Técnicas de Síntesis	23
II.A.1	Preparación de polvos de HAp-AgNPs	23
II.A.2	Métodos de recubrimiento	27
II.B	Técnicas de Caracterización	31
II.B.1	Difracción de Rayos X	31
II.B.2	Espectroscopia de transmisión de infrarrojo (IR)	34
II.B.3	Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	36
II.B.4	Microscopia infrarroja con transformada de Fourier	38
II.B.5	Espectroscopia Raman	39
II.B.6	Antibiograma	41
II.B.7	Prueba de concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima bactericida (MBC)	43
II.B.8	Viabilidad bacteriana LIVE / DEAD BacLight-Espectroscopia	45

CAPITULO III – FABRICACIÓN DEL “DISPOSITIVO ORTOPÉDICO”

III.A	Diseño del dispositivo ortopédico	50
III.A.1	Capa bioactiva (Recubrimiento)	51
III.A.2	AgNPs con elevada actividad biocida y baja citotoxicidad	58
III.A.3	Recubrimiento multicapa para una prótesis ortopédica con la incorporación de plata en una matriz de hidroxiapatita.	60
III.B	Sistema de fabricación del dispositivo ortopédico	61
III.B.1	Parámetros de crecimiento del sistema	62
III.B.2	Crecimiento del recubrimiento	66
III.C	Recubrimientos ortopédicos basados en HAp y AgNPs	71

CAPITULO IV – CONCLUSIONES

IV.A	Conclusiones generales	78
IV.B	Trabajo Futuro	79

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1 Estructura cristalina de la hidroxiapatita. (A) Vista superior y (B) vista lateral, respecto del eje c.
- Fig. 2 Proceso de síntesis de nanopartículas de plata.
- Fig. 3 Mecanismos de acción biocida de las AgNPs sobre las bacterias Gram positivas.
- Fig. 4 Mecanismos de acción biocida de las AgNPs sobre las bacterias Gram negativas.
- Fig. 5 Proceso de eliminación de radicales libres de la célula bajo condiciones normales y en presencia de AgNPs y Ag⁺.
- Fig. 6 En el esquema a) se muestra la capacidad bactericida que poseen las bacterias, que han muerto por el efecto de las AgNPs, para liberar iones al medio y en el b) se aprecia como los Ag⁺, aún después de matar a la bacteria, continúan actuando contra otras bacterias viables, lo que da origen a una actividad biocida prolongada por parte de los Ag⁺.
- Fig. 7 Pasos secuenciales de la formación del biofilm en una superficie de un biomaterial. a) Formación de una película condicionante, b) Adhesión reversible, c) Adhesión irreversible, d) Producción de EPS (sustancias poliméricas extracelulares) y quórum sensing (mecanismo de comunicación bacteriana), e) Maduración del biofilm y muerte de algunas células bacterianas que carecen del acceso a nutrientes y oxígeno, f) Desprendimiento de bacterias para colonizar otras superficies.
- Fig. 8 Diagrama del funcionamiento de un equipo sputtering.
- Fig. 9 Representación de los fenómenos de difracción de un haz de rayos X sobre la materia.
- Fig. 10 Diagrama del funcionamiento de un difractor de rayos X.
- Fig. 11 Diagrama de un espectroscopio de transmisión infrarrojo.
- Fig. 12 Diagrama de un microscopio electrónico de transmisión.
- Fig. 13 Diagrama del fundamento del funcionamiento de la espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier.
- Fig. 14 Mecanismo de liberación de energía en el fenómeno Raman
- Fig. 15 Diagrama de un equipo Raman.
- Fig. 16 Esquema de los pasos a seguir para la realización de un antibiograma.
- Fig. 17 Pasos para realizar un análisis MIC y MBC.
- Fig. 18 Proceso para realizar un MIC y un MBC.
- Fig. 19 Ejemplificación de cómo interactúan los colorantes de tinción con la membrana bacteriana.
- Fig. 20 Etapas del proceso de osteointegración: 1) Respuesta inflamatoria, 2) Osteoinducción, 3) Osteointegración y 4) Osteoconducción.
- Fig. 21 Recubrimiento multicapa de HAp con AgNPs para prótesis ortopédicas.
- Fig. 22 Sistema de co-sputtering con RF para la síntesis del recubrimiento de HAp con AgNPs.
- Fig. 23 Clasificación de las diferentes regiones interfaciales.
- Fig. 24 Modelo de la estructura de zona en el depósito de material por la técnica de sputtering, adaptado por Thornton.
- Fig. 25 Imágenes BSE-SEM de recubrimientos HAp/AgNP. Las imágenes superiores muestran la superficie del recubrimiento y se pueden identificar la incorporación de partículas de plata, en tanto que, en la parte inferior se muestra una sección transversal del dispositivo permitiendo medir el espesor del recubrimiento.⁶⁰

- Fig. 26 Imagen SE-SEM del recubrimiento de hidroxiapatita sustituido con plata (Ag-HAp), rociado con plasma. Se observan crecimientos irregulares compactos del biocerámico además de que se muestra una sección magnificada del recubrimiento en el que se identifican crecimientos de plata.⁶¹
- Fig. 27 Imagen SEM del recubrimiento tipo Ag-HAp. Se puede observar un crecimiento de varillas de HAp, con orientación vertical preferencial, en cuya superficie se depositan AgNPs.⁶²
- Fig. 28 Imágenes TEM de híbridos HAp–Ag, en las que se identifica el decorado de la superficie de la matriz HAp con nanopartículas de Ag.⁶⁴
- Fig. 29 Imágenes BSE-SEM de los recubrimientos de HAp-AgNP, sintetizados por inmersión de polvo de HAp en soluciones de AgNPs. La densidad de nanopartículas de plata aumenta en dependencia de la proporción de masa de plata en las soluciones.⁶⁴

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1 Comparación de la composición del hueso esquelético y la HAp sintética, reportada por Dorozhkin y Epple.
- Tabla 2 Parámetros que regulan las propiedades de las AgNPs.
- Tabla 3 Propiedades de las AgNPs que les permiten evadir los mecanismos biológicos implicados en el desarrollo de la resistencia a los antimicrobianos.
- Tabla 4 Diferencias estructurales entre las bacterias Gram positivas y Gram negativas.
- Tabla 5 Efecto del mecanismo de acción de los agentes (AgNPs y Ag⁺) sobre las células bacterianas.
- Tabla 6 Clasificación de los mecanismos de acción de las AgNPs y de los Ag⁺ de acuerdo con el daño provocado en la bacteria.
- Tabla 7 Propiedades de HAp-AgNPs sintetizada mediante precipitación sonoquímica.
- Tabla 8 Evaluación de la actividad bactericida, bacteriostática y citotoxicidad del compuesto HAp-AgNPs sintetizada mediante precipitación sonoquímica.
- Tabla 9 Propiedades de HAp-AgNPs sintetizada mediante coprecipitación.
- Tabla 10 Evaluación de la actividad bactericida, bacteriostática y citotoxicidad de HAp-AgNPs sintetizada mediante coprecipitación.
- Tabla 11 Propiedades de recubrimiento de HAp-AgNPs sintetizados mediante pulverización de plasma.
- Tabla 12 Interpretación del halo de inhibición del antibiograma.
- Tabla 13 Importancia de la rugosidad en el diseño de los recubrimientos para implantes.
- Tabla 14 Rango de espesores para recubrimientos utilizados en distintas prótesis.
- Tabla 15 Influencia de los recubrimientos de HAp, con cristalinidades de 50% y 75%, en la fijación de los implantes. Estudio realizado por S. Overgaard et al.
- Tabla 16 Propiedades otorgadas a los biomateriales según su grado de porosidad.
- Tabla 17 Propiedades conferidas a biomateriales con diferentes tamaños de poro.
- Tabla 18 Composición de las distintas capas de un recubrimiento de HAp.
- Tabla 19 Propiedades antibacterianas de las AgNPs con dependencia del tamaño.
- Tabla 20 Parámetros generales del recubrimiento propuesto.
- Tabla 21 Especificaciones y propiedades de cada capa que compone el recubrimiento.
- Tabla 22 Generalidades del recubrimiento fabricado por *Lozoya D.A. et al.*⁶⁰
- Tabla 23 Generalidades del recubrimiento fabricado por *Lyasnikova D.A. et al.*⁶¹
- Tabla 24 Generalidades del recubrimiento fabricado por *Xuefei Z. et al.*⁶²
- Tabla 25 Generalidades del recubrimiento fabricado por *Nirmala R. et al.*⁶³
- Tabla 26 Generalidades del recubrimiento fabricado por *Andrade F.A.C. et al.*⁶⁴

GLOSARIO

HAp – Hidroxiapatita, $\text{Ca}(\text{PO}_4)_6(\text{HO})_2$

Ag – Plata

AgNPs – Nanopartículas de plata

SARM – Staphylococcus aureus resistente a meticilina

Ssp – Se refiere al plural *sp* (especie), por lo tanto, quiere decir especies.

Osteoconducción – Capacidad de un biomaterial para proporcionar las condiciones adecuadas que permitan el crecimiento interno de los elementos osteogénicos procedentes de la zona.

Osteoinducción – Capacidad que le permite a un biomaterial estimular las células madre adultas no diferenciadas provenientes de un injerto.

Biofilm bacteriano – Colonia estructurada de células bacterianas, adherida a una superficie, que se encuentra incrustada en una matriz polimérica fabricada por ellas mismas, compuesta de ADN, proteínas y polisacáridos

Efecto bacteriostático – Efecto en el cual a la bacteria no se le produce la muerte, pero se le impide su reproducción.

Efecto bactericida – Capacidad de producir la muerte a una bacteria.

MOTIVACIÓN

El tejido óseo del cuerpo posee capacidades regenerativas y de autoreparación.¹ Sin embargo, pueden existir una serie de factores que restringen estos procesos, entre los que se encuentran la edad, enfermedades genéticas o del tejido óseo, malformaciones² y pérdidas óseas asociadas a defectos de tamaño crítico, que pueden surgir de accidentes, traumatismos o enfermedades.³ Como consecuencia de estas afecciones, el uso de dispositivos/implantes ortopédicos (prótesis y materiales de osteosíntesis), para el reemplazo total o parcial de la estructura ósea y su estabilización, se ha vuelto más común en los últimos años. El hecho de que los implantes se encuentren localizados dentro del organismo, implica que el material del que están hechos debe cumplir ciertas características de biocompatibilidad, no citotoxicidad, osteoconducción y durabilidad. Por lo antes mencionado es que se ha investigado una amplia gama de materiales con aplicaciones biomédicas, existe un material en particular que ha sido ampliamente estudiado por tener estas propiedades, se trata de la hidroxiapatita sintética (HAp). Este cerámico biocompatible se asemeja en composición, a la apatita o hidroxiapatita no estequiométrica, la cual representa el componente inorgánico fundamental de los huesos, del esmalte dental y de diversas estructuras óseas. Es capaz de desencadenar tanto el proceso de osteoconducción como de Osteoinducción,¹ además se puede sintetizar a partir de precursores químicos mediante distintos métodos.

Si bien, este material aparentemente cumple con los criterios necesarios para su utilización, se debe tomar en cuenta que los implantes requieren de una intervención quirúrgica para su aplicación. Esto, en muchos casos, representa un riesgo para la salud de los pacientes, ya que si no se tienen las debidas medidas de sanidad podrían desarrollar una infección nosocomial. Estas infecciones son muy comunes y en su mayoría se presentan durante el periodo quirúrgico, pero existe también un riesgo latente durante el periodo de recuperación postoperatorio y en general son asociadas a bacteriemias causadas por microorganismos *Gram positivos* (Gram +) que son parte de la flora microbiana normal de la piel, entre los que se destacan

Staphylococcus coagulasa-negativa (SCN), *Staphylococcus aureus* y *Enterococos*. No obstante, también se pueden desarrollar por microorganismos *Gram negativos* (Gram -) como *Pseudomona aeruginosa*, *Entrobacter spp.* y la *Klebsiella spp.*

El problema de las infecciones nosocomiales ha impulsado la búsqueda y el desarrollo de materiales de HAp con nanomateriales que eviten o reduzcan el riesgo de infecciones. La nanotecnología permite dotar a los materiales de propiedades deseables para los implantes, como son los efectos bactericidas y bacteriostáticos, con la finalidad de evitar la proliferación de bacterias en el implante, previniendo así, una infección que ponga en riesgo la salud o la vida del paciente. En este sentido, se da especial atención a las nanopartículas de plata (AgNPs), un tipo de nanomaterial que es reconocido por exhibir esta importante propiedad, y por lo tanto será el objeto de estudio junto con la HAp.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las afecciones óseas han ido en aumento en los últimos años y en muchos de los casos el tratamiento viene acompañado de intervenciones quirúrgicas, que si bien, no suelen ser procedimientos invasivos y se toman medidas que eviten la infección en la zona manipulada, en ocasiones las medidas de sanidad no son suficientes. Estos procedimientos quirúrgicos básicamente se tratan de la implantación de un cuerpo extraño y ajeno en el cuerpo humano, por lo que el material con el que se encuentre fabricado debe ser biocompatible, con nula o baja citotoxicidad, bioactivo y resistente, no obstante, estas propiedades no previenen las infecciones bacterianas.

Existe un estimado anual de entre 6,000-20,000 infecciones de sitio quirúrgico asociado a remplazo de cadera y rodilla únicamente, así como un estimado comprendido entre 31,000-35,000 pacientes que desarrollan infecciones asociadas al sitio quirúrgico después de cualquier cirugía ortopédica.⁴

Las denominadas infecciones asociadas a dispositivos ortopédicos (IADO), son frecuentemente monobacterianas, siendo *Staphylococcus* el género más frecuentemente, mientras que en los aislamientos polimicrobianos se han identificado las especies SCN y *Streptococcus*.⁵

JUSTIFICACIÓN

Las infecciones nosocomiales por dispositivos/implantes ortopédicos (prótesis y materiales de osteosíntesis), representan un riesgo latente en las intervenciones quirúrgicas. Por ello, es necesaria la implementación de materiales basados en nuevas tecnologías que permitan prevenir o minimizar los efectos adversos de un cuadro infeccioso. La nanotecnología ofrece un gran esquema de aplicaciones médicas para nuevos materiales, que pueden ser dotados de propiedades específicas, como biocompatibilidad, baja o nula citotoxicidad y con actividad antimicrobiana.

A menudo, los materiales usados para estos fines son una combinación de dos o más que en conjunto generan una mejora significativa en sus propiedades. Un ejemplo de estos materiales compuestos se basa en la hidroxiapatita y la plata, por sí solos ambos materiales son de interés biomédico, sin embargo, en conjunto como hidroxiapatita impurificada con plata, generan una mejora en su eficiencia biocida, biocompatibilidad con el medio en el que se encuentran y un efecto persistente que minimizará el riesgo de infección a largo plazo.

OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar las diferentes propiedades, métodos de síntesis y aplicaciones potenciales de la hidroxiapatita impurificada con plata para el desarrollo de dispositivos o implantes ortopédicos orientados a la osteosíntesis y fabricación de prótesis.

Comprobar la importancia de la incorporación de plata en la matriz de hidroxiapatita para otorgar mecanismos bactericidas y bacteriostáticos al material.

Objetivos específicos

Analizar las propiedades que hacen de la hidroxiapatita impurificada con nanopartículas de plata un material ideal para prevenir las infecciones nosocomiales asociadas a implantes óseos.

Identificar los parámetros de crecimiento en la síntesis del material, que permiten controlar las propiedades que otorgan cualidades de biocompatibilidad y no citotoxicidad.

Proponer un prototipo conceptual de dispositivo ortopédico, basado en una matriz de hidroxiapatita impurificada con plata que posea propiedades antimicrobianas.

HIPÓTESIS

Se sugiere que la síntesis de un recubrimiento basado en nanopartículas de plata incorporadas a una matriz de hidroxiapatita disminuirá la incompatibilidad de los dispositivos o implantes ortopédicos, además de minimizar el riesgo de que se desarrolle una infección nosocomial e incrementar su efectividad a largo plazo. Esto debido a la capacidad de la hidroxiapatita sintética, para imitar y reemplazar los huesos esqueléticos, así como de las propiedades antibacterianas de las nanopartículas de plata.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

I.A ESTADO DEL ARTE

La síntesis de biomateriales tiene como propósito el desarrollo de materiales que tengan aplicaciones biomédicas con fines de diagnóstico y detección, así como para uso terapéutico y farmacéutico. Este campo es ampliamente estudiado y, a pesar de tener múltiples orientaciones todos los biomateriales deben de cumplir con características de biocompatibilidad y biofuncionalidad.

La biocompatibilidad puede definirse como la propiedad de un biomaterial para desencadenar en el huésped una reacción biológica buscada, sin reacción tóxica y sin efecto desfavorable sobre el organismo receptor.

La biofuncionalidad se refiere al correcto desempeño de las funciones que el dispositivo implantado debe suplir en el huésped.⁶

En el presente trabajo, la síntesis de biomateriales se orienta a aplicaciones terapéuticas, es decir, aquellas asociadas al diseño de dispositivos/implantes ortopédicos compuestos por prótesis y materiales de osteosíntesis, que generalmente requieren intervenciones quirúrgicas. Por ello se debe considerar la particularidad del sitio receptor en función de la reacción tisular secundaria a la implantación, en todos los casos existe un traumatismo producido por la implantación del material y una reacción local al procedimiento.⁶

Como se ha mencionado, los biomateriales deben satisfacer los requisitos tanto de biocompatibilidad como de biofuncionalidad, lo que los vuelve un gran reto en cuanto a su fabricación. Sin embargo, hoy en día existen ciencias que han hecho posible la implementación de nuevas tecnologías con propósitos médicos, y una de ellas es la nanotecnología, que ha traído herramientas innovadoras para la manipulación de los materiales a escalas nanométricas. Para fines de este trabajo, la atención se centra en el uso de nanopartículas, específicamente aquellas basadas en plata (Ag). Una vez que se dio a conocer que las nanopartículas de

plata (AgNPs) tenían propiedades bactericidas comenzaron a surgir diversos estudios que exponían sus múltiples aplicaciones y muchos de estos las proponían como recubrimiento en materiales. En este caso, se pone especial interés en la impurificación de la HAp con la finalidad de lograr un material con propiedades bactericidas para dispositivos/implantes ortopédicos. Para ello se ha realizado un análisis de las principales problemáticas y soluciones para su aplicación:

- Un estudio realizado por *C. Ciobanu et al.*⁷ indica que la actividad antibacteriana incrementa con el aumento de la concentración de la plata en la red de HAp, lo que nos sugiere que deben existir concentraciones específicas de Ag a las que se pueda tener la máxima eficacia como agente bactericida. Sin embargo, *D. Gopi et al.*⁸ determinó que a medida que aumenta la concentración de Ag la viabilidad celular disminuye, es decir, existe una reducción en la proporción de células vivas y funcionales presentes en la población celular. A causa de ello se debe encontrar un equilibrio entre la concentración ideal de plata logrando que cumpla con las propiedades antimicrobianas y, al mismo tiempo conserve la viabilidad celular ósea.
- Otro punto de interés en la síntesis de la HAp es poder elegir el mejor método de preparación que nos permita establecer parámetros de control específicos. Existen una gran variedad de métodos, pero *S. Türk et al.*⁹ utilizó el método de microondas (MW) para la obtención de HAp, logrando controlar las fases cristalinas, la cristalinidad y el tamaño. Este proceso es relativamente sencillo y el montaje experimental se puede realizar con un bajo costo.

I.B HIDROXIAPATITA

La hidroxiapatita (HAp), es un componente mineral inorgánico importante de los huesos y el esmalte dental, por lo que conforma el 99% del calcio presente en nuestro cuerpo.³ Es un sólido cristalino con la fórmula molecular $\text{Ca}(\text{PO}_4)_6(\text{HO})_2$, perteneciente al grupo de los fosfatos de calcio.¹⁰

Tiene una estructura cristalina hexagonal y pertenece al grupo de simetría $P6_3/m$, con parámetros de red $a=b=9.432 \text{ \AA}$ y $c=6.88 \text{ \AA}$.^{10,11} Hay cuatro iones de calcio por celda unitaria, llamados Ca (I) (*Fig. 1*), los que se localizan en columnas paralelas al eje c y están rodeados por nueve átomos de oxígeno. Además, tiene otros iones de calcio, seis por unidad de celda, llamados Ca (II), que forman dos triángulos equiláteros a lo largo del eje c en $z = 1/4$ y $3/4$, que generan los denominados canales de aniones, que generalmente está ocupado por dos aniones monovalentes (más comúnmente OH^- , F^- , Cl^-) pero en algunos casos por CO_3^{2-} bivalente por celda unitaria. El gran tamaño del triángulo Ca (II) permite el movimiento del anión a lo largo del eje de la columna. La estructura se completa con seis aniones PO_4^{3-} , donde cada átomo de P está coordinado con cuatro átomos de oxígeno.¹⁰

Posee un punto de fusión mayor a 1500°C debido a sus fuertes interacciones electrostáticas, es insoluble en agua como consecuencia de la presencia de iones fosfato y tiene una densidad de entre $3.05 - 3.15 \text{ g/cm}^3$. La hidroxiapatita sintética puede ser sintetizada a partir de precursores químicos, y es comúnmente usada como un cerámico biocompatible por sus características de no toxicidad, estabilidad química y bioactividad, especialmente para la fabricación de implantes en sustitución de tejido óseo.¹²

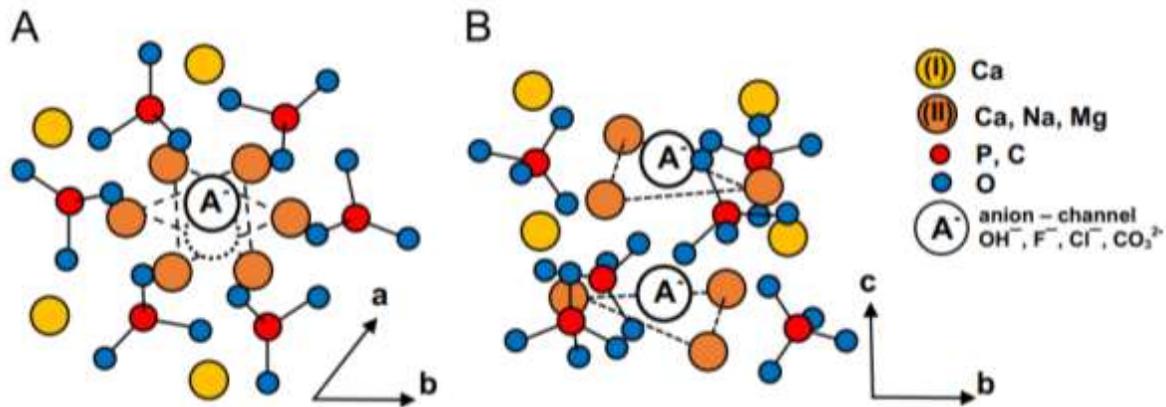


Fig. 1 Estructura cristalina de la hidroxiapatita. (A) Vista superior y (B) vista lateral, respecto del eje c.¹²

I.B.1 Propiedades biomédicas

Se considera como un biomaterial ortopédico debido a su alta biocompatibilidad, osteoinductividad y osteoconductividad,^{1,13,14} por lo que, los compuestos que se sintetizan a partir de HAp sintético son capaces de imitar y reemplazar hueso esquelético.¹⁵ La composición química de la apatita del hueso varía con respecto a la HAp acorde con lo que se observa en la [Tabla 1](#).

Tabla 1 Comparación de la composición del hueso esquelético y la HA sintética, reportada por Dorozhkin y Epple.¹⁶

	Composición porcentual del hueso (apatita o HA no estequiometrica)	Composición porcentual de HA estequiometrica (sintética)
Calcio (Ca)	34.8	39.6
Fosforo (P)	15.2	18.5
Carbonato (CO ₃)	0.9	
Sodio (Na)	0.72	
Magnesio (Mg)	0.72	
Cloro (Cl)	0.13	
Fluor (F)	0.03	
Potasio (K)	0.03	
Ca/P (relación molar)	1.71	1.67

La HAp no estequiometrica es deficiente en calcio (Ca) y fosforo (P), contrario a la HAp sintética que muestra una relación mayor entre Ca/P, lo que resulta ser

beneficiosa en el proceso de regeneración ósea.¹⁷ La HAp tiene varios sitios cristalográficos distintos en los que pueden ocurrir intercambios atómicos¹⁰, esto le facilita el dopaje atómico o sustitución iónica, lo que es importante para aplicaciones biomédicas; ya sea para reparar o reemplazar partes dañadas en el sistema esquelético, como agente administrador de fármacos o genes, como recubrimiento bioactivo en implantes metálicos, en partículas diamagnéticas y en marcadores fluorescentes.^{10,11}

Por otro lado, se puede hacer notar que la HAp sintética puede ser sintetizada en condiciones controladas con propiedades estructurales predecibles y reproducibles, aunado a un alto control de las impurezas.¹⁰

I.C NANOPARTICULAS DE PLATA

Las nanopartículas de plata (AgNPs) son estructuras de tamaño nanométrico pertenecientes al grupo de materiales 0-dimensionales y que poseen propiedades distintas a la plata en bulto, a pesar de estar compuestos del mismo tipo de átomos. Sus diferentes propiedades provienen de la relación área superficial/volumen de la nanopartícula, es decir; a medida que disminuye su diámetro aumentará su área superficial, y son ampliamente estudiadas en el campo óptico para la detección de especies químicas (orgánicas e inorgánicas) y biológicas. En cuanto al campo biomédico son de especial interés sus propiedades bactericidas y bacteriostáticas.¹⁸

La síntesis de las nanopartículas de plata mediante el método de reducción química, toma al nitrato de plata como material precursor que reaccionara con un agente reductor y un estabilizante (**Fig. 2**). En este método de síntesis, la sal metálica de AgNO_3 es reducida en átomos cerivalentes que sirven como centros de nucleación para la formación de clústers. El crecimiento de los clústers continuará, a medida que continúen agregándose átomos de Ag, lo que dará lugar a la formación de nanopartículas de mayor tamaño y formas poliédricas más complejas. El agente estabilizante es muy importante en la síntesis de las nanopartículas, ya que, es necesario estabilizarlas para detener su crecimiento, esto se logra mediante un

recubrimiento (generalmente polimérico) que se absorbe rápidamente en la superficie de la nanopartícula inhibiendo así el proceso de aglomeración, y por ende su crecimiento.¹⁹

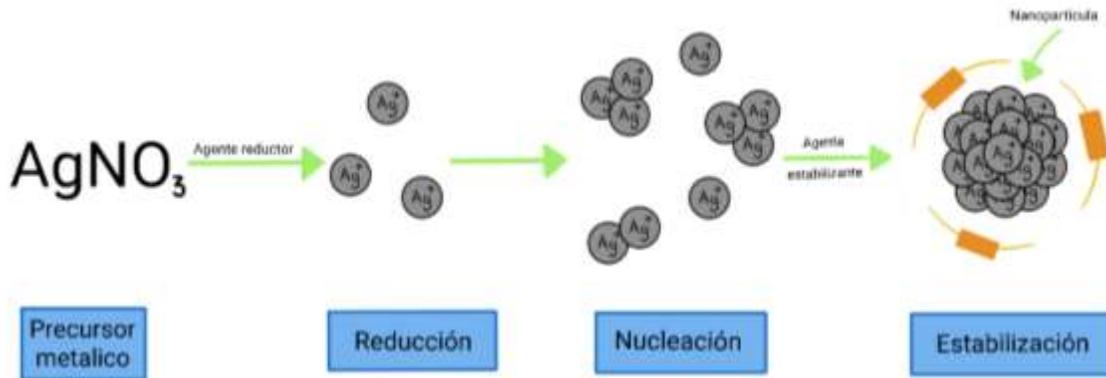


Fig. 2 Proceso de síntesis de nanopartículas de plata

Mediante la disolución oxidativa de las nanopartículas de plata se obtiene la liberación de iones de plata, estos son partículas cargadas eléctricamente por el fenómeno de ionización de un átomo o molécula, donde existe una pérdida o ganancia de electrones. En el caso de los iones de plata, al ser partículas que han perdido un electrón de su orbital externo, son denominados cationes, es decir; tienen una carga eléctricamente positiva (Ag^+).

I.C.1 Propiedades biomédicas

Las nanopartículas de plata tienen aplicaciones biomédicas debido a sus propiedades bactericidas y bacteriostáticas, lo que las hace intensivamente activas contra las infecciones atribuidas al MRSA (del inglés *methicillin-resistant staphylococcus aureus*).¹⁴ Estas propiedades están reguladas por una serie de parámetros importantes que permiten aumentar su eficacia, y establecer el estado en el que se encontrarán, ya sea como partículas aisladas, agregadas o disueltas en el medio biológico como se indica en la **Tabla 2**.

Tabla 2 Parámetros que regulan las propiedades de las AgNPs

Parámetro	Propiedad concedida	Importancia
-----------	---------------------	-------------

<i>Tamaño</i>	<10nm	Mayor relación de área superficial a volumen en comparación con las nanopartículas de mayor tamaño y la plata en masa. ²⁰ Mayor disolución de las AgNPs. ²¹	Contacto entre célula bacteriana y partícula más eficiente. ²⁰ Mayor concentración de iones de plata liberados Ag ⁺ . ²¹
<i>Potencial Z</i>	> 0	Mayor interacción con las membranas celulares de las bacterias. ²⁰	Mejor capacidad para penetrar la membrana celular de las bacterias. ²⁰
<i>pH del medio</i>	pH < 7 (Medio circundante ácido)	Mayor velocidad de disolución de las AgNPs. ²²	Las AgNPs liberan iones de Ag ⁺ más rápido. ²²
<i>Medio biológico</i>	Oxigenado	Mayor disolución oxidativa de las AgNPs. ²³	Liberación de iones Ag ⁺ . ²³

Las nanopartículas de plata cuentan con propiedades que pueden mejorar la eficiencia antimicrobiana (*Tabla 3*), en comparación con los fármacos aplicados convencionalmente para tratar las infecciones bacterianas en dispositivos/implantes ortopédicos. Estas propiedades le permiten a las AgNPs evadir los mecanismos de resistencia a los antimicrobianos que han adquirido algunos microorganismos.

Tabla 3 Propiedades de las AgNPs que les permiten evadir los mecanismos biológicos implicados en el desarrollo de la resistencia a los antimicrobianos.

<i>Mecanismo de resistencia antimicrobiano</i>	<i>Efecto</i>	<i>Propiedad de las AgNPs para evadir el mecanismo de resistencia antimicrobiano</i>
<i>Componentes de la estructura bacteriana (glucocáliz, pared celular o membrana plásmatica)</i>	Previene la penetración y entrada del fármaco en el interior de la célula. ²³	Gran superficie de contacto que permite una mayor adherencia a la membrana celular y de esta forma penetrar fácilmente en las bacterias. ²¹
<i>Bombas de eflujo (proteínas transportadoras inespecíficas)</i>	Expulsión del fármaco de la célula. ²³	Iones disueltos de las AgNPs: entran en gran cantidad en la célula bacteriana y provocan una sobreexpresión de los genes de homeostasis, impidiendo la expulsión total de los Ag ⁺ de la célula. ²³
<i>Modificaciones en la estructura del fármaco</i>	Inactivan el fármaco aplicado induciendo modificaciones en su estructura. ²³	Los iones de plata son el único producto de equilibrio que puede generarse mediante la interacción de las AgNPs con la mayoría de los componentes del medio biológico. ²³
<i>Modificación de su propia estructura celular y las enzimas objetivo del fármaco</i>	Provoca una disminución de la susceptibilidad de la bacteria al fármaco debido a cambios en su metabolismo. ²³	Las AgNPs pueden atacar diferentes objetivos de la célula bacteriana, tanto las enzimas y proteínas unidas a la membrana, como provocar la interrupción de la fuente de ATP y daño al ADN. ²³
<i>Presencia de genes preexistentes en el cromosoma bacteriano o en el plásmido</i>	Resistencia a los antibióticos.	Al ser un tratamiento relativamente nuevo no se han encontrado genes preexistentes en el cromosoma de bacterias.

I.C.2 “Targets” sobre los que actúa

Además de los factores fisicoquímicos de pH, tamaño, potencial Z y condiciones del medio biológico, la efectividad de la actividad antibacteriana de las AgNPs depende en gran medida de las características biológicas del “target” sobre el que actúa, ya que pueden interactuar tanto con bacterias Gram positivas, Gram negativas o biofilms.

Las bacterias Gram positivas poseen diferencias estructurales en la pared celular en comparación de las bacterias Gram negativas ([Tabla 4](#)), estas diferencias les confieren características únicas que influyen directamente en el mecanismo de acción de las AgNPs y, por lo tanto, una respuesta biocida diferente en cada una.

Tabla 4 Diferencias estructurales entre las bacterias Gram positivas y Gram negativas.²⁴

<i>Características</i>	<i>Bacteria Gram positivas</i>	<i>Bacteria Gram negativas</i>
Coloración con la tinción de Gram	Violeta	Rojo
Espesor de la pared celular	Gruesa (0.02-0.06 µm)	Delgada (0.01 µm)
Estructura de la pared bacteriana	Varias capas de peptidoglicano, ácidos teicóicos, lipoteicoicos y teicuronicos.	Una capa fina de peptidoglicano, proteínas, lipoproteínas y fosfolípidos.
Espacio periplasmático	Ausente	Presente
Membrana externa	Ausente	Presente
Endotoxinas	Ausente	Presente: Compuestas de lipopolisacáridos (LPS)

Bacterias Gram positivas

El *Staphylococcus coagulasa-negativa* (SCN) así como el *Staphylococcus aureus*, son los microorganismos Gram negativas comúnmente responsables de las infecciones nosocomiales en dispositivos/implantes ortopédicos. Estas bacterias suelen ser más resistentes al tratamiento con AgNPs, en comparación con las

bacterias Gram negativas. Esto debido a su pared celular más gruesa, ya que contienen mayor cantidad de peptidoglicano, lo que reduce la difusión de las AgNPs en el entorno celular.²² No obstante, se tiene conocimiento y evidencia de los mecanismos de acción biocida de las AgNPs sobre las bacterias Gram positivas.

(Fig. 3)

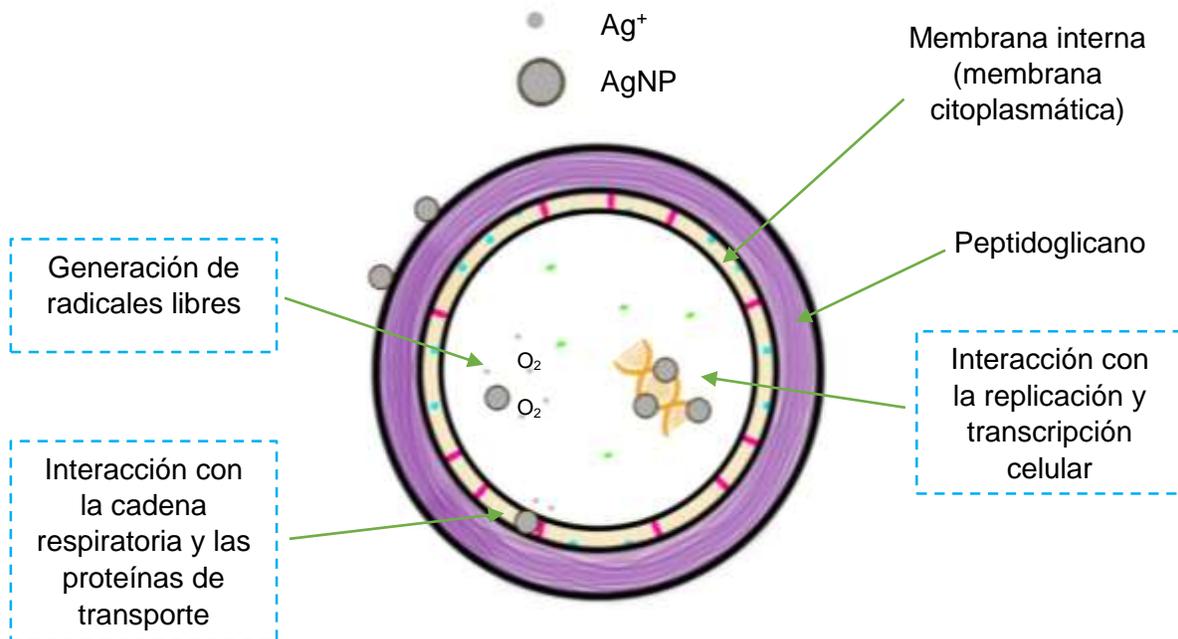


Fig. 3 Mecanismos de acción biocida de las AgNPs sobre las bacterias Gram positivas.

Bacterias Gram negativas

Las bacterias Gram negativas comúnmente presentes en las infecciones nosocomiales son *Pseudomona aeruginosa*, *Enterobacter spp* y *Klebsiella spp*. Las estructuras de lipopolisacaridos presentes en la membrana externa poseen una carga negativa, lo que provoca que las AgNPs con carga superficial positiva exhiban una mayor atracción electrostática a la membrana celular de las bacterias Gram negativas.²⁵ Los mecanismos de acción biocida de las AgNPs sobre las bacterias Gram negativas se ilustran en la Fig. 4.

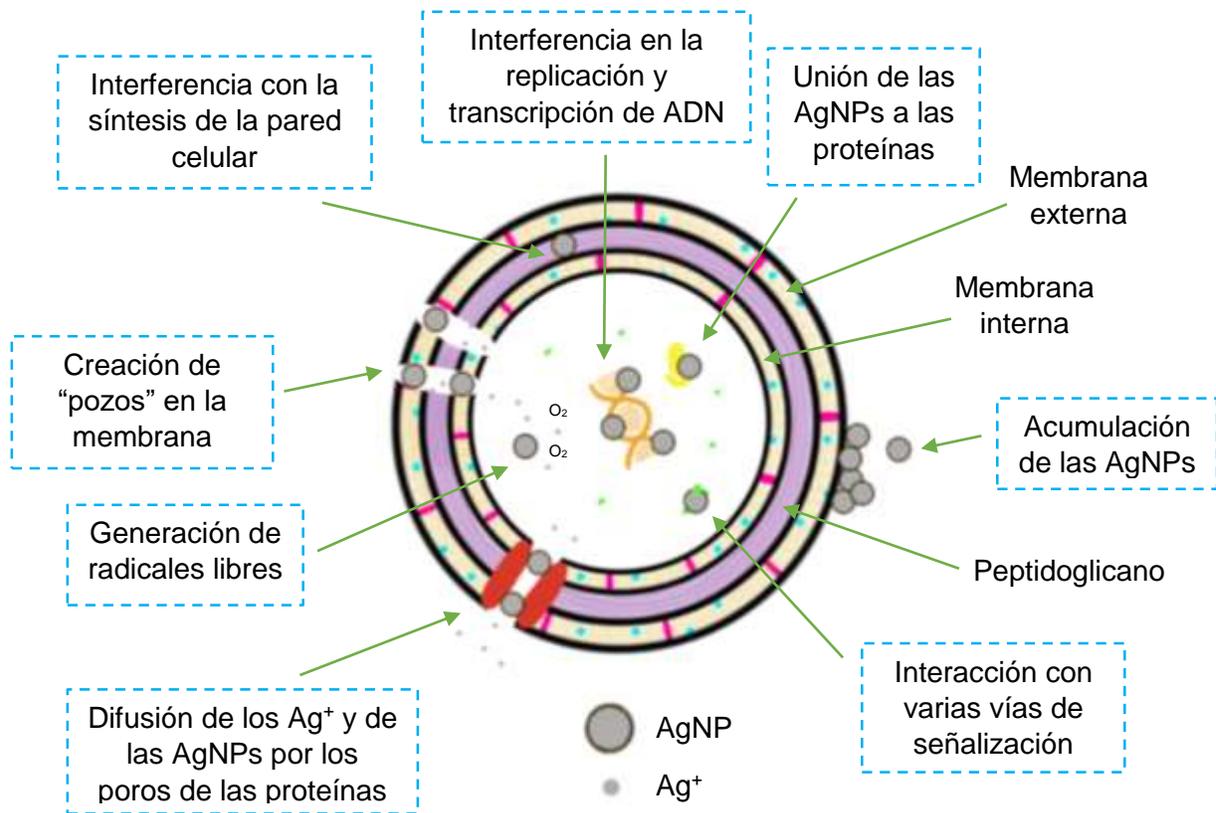


Fig. 4 Mecanismos de acción biocida de las AgNPs sobre las bacterias Gram negativas.

Biofilm

Los biofilms están compuestos por bacterias que se adhieren a superficies sólidas de alta densidad, como las prótesis, y forman una matriz extracelular que dificulta la difusión de antibióticos, por lo que su efectividad antimicrobiana se inactiva fácilmente.²⁰

Las AgNPs poseen la propiedad de afectar el desarrollo y el crecimiento de las biopelículas bacterianas, lo que las vuelve agentes bacteriostáticos ideales de amplio espectro.²² Además de esto, estudios realizados han demostrado que las AgNPs son capaces de inducir el desprendimiento de bacterias, como la *P. aeruginosa*, con rapidez y eficacia, lo que previene o reduce el desarrollo del biofilm.²⁰

I.C.3 Efecto sobre las células bacterianas

La acción biocida de las AgNPs (*Tabla 5*), tiene ventajas terapéuticas en comparación con el uso de los antibióticos convencionales, debido a la rara posibilidad de que los microorganismos desarrollen resistencia contra ellas, el efecto colectivo de las AgNPs aunado al de los iones Ag^+ , así como la fácil absorción de las AgNPs por las células a través de diferentes mecanismos.²⁶

Tabla 5 Efecto del mecanismo de acción de los agentes (AgNPs y Ag^+) sobre las células bacterianas.

<i>Mecanismo de acción</i>	<i>Agente responsable</i>		<i>Efecto en la célula bacteriana</i>
	Ag^+	AgNPs	
<i>Generación de radicales libres</i>	X		Daño mitocondrial. Daño al ADN. Desnaturalización de proteínas. Lisis celular.
<i>Interferencia en la replicación y transcripción celular</i>	X	X	Daño y alteración de la replicación del ADN
<i>Interacción con las proteínas de la pared celular</i>	X	X	Fuga del contenido celular. Transporte incontrolado de iones. Bloqueo en sitios de unión activos.
<i>Interacción con la cadena respiratoria</i>		X	Dificulta la producción de energía.
<i>Estimulación de vías de señalización</i>	X		Inhibición de la proliferación celular. Bloqueo de la división celular. Alteración de la expresión genética. Muerte celular por apoptosis, necrosis o autofagia.
<i>Acumulación de agentes en la pared celular.</i>		X	Creación de “pozos” en la membrana celular, que provocan la lisis celular

Cada mecanismo de acción involucra un proceso diferente que le permite ejercer su efecto biocida sobre la célula objetivo, los cuales se describen a continuación.

Generación de radicales libres

Las AgNPs dañan las membranas celulares y provocan la liberación de iones de Ag^+ , esto mediante la disolución oxidativa de las AgNPs en presencia de oxígeno. Estos iones ingresan fácilmente al cuerpo microbiano e interactúan con los grupos funcionales donantes de electrones (tioles, fosfatos, hidroxilos, imidazoles, indoles, etc.),^{20,25} los cuales se encuentran presentes en la membrana celular o en las proteínas en el interior de la célula, e inducen la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*), que terminan formando radicales libres.²⁰ Este mecanismo biocida tiene lugar debido a que los electrones son más estables cuando están apareados en los orbitales y, como los radicales libres poseen electrones no apareados, estos tienden a ser reactivos frente a otras especies, lo que provoca que formen pares de electrones con otras moléculas para llegar a una configuración electrónica más estable. El proceso de liberación de ROS se describe en la [Fig. 5](#), tanto en condiciones normales como en condiciones anormales frente a la presencia de iones de plata. Cuando un radical libre, dona o roba de otra molécula un electrón para formar un par electrónico, provoca que esta se transforme en un radical libre, y así sucesivamente.²⁰ Este proceso genera un desbalance entre la producción de los ROS y el sistema de defensa antioxidante de la célula bacteriana, a este fenómeno se le conoce como estrés oxidativo y, ocasiona daño mitocondrial, ruptura de la pared celular (lisis) y daño del ADN (mediante la ruptura de una sola hebra del ADN o la hiperoxidación de proteínas y lípidos).^{25,27}

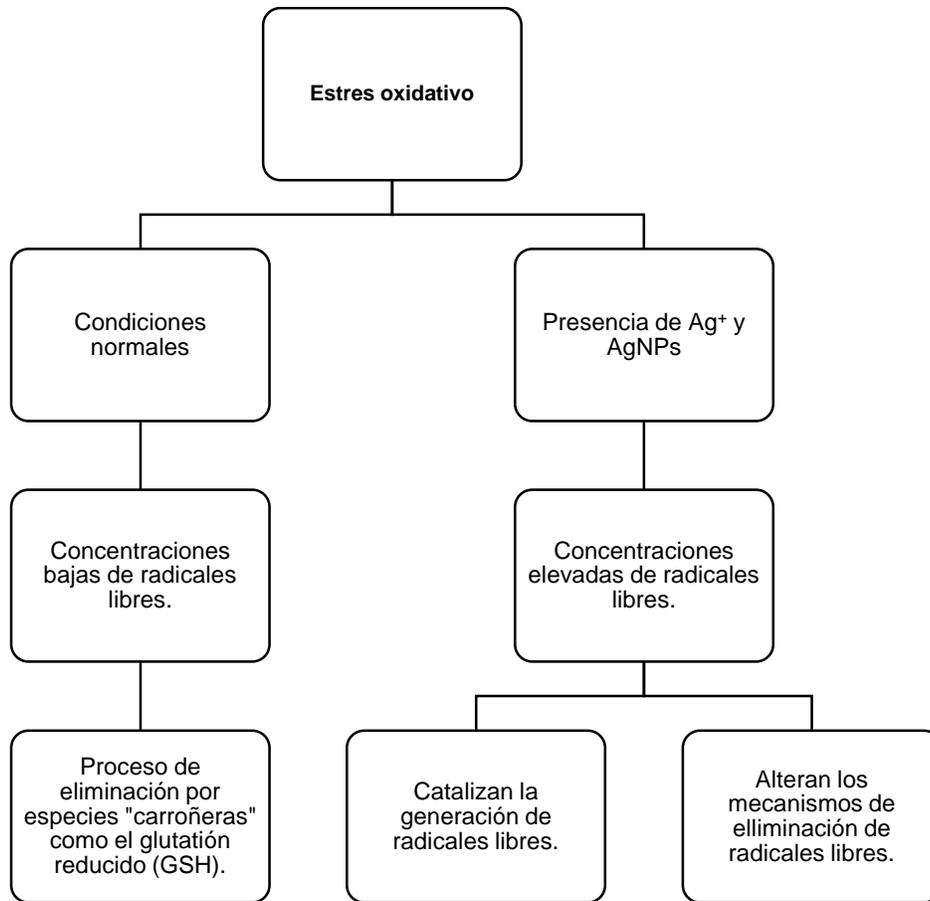


Fig. 5 Proceso de eliminación de radicales libres de la célula bajo condiciones normales y en presencia de AgNPs y Ag⁺.

Este mecanismo biocida, por estrés oxidativo, así como por la generación de radicales libres, representa las bases de la capacidad antimicrobiana de las AgNPs, mismas que se mencionan a continuación:

Interferencia con la replicación y transcripción celular

Los iones de plata alteran la replicación del ADN, esto mediante el desacoplamiento del transporte de electrones respiratorios de la fosforilación oxidativa, lo que inhibe las enzimas de la cadena respiratoria y/o interfiere con la permeabilidad de la membrana.²¹ Además, los Ag⁺ poseen una fuerte tendencia a interactuar con el grupo fosfato de las bases de ADN, por lo que cuando entran en la célula, se intercalan entre las bases de purina (adenina y guanina) y pirimidina (citocina, timina y uracilo), provocando un efecto dañino sobre el enlace de hidrogeno entre las dos

hebras antiparalelas, esto lleva a una desnaturalización de la molécula de ADN y la inhibición del crecimiento bacteriano.²⁶

Interacción con las proteínas de la pared celular

Cuando las AgNPs se unen a las proteínas de la membrana, interfieren con la permeabilidad de esta, provocando la fuga del contenido celular y el transporte incontrolado de iones. Los Ag^+ se unen a las proteínas de los grupos tiol, formando enlaces estables que provocan el bloqueo de los sitios de unión activos y alteran la estructura tridimensional de las proteínas, este mecanismo afecta el transporte y la liberación de iones de potasio (K^+), el bloqueo de la síntesis de trifosfato de adenosina (ATP) y, la obstaculización de la división y reproducción celular.²⁵

Interacción con la cadena respiratoria

Las nanopartículas de plata, que atacan la membrana, pueden interferir con la cadena respiratoria y dificultar la producción de energía (ATP), lo que conduce a inhibición de la adhesión y la proliferación celular.²¹ Este proceso se da mediante la unión de AgNPs a proteínas en la membrana, lo que evita la captación y la liberación de los iones fosfato que son esenciales en la producción de energía.²⁵

Acumulación de AgNPs en la pared celular

La acumulación de las AgNPs es consecuencia de la gran superficie de contacto que poseen, lo que provoca un incremento en la adherencia de estas a la superficie bacteriana. Esto afecta la morfología de las membranas celulares, lo que induce la creación de “pozos” que permiten a las AgNPs penetrar al interior de la célula. Una vez que exista una gran cantidad de “pozos” en la pared bacteriana se produce una lisis celular.^{20,21,25}

Estimulación de las vías de señalización celular

Las vías de señalización son un conjunto de moléculas que transmiten señales en cadena para controlar una o más funciones en la célula, como establecer el nivel de toxicidad y destino de las células bacterianas, pueden ser estimuladas por la interacción con las AgNPs o con los Ag^+ . Se ha estudiado el efecto de las AgNPs al interactuar con las vías de señalización JNK (C-Jun N-terminal kinase) y p38 MAP quinasa, ambas pertenecen a la familia de las vías de señalización MAP quinasa (proteínas quinasa activadas por mitógenos), las cuales se activan en respuesta a condiciones de estrés generadas por cambios en los niveles de ROS de la célula, en este caso debido al contacto con las AgNPs, y desempeñan un papel importante en la apoptosis.²⁶

Actividad antibacteriana de las bacterias muertas por plata: efecto “zombie”

Adicional a los efectos anteriormente mencionados, existe otro mecanismo antibacteriano de las AgNPs, el cual está dado por actividad de las bacterias muertas. Se ha observado que éstas, tienen una actividad biocida hacia la población viable de la misma bacteria, es decir; aquellas bacterias vivas y funcionales presentes en el medio, esto se debe a que las especies metálicas no se desactivan por el mecanismo de muerte celular, por lo que, estas bacterias se convierten en depósitos de liberación sostenida de iones de plata. Este mecanismo se asocia a un fenómeno de migración de iones de un sólido a otro, el cual es afectado por cambios de equilibrio en la célula y está regulado por el principio de Le-Chatelier, el cual se describe en la [Fig. 6](#). Esto ocurre cuando los sitios de unión celular disponibles dentro de la bacteria se saturan gradualmente con Ag^+ (a una concentración de ~ 10 ppm).²⁸

Para que la concentración de plata dentro de la célula bacteriana muerta alcance un estado de equilibrio se induce un desplazamiento del líquido dentro de la célula bacteriana muerta hacia el medio, y posteriormente del medio a las bacterias viables que actúan como nuevos sitios de absorción desocupados para la plata.²⁸

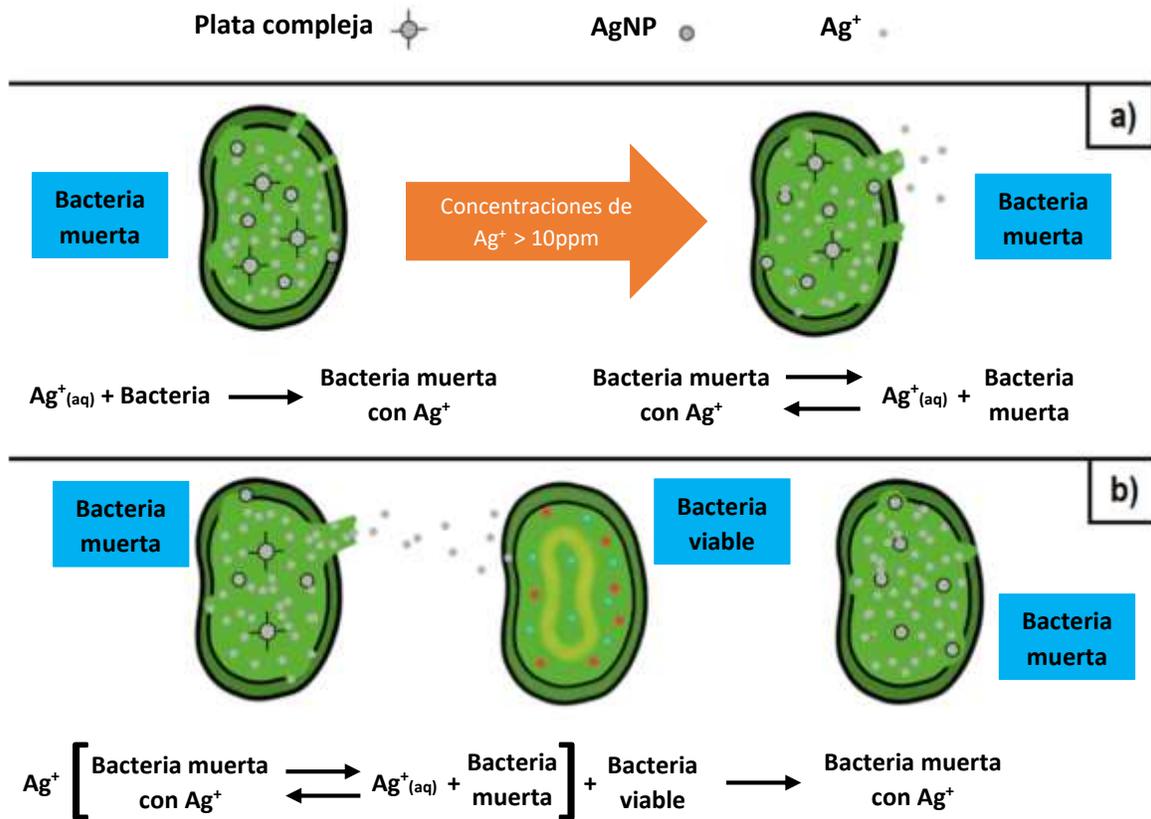


Fig. 6 En el esquema a) se muestra la capacidad bactericida que poseen las bacterias, que han muerto por el efecto de las AgNPs, para liberar iones al medio y en el b) se aprecia como los Ag⁺, aún después de matar a la bacteria, continúan actuando contra otras bacterias viables, lo que da origen a una actividad biocida prolongada por parte de los Ag⁺.

I.D HIDROXIAPATITA IMPURIFICADA CON PLATA

Después de una intervención quirúrgica para la implantación de un dispositivo ortopédico, las infecciones bacterianas son una grave complicación, que sólo puede curarse retirando el implante colocado. Esto se debe a que el mecanismo de crecimiento de las bacterias infectantes en la superficie del implante protege a las mismas del sistema inmunológico del huésped, así como de la terapia con antibióticos. Este mecanismo de protección se basa en la formación de un microsistema en una superficie (**Fig. 7**), donde varias cepas y especies microbianas se reproducen y agrupan formando una colonia que se comporta como una unidad denominada biofilm.^{29,30}

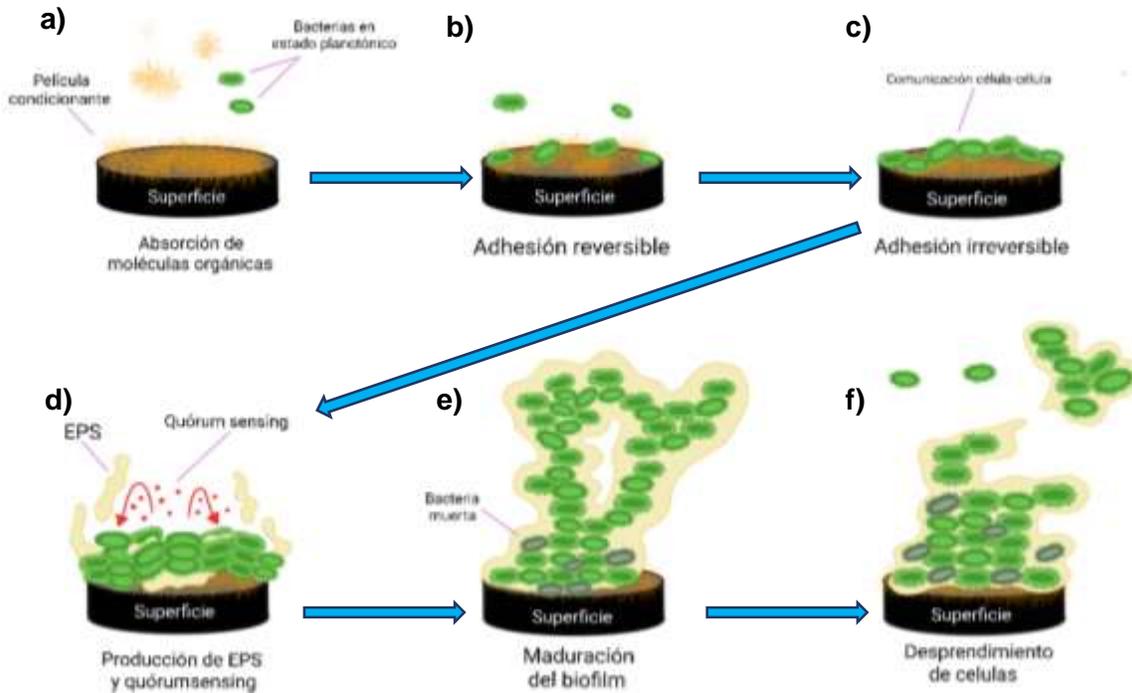


Fig. 7 Pasos secuenciales de la formación del biofilm en la superficie de un biomaterial.

a) Formación de una película condicionante, b) Adhesión reversible, c) Adhesión irreversible, d) Producción de EPS (sustancias poliméricas extracelulares) y quórum sensing (mecanismo de comunicación bacteriana), e) Maduración del biofilm y muerte de algunas células bacterianas que carecen del acceso a nutrientes y oxígeno, f) Desprendimiento de bacterias para colonizar otras superficies.

El compuesto de hidroxiapatita con nanopartículas de plata (HA-AgNPs) ha demostrado ser un material eficaz para prevenir y combatir infecciones nosocomiales, sin sacrificar sus propiedades mecánicas y de resistencia, además de tener baja densidad y mantener su estabilidad química. La combinación de este biocerámico con un metal permite erradicar total o parcialmente las limitantes en las propiedades que posee cada material de manera independiente. Las AgNPs tienen una fuerte tendencia a aglomerarse, lo que disminuye su actividad antimicrobiana. Esto se puede evitar al depositar las nanopartículas de plata en una matriz biocerámica (HAp) para mejorar su dispersión.³¹ Además, también permite el ingreso de la plata al organismo. Mientras que la adición de las AgNPs a la HAp le otorga propiedades tanto bactericidas como bacteriostáticas,¹¹ entre otras que facilitan su uso en recubrimientos.

I.D.1 Sustitución de plata en la red de hidroxiapatita

La sustitución de la plata en la red de HAp, además de inducir modificaciones en los parámetros de la red y en la cristalinidad, también mejora sus propiedades antimicrobianas y mecánicas.¹⁰ Se sabe que la sustitución de iones Ca^{2+} (0,099 nm) por Ag^+ (0,128 nm) se da mayormente en el sitio Ca (I) de la HAp. La sustitución de iones Ag^+ conduce a un aumento en los parámetros de la red dado linealmente con la cantidad de plata añadida en el rango de la relación atómica $\text{Ag} / (\text{Ag} + \text{Ca})$ entre 0 y 0,06.¹⁰

I.D.2 Mecanismo de acción bactericida y bacteriostático

La estructura HAp-AgNPs posee propiedades biocidas, es decir, es bactericida (produce la muerte bacteriana) y bacteriostático (impide la reproducción celular). Estas propiedades están dadas tanto por la actividad de las AgNPs que entran en contacto con la superficie bacteriana, como por los Ag^+ que son liberados de forma controlada en el medio o que se difunden a través de la superficie cristalina. Los mecanismos de acción de las AgNPs así como de los Ag^+ ([Tabla 6](#)), pueden clasificarse en dos tipos: bactericidas y bacteriostáticos.

Tabla 6 Clasificación de los mecanismos de acción de las AgNPs y de los Ag^+ de acuerdo con el daño provocado en la bacteria.

<i>Bactericida</i>	<i>Bacteriostático</i>
Estimulación de las vías de señalización celular JNK y p38 MAP quinasa.	Interferencia en la replicación y transcripción celular.
Acumulación de las AgNPs en la pared celular.	Interacción con la cadena celular respiratoria.
Generación de radicales libres.	
Interacción con las proteínas de la pared celular.	

A pesar de que tanto las AgNPs como los Ag^+ le confieren al material propiedades biocidas, las investigaciones han mostrado que son los Ag^+ los que juegan un papel más importante en la efectividad del material. Esto, debido a que le otorgan las características ideales al implementarse en un implante ortopédico, que puede prevenir las infecciones nosocomiales, al evitar la adhesión microbiana a la

superficie del mismo.³² También se ha mencionado que los Ag^+ se unen al ADN microbiano, evitando así, la replicación bacteriana. Además, también puede enlazarse a grupos tiol de las enzimas metabólicas presentes, en la cadena de transporte de electrones bacterianos.³³ Este proceso daña la membrana bacteriana y compromete sus funciones para la respiración celular.³⁴

CAPITULO II

SINTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES

II.A TÉCNICAS DE SÍNTESIS

Las consecuencias del rechazo de un implante ortopédico por parte del paciente pueden llegar a producir dolor y complicaciones, lo que deriva en una segunda intervención quirúrgica, amputación, o en los casos más severos, la muerte del paciente.¹ Es por ello, que se desea poder manipular los parámetros de síntesis que nos permitan obtener la estructura adecuada para su implementación en la fabricación de un implante ortopédico. Afortunadamente ya existen distintos tipos de procesos de síntesis investigados por diversos autores, que nos brindan una gama de materiales con distintas, morfologías, tamaños y aplicaciones. Estos procesos se encuentran compuestos por dos fases, la primera es la obtención del material de recubrimiento (polvo de HAp-AgNPs) y la segunda es la técnica de deposición del material sobre una superficie (el implante).

II.A.1 Preparación de polvos de HAp-AgNPs

Precipitación

Se fundamenta en la obtención de un sólido a partir de una disolución y puede darse por distintos mecanismos, ya sea reacciones químicas, evaporación del disolvente, enfriamiento repentino de una disolución caliente, o por cambio de polaridad del disolvente y a menudo es acompañado de otros mecanismos para acelerar o mejorar el proceso de síntesis, como lo que se muestra a continuación:

Precipitación húmeda: Es el método químico más utilizado para sintetizar polvos de HAp-AgNPs. Se puede llevar a cabo en condiciones de temperatura ambiente o elevada, utilizando agua o disolventes inorgánicos y ofrece un elevado control sobre la morfología y textura del material obtenido. Durante su proceso libera subproductos inocuos (agua) y depende del mecanismo de nucleación-agregación-aglomeración. El proceso consiste en la precipitación, posteriormente el envejecimiento, la filtración, el secado y por último el tratamiento térmico.³⁵

Precipitación sonoquímica: Es la obtención de un sólido (nanomaterial o nanopartícula) a partir de una disolución, mediante la adición de reactivos para

transformar un compuesto soluble en formas insolubles o de menor solubilidad. Para lograr la sedimentación del compuesto se aplican ondas sonoras que inducirán o acelerarán las reacciones químicas. Este método se ha utilizado de forma exitosa para obtener nanopartículas de plata dentro de compuestos bioactivos de hidroxiapatita, materiales compuestos que exhiben distintas propiedades ([Tabla 7](#)) y actividad biológica ([Tabla 8](#)), acorde con lo reportado por *Vukomanović M. et al.*¹⁴

Tabla 7 Propiedades de HAp-AgNPs sintetizada mediante precipitación sonoquímica.

<i>Descripción</i>	
<i>Método de síntesis</i>	Precipitación sonoquímica homogénea + tratamiento térmico.
<i>Material obtenido</i>	Compuestos bioactivos de hidroxiapatita con nanopartículas de plata (HAp-AgNPs)
<i>Estructura</i>	Estructura hexagonal de HAp junto con fases cúbicas y hexagonales de plata. Relación Ca/P de 1.52
<i>Morfología</i>	Las AgNPs más pequeñas son cúbicas y están incrustadas dentro de las placas de HA. Las AgNPs más grandes están unidas en la superficie y tienen una estructura hexagonal. Una parte de la plata está presente en forma de iones (Ag ⁺) como dopantes dentro de la estructura de HAp.
<i>Aplicaciones</i>	Diseñados para: controlar la liberación de Ag ⁺ . Prevenir la toxicidad inducida por la nanoescala y ser bioactivo tanto con las células bacterianas como humanas.

Tabla 8. Evaluación de la actividad bactericida, bacteriostática y citotoxicidad del compuesto HAp-AgNPs sintetizada mediante precipitación sonoquímica.

<i>Descripción</i>	
<i>Actividad bactericida</i>	Concentración de 0,8 mg mL ⁻¹ para <i>E. coli</i> y 1,25 mg mL ⁻¹ para <i>S. aureus</i> .
<i>Actividad bacteriostática</i>	Haciendo uso del método de concentración mínima inhibitoria (MIC) se determinó la concentración mínima capaz de inhibir el crecimiento bacteriano: En rango de 0,6-0,7 mg mL ⁻¹ para <i>E. coli</i> y de 0.7-0.8 mg mL ⁻¹ para <i>S. aureus</i>
<i>Citotoxicidad</i>	Se demostró muy alta toxicidad en concentraciones que son aplicables en la práctica. No existe la selectividad del material, ya que afecta tanto a las células de mamíferos como a las bacterianas.

Coprecipitación

Es un método de síntesis empleado para preparar polvos de HAp, se emplean como precursores dos sales solubles en agua que deben precipitar al mismo tiempo, dicha precipitación es dependiente del pH y se lleva a cabo con agitación constante para lograr una mezcla a nivel atómico, y así obtener una solución homogénea. Se debe tener en cuenta que esta técnica depende de varias variables³⁵, como la naturaleza de los reactivos, los agentes precipitantes, el pH, la concentración de los reactivos, temperatura, presión y velocidad de agitación.

Este método ha sido utilizado para obtener compositos de HAp-AgNPs con diversas concentraciones de Ag, como se indica en la **Tabla 9** que se muestra continuación.

Tabla 9 Propiedades de HAp-AgNPs sintetizada mediante coprecipitación.

<i>Descripción</i>	
<i>Método de síntesis</i>	Coprecipitación de química húmeda + tratamiento a diferentes pH.
<i>Material obtenido</i>	Nanopartículas de HAp dopadas con Ag.
<i>Estructura</i>	Materias de HAp monofásico sin la presencia de otros cristales relacionados con fosfato de calcio o plata.
<i>Morfología</i>	Morfología similar a una aguja, distribución de tamaño de partícula similar y con la mayoría de los cristales entre 20 y 40 nm.
<i>Aplicaciones</i>	Materiales biomiméticos y con propiedades antimicrobianas.
<i>Chen K. et al.</i> ¹³	
<i>Método de síntesis</i>	Coprecipitación
<i>Material obtenido</i>	Una gama de HAp-AgNPs con diversos contenidos de Ag.
<i>Estructura</i>	La Ag está incorporada estructuralmente en la HAp.
<i>Morfología</i>	Morfología con forma de varilla de dimensiones de ~50 nm de longitud, ~15 nm de ancho y con una relación de aspecto de ~3. El material está formado por pequeños cristales de apatita.
<i>Aplicaciones</i>	La eficacia antimicrobiana puede mantenerse durante un periodo de tiempo largo. Permite una liberación mínima de iones Ag y potencialmente puede prevenir la aparición de citotoxicidad local en el sitio del implante.

*Lim P.N. et al.*³²

Las propiedades estructurales de los materiales también deben ser evaluadas, en cuanto a la actividad bactericida, bacteriostática y citotoxicidad, para asegurar la

viabilidad del material. Un condensado de estas evaluaciones se muestra en la **Tabla 10**.

Tabla 10 Evaluación de la actividad bactericida, bacteriostática y citotoxicidad de HAp-AgNPs sintetizada mediante coprecipitación.

<i>Descripción</i>	
<i>Actividad bactericida</i>	La muestra sintetizada a pH 11 (0.6% wt) desarrollo el equilibrio óptimo para la propiedad bactericida y bacteriostática sin alcanzar la citotoxicidad, inhibiendo a <i>E. coli</i> con valores mayores a 512 µg/mL y a <i>S. epidermidia</i> con valores mayores a 572 µg/mL.
<i>Actividad bacteriostática</i>	
<i>Citotoxicidad</i>	La muestra con pH mayor, en este caso fue la que tuvo un equilibrio óptimo, ya que se demostró que a menor pH existe una mayor liberación de iones Ag ⁺ que daña tanto a las células bacterianas como a las células propias del organismo.
<i>Chen K. et al.</i> ¹³	
<i>Actividad bactericida</i>	Mostro ser eficaz en la prevención o minimización de la adhesión bacteriana, evitando la formación de biofilm.
<i>Actividad bacteriostática</i>	La sustitución de 0.5 % en peso de Ag en HAp fue suficiente para retardar e inhibir el crecimiento bacteriano.
<i>Citotoxicidad</i>	Una concentración mayor a 1.6 ppm de iones Ag ⁺ es citotóxica ya que afecta a las funciones celulares metabólicas básicas.
<i>Lim P.N. et al.</i> ³²	

Hidrotermal

Técnica empleada para desarrollar polvos de óxidos complejos con alta cristalinidad en un ambiente confinado. Para llevarse a cabo requiere de temperatura y presión superior a las del ambiente, por lo tanto, se realiza dentro de una autoclave. Se fundamenta en la formación de enlaces químicos por efecto de la condensación y la reactividad, lo que genera núcleos que aseguran la síntesis estequiométrica y altamente cristalina de la HA. Las altas presiones permiten controlar la morfología y porosidad del nanomaterial, por lo que se pueden generar cristales de tamaño micro.³⁵

Sol-gel

Es un proceso químico en fase húmeda que parte de una solución química o sol procedente de precursores (alcoholes metálicos y cloruros), que sufren reacciones de hidrólisis y policondensación para formar una dispersión coloidal, que pasa por una polimerización lenta y forma un gel. Esta solución actúa como precursor de una red integrada de partículas discretas o una red de polímeros (conocida como gel polimérico), en donde el solvente es atrapado en la red de partículas, provocando que la red polimérica impida que el líquido se separe, mientras el líquido previene que el sólido colapse en una masa compactada. La deshidratación parcial de un gel produce un reactivo sólido elástico conocido como Xerogel, que cuando es deshidratado completamente y tratado térmicamente en un flujo de gas, produce un material nanoestructurado. Este proceso implica parámetros de control estricto y depende en gran medida de la temperatura, el pH, la naturaleza del solvente y la naturaleza química de los reactivos utilizados.³⁵

Microondas

Con este método se puede obtener un campo aumentado de polvo de HAp perfectamente cristalino y homogéneo en cuestiones de tamaño, morfología y porosidad.³⁵ Las microondas actúan como campos eléctricos de alta frecuencia, capaces de calentar cualquier material conteniendo cargas eléctricas como las moléculas polares en un disolvente o iones conductores en un sólido. Los solventes polares se calientan y sus componentes moléculas se ven obligados a girar con el campo y pierden energía en colisiones. Este método se ha presentado como simple y económico para preparar materiales de tamaño nanométrico con una distribución de tamaño de partícula estrecha.³⁵

II.A.2 Métodos de recubrimiento

En la realización de dispositivos implantables funcionalizados el proceso de recubrimiento juega un papel muy importante, en la conservación del equilibrio entre la función mecánica y un sistema de entrega de transporte masivo localizado, debido que debe facilitar la entrega de nutrientes biológicos y lograr una capacidad de regeneración de tejido en el sitio de implantación.³⁵ Es decir; la competencia debe inclinarse a favor de la integración del tejido antes de que se produzca un nivel

considerable de contaminación bacteriana en la superficie del ímplate. Los métodos de recubrimiento más usados para este propósito son:

Pulverización de plasma

Método utilizado para pulverizar aleaciones, metales y compuestos metálicos, mediante la pulverización de un material fundido por calor sobre una superficie. Se basa en la inyección del material de recubrimiento, en forma de polvo fino en un chorro de plasma a temperaturas muy altas, durante este proceso se forman gotitas fundidas que son impulsadas a alta velocidad hacia el sustrato. El material caliente impacta sobre la superficie del sustrato y se enfría rápidamente formando estructuras similares a un panque. A este proceso se le conoce como proceso en frío debido a que el sustrato puede mantenerse a temperaturas bajas sin sufrir daños, cambios metalúrgicos o distorsión del material de sustrato. Este método es utilizado para depositar productos de recubrimiento para medicamentos, como los implantes intraóseos. Con la ayuda de este método se han realizado revestimientos capa por capa de polvo de titanio y polvo de HAp sustituido con plata, sus características y propiedades se muestran en la [Tabla 11](#).

Tabla 11 Propiedades de recubrimiento de HAp-AgNPs sintetizados mediante pulverización de plasma.

<i>Descripción</i>	
<i>Método de síntesis</i>	Pulverización de plasma
<i>Material obtenido</i>	Polvos de hidroxiapatita sustituidos con plata sobre un sustrato de titanio.
<i>Estructura</i>	Partículas fusionadas muy compactas con bordes de salpicadura desiguales.
<i>Morfología</i>	Formaciones individuales que alcanzan un tamaño de 25 a 40 μm .
<i>Aplicaciones</i>	Aplicaciones médicas, especialmente traumatología (en prótesis medicas de larga duración) y odontología.

*Lyasnikova A.V. et al.*³⁶

Deposición electroquímica

Es un método utilizado para la obtención de nanopartículas metálicas dispersas y recubrimientos metálicos adherentes con buenas propiedades físicas y químicas. Con esta técnica se puede tener un buen control sobre la síntesis del nanomaterial, además de ser un método eficiente (que puede ser usado para revestir piezas de

grandes dimensiones y con bajos costos de operación).^{37,38} Se basa en la reducción de los iones presentes en una solución (electrolito) a través de una corriente eléctrica (generalmente continua) sobre un sustrato.

Inmersión o dip coating

Es un método de bajo costo y fácil implementación utilizado para la obtención de monocapas o multicapas delgadas, mediante la extracción de cualquier sustrato en un depósito de líquido (solvente). Consiste en la inmersión de un sustrato, en una solución del material de recubrimiento, por un cierto periodo de tiempo y en su posterior extracción a una velocidad constante (determina el espesor del recubrimiento) para que el exceso del material regrese al recipiente y la solución se despliegue en capas, donde el solvente se evaporara del líquido.^{39, 40}

Sputtering

El sputtering o erosión catódica pertenece al conjunto de técnicas de recubrimiento por PVC (del inglés, *Physical Vapor Deposition*), es utilizada para realizar la deposición de recubrimientos delgados con elevada densidad, resistencia, homogeneidad y excelente adhesión que, además, permiten la formación de capas de varios componentes y el uso de bajas temperaturas de sustrato.

Se compone de un sistema con una cámara de alto vacío, a una presión $<10^{-6}$ mbar, que asegura la menor cantidad de impurezas posibles y previene la incorporación indeseada de contaminación en el recubrimiento. Además, se utiliza una presión de trabajo asociada al flujo del gas inerte (generalmente argón) que será utilizado para lograr la erosión del blanco y cuyas presiones se encuentran en el rango de 10^{-3} a los 10^{-2} Torr. También posee un par de electrodos planos: un ánodo (el sustrato sobre el que se depositara la película delgada) y un cátodo (la fuente del material a depositar).

La erosión catódica consiste en un bombardeo iónico inducido por plasma, este último es generado por una diferencia de potencial, sobre un objetivo de pulverización catódica (blanco). Lo anterior provoca la transferencia de átomos neutros de la superficie del blanco, al sustrato para inducir el crecimiento de la

muestra o el recubrimiento.^{41,42} El bombardeo iónico también ocasiona la emisión de electrones secundarios, que pasan a formar parte del plasma y poseen la energía suficiente para producir nuevos iones mediante el proceso de ionización en cascada⁴¹, como se muestra en la *Fig. 8*.

Tiene aplicaciones tanto para la formación de recubrimientos conductores como semiconductores, debido a que pueden emplearse dos sistemas de operación:

- DC sputtering: Es utilizado para la erosión de materiales conductores mediante el depósito por descarga de corriente directa (DC), al generar una diferencia de potencial entre los catodos.⁴¹
- RF sputtering (radiofrecuencia): Es utilizado para la aplicación de materiales aislantes o semiconductores, en los que ocurre la aparición superficial de cargas positivas sobre la superficie del blanco. Como consecuencia de esto es que no se puede generar una diferencia de potencial, por lo tanto, se hace uso de un condensador en serie para acoplar la señal RF y así generar voltajes alternos de alta frecuencia para compensar la carga espacial positiva acumulada (la carga positiva desaparecerá al invertir la polaridad en cada semiciclo); así pues, es que puede ocurrir la erosión catódica en estos materiales.⁴¹

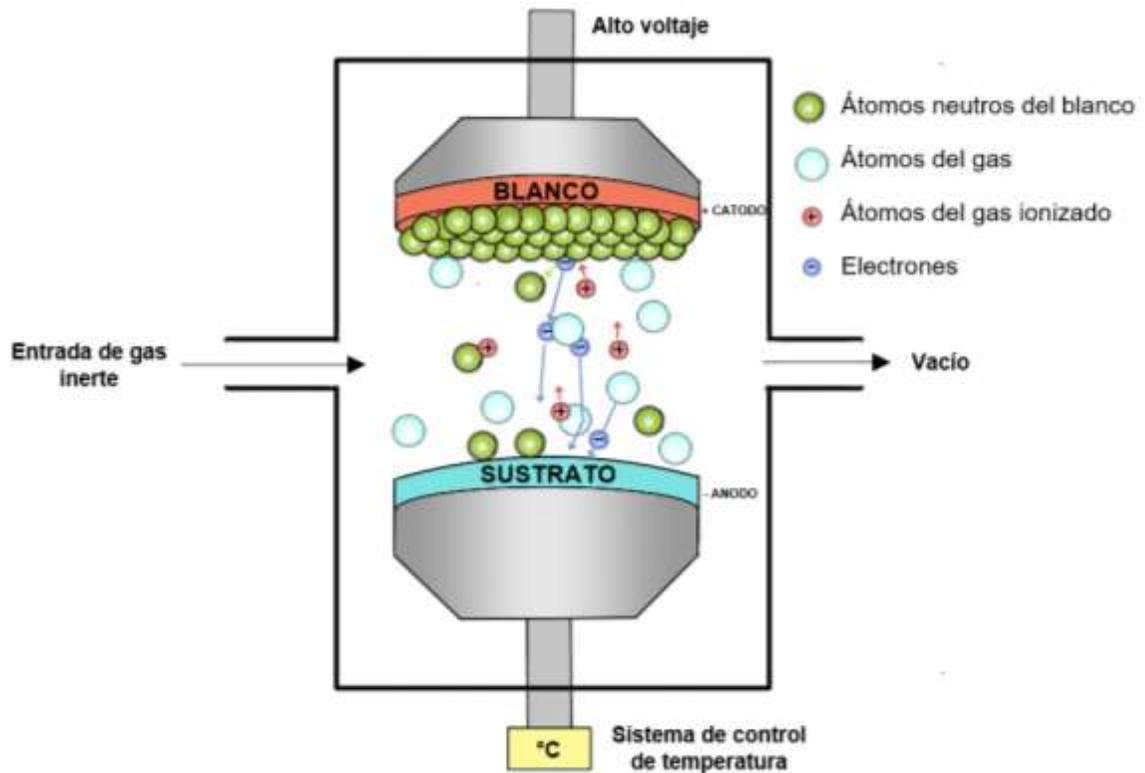


Fig. 8 Diagrama de funcionamiento de un equipo sputtering

II.B TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

El uso de nuevos materiales para dispositivos/implantes ortopédicos requiere de una exhaustiva revisión que compruebe que los materiales son aptos para cumplir con las diversas características bifuncionales y estructurales. Y entre las diversas técnicas de caracterización destacan las siguientes, que permitirán comprobar la presencia de la HAp-AgNPs y la su efectividad como agente bactericida.

II.B.1 Difracción de rayos X (XRD)

El análisis por XRD es una técnica analítica primaria que permite realizar caracterizaciones estructurales de materiales. Esta tiene la finalidad de determinar características de la muestra como microestructura, estructura cristalina, grupo espacial, los parámetros de red y la composición química. Esto, mediante un análisis cuantitativo de la concentración de las fases o compuestos en la muestra.

Esta es una técnica de caracterización no destructiva, es decir, no altera de forma permanente las propiedades físicas, químicas, mecánicas o dimensionales de la muestra. Se fundamenta en la relación de intensidad y ángulo de difracción de las señales detectadas como consecuencia de la interacción de un haz de rayos X con una muestra, mediante el fenómeno de interferencia (destruktiva y constructiva) de radiación de rayos X dispersados. Esto se logra debido a que los fotones de rayos X, cuyas energías se encuentran entre 3 – 8 keV, tienen longitudes de onda lo suficientemente pequeñas, como para entrar en la red cristalina, con distancias interatómicas que se encuentran entre 0.15 – 0.4 nm, de la muestra e interactuar con ella.

Existen tres tipos de interacciones relevantes, para el proceso de caracterización, que ocurren en el rango de energía en el que se encuentran los rayos X, las cuales son:

- Fotoionización, proceso en el que el fotón se dispersa con menor energía, ya que hay transferencia de energía y momento hacia la muestra, ocasionando la emisión de un electrón.
- Dispersión Compton, proceso en el que el fotón se dispersa con mayor energía, ya que se transfiere desde un electrón al fotón, por lo que no hay emisión de electrones.
- Dispersión Thomson, es aquella en la que no hay pérdida de energía, el fotón es dispersado por electrones que oscilan a la misma frecuencia de la radiación incidente. Es a causa de ello que es empleada para caracterizar estructuralmente los materiales, ya que en este tipo de dispersión no se producen cambios en la radiación incidente, conservándose la relación de fase con la onda incidente, pero si se producen cambios en su trayectoria, como se ilustra en la [Fig. 9](#).

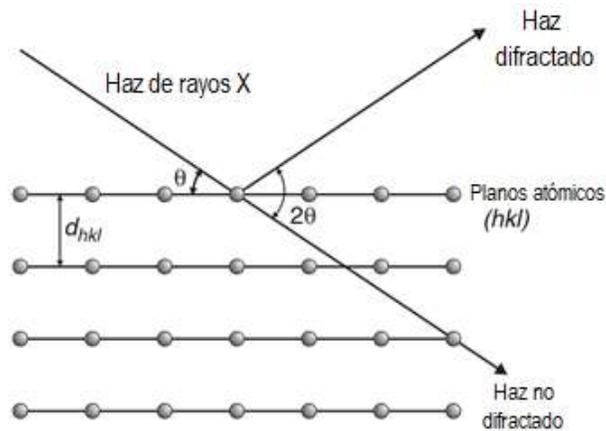


Fig. 9 Representación de los fenómenos de difracción de un haz de rayos X sobre la materia.

El fenómeno de la difracción puede describirse con la Ley de Bragg.

$$n\lambda = 2d_{hkl} \sin \theta$$

En donde se tiene que:

- n es un entero
- λ es la longitud de onda de la radiación incidente.
- d_{hkl} es la distancia interplanar.
- θ es el ángulo de difracción o ángulo de Bragg.

Esta relación establece las condiciones específicas en las que ocurre una dispersión coherente en dependencia de criterios geométricos definidos por los índices de Miller. Con esto se pueden calcular las distancias interplanares de la muestra, las cuales, al ser específicas para cada sistema cristalino, permite identificar el grupo espacial al que se asocia la muestra.

Los equipos de XRD cuentan con una fuente de rayos X y un detector para analizar la radiación difractada, es decir, las señales de dispersión Thomson observables. Estas señales ocurren cuando existe una dispersión coherente del haz de rayos X por parte de la materia, generándose una interferencia constructiva que es captada por el detector, lo cual se ilustra en el esquema de la **Fig. 10**.

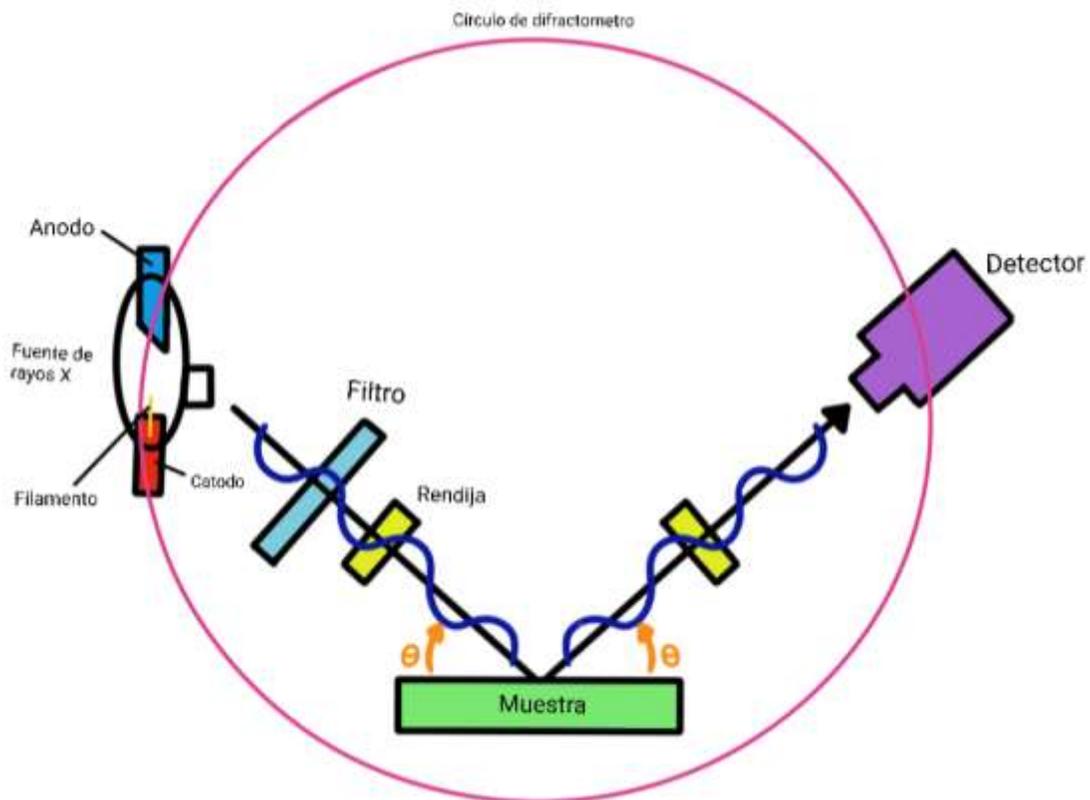


Fig. 10 Diagrama del funcionamiento de un difractor de rayos X.

II.B.2 Espectroscopia de transmisión de infrarrojo (IR)

Es utilizada para identificar los grupos funcionales presentes en la muestra y para obtener información sobre la sustancia involucrada con relación a su estructura molecular. El espectrofotómetro mide la transmisión de radiación electromagnética de una muestra en función de la longitud de onda o número de onda, es decir, la interacción de la materia con la radiación IR. Esto permite identificar las excitaciones vibracionales y rotacionales en moléculas, sin que se produzcan transiciones electromagnéticas.

Esta técnica emplea como fuente de excitación un haz de luz cuya longitud de onda varía en la región infrarroja del espectro electromagnético, esto es, en el intervalo comprendido entre los 0.77 y los 1000 μm . Al incidir esta radiación sobre una

muestra interactúa con las moléculas que la componen, las cuales se encuentran vibrando en su estado basal (de mínima energía). Si la energía o frecuencia del haz de luz es absorbida por la muestra, se inducirá una excitación en las moléculas dando lugar a estados vibracionales excitados, los que son característicos de cada grupo funcional. Para que las moléculas absorban la energía del espectro infrarrojo y se produzcan vibraciones en la muestra, es necesaria la presencia de un momento dipolar.

El espectroscopio en general está compuesto por un detector que recolecta las señales, la fuente de excitación IR, y un arreglo óptico (un divisor de haz, un espejo fijo y un espejo móvil), como se ilustra en la [Fig. 11](#). La señal obtenida por el espectrómetro se denomina interferograma y, como sigue siendo una señal compleja para poder ser analizada, este formato se traslada a lo que se conoce como espectro de infrarrojo, mediante el algoritmo de la transformada de Fourier.

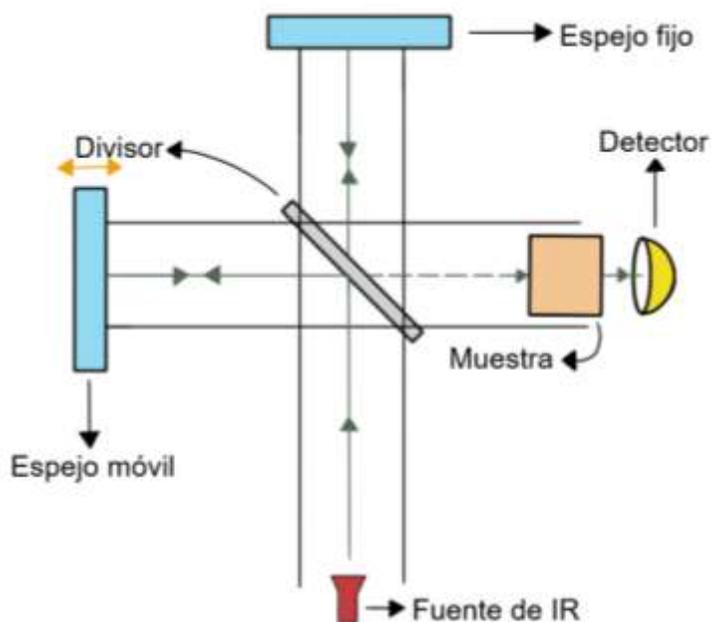


Fig.11 Diagrama de un espectroscopio de transmisión infrarrojo.

II.B.3 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Es un tipo de microscopia que se caracteriza por el uso de un haz de electrones para realizar una caracterización estructural de la muestra, en la cual se colecta la información de los electrones que son transmitidos a través de la muestra. La imagen TEM en espacio real se genera al aplicar la transformada inversa de Fourier a la función de onda de los electrones transmitidos, en ella se encuentra contenida toda la información de la interacción de los electrones con la muestra.

Al formar una sonda de electrones de tamaño nanométrico, la caracterización de TEM permite identificar y cuantificar la estructura química y electrónica de los nanocristales de manera individual. Su aplicación más importante es la imagen atómica en espacio real de las nanopartículas, para conocer su microestructura, morfología y tamaño.

En la formación de imágenes de microscopia electrónica de transmisión se presentan tres mecanismos fundamentales de contraste en las imágenes:

- Difracción, ocasionado por perturbaciones locales a causa de defectos en la muestra, estas interacciones locales modifican la amplitud de la onda transmitida, lo que al generar la imagen se traduce en regiones de contraste que permiten identificar zonas de alta difracción y por tanto identificar estructuras cristalinas en las muestras.
- Fase, a causa de la interacción con el potencial del cristal, el cual se debe a la distribución o densidad electrónica del mismo, lo que modificara la onda transmitida como consecuencia de interacciones inelásticas de los electrones con la muestra. Esto permite identificar zonas en la muestra que son electrónicamente más densas, aunque esto no se relaciona directamente con la identificación de arreglos atómicos de largo alcance.

- Espesor o Número Atómico, causado por la densidad de átomos y número atómico con los que interactúa la onda transmitida. En este contexto prevalecen interacciones inelásticas en la que existe mayor contribución a la disminución de intensidad como consecuencia de pérdida de energía por fenómenos de retrodispersión.

El microscopio tiene dos métodos de operación que se fundamentan en el filtro de información aportada por la onda transmitida mediante arreglos de detectores, lentes y aperturas adecuadas:

- Campo brillante, la imagen es formada por los e^- transmitidos. En estas imágenes se pueden identificar que las regiones con mayor densidad aparecen más oscuras, en tanto que, las de menor densidad serán más brillantes
- Campo oscuro, la imagen está formada por los electrones difractados. En este caso, las regiones más densas (mayor número atómico y con estructura cristalina) aparecen más brillantes, en caso contrario se muestran de manera más oscura.

Un microscopio empleado para caracterización por TEM moderno convencional se compone de un sistema de iluminación, un soporte para la muestra, un sistema de lentes objetivas, un sistema de aumento, un sistema de registro de datos y un sistema de análisis químico (véase [Fig. 12](#)).

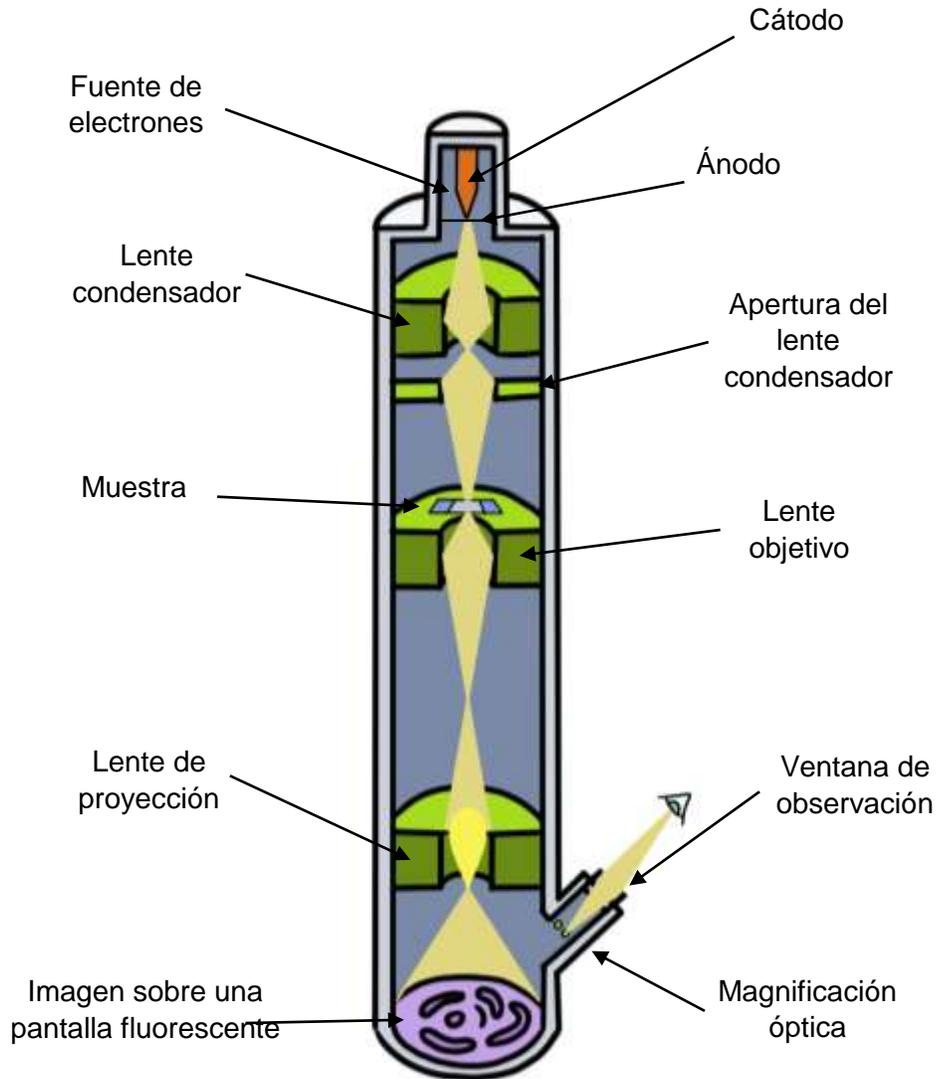


Fig. 12 Diagrama de un microscopio electrónico de transmisión.

II.B.4 Microscopía infrarroja con transformada de Fourier

Es una técnica utilizada en el estudio de sistemas biológicos y se basa en la espectroscopia de infrarrojo con la microscopia óptica. Una de sus ventajas es que recoge los datos espectrales de todas las longitudes de onda simultáneamente.

Para la medición de los espectros de FT-IR se usa la técnica de la reflectancia total atenuada (ATR), donde la luz de IR pasa a través de un cristal (que puede ser de

diamante, seleniuro de zinc o germanio) e interactúa con la muestra que está colocada justo debajo de este.

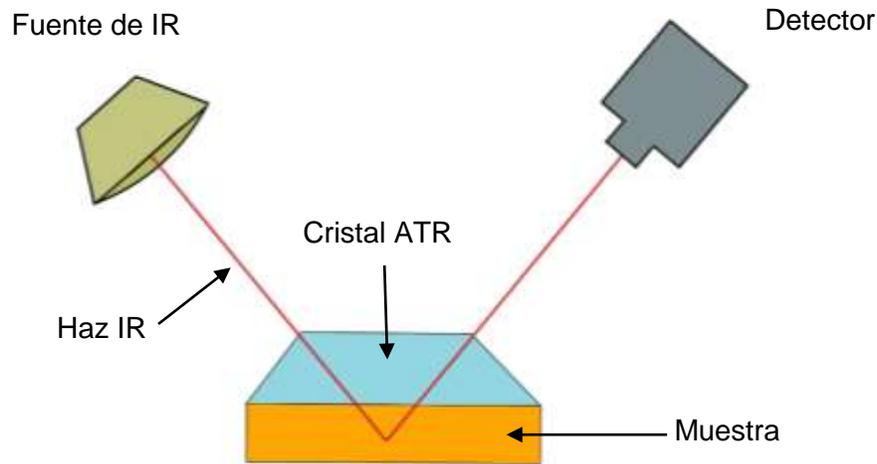


Fig. 13 Diagrama del fundamento del funcionamiento de la espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier.

II.B.5 Espectroscopia RAMAN

Es un fenómeno de dispersión inelástica de la luz por la interacción con materia, se utiliza para monitorear procesos de cristalización y revelar los mecanismos de reacción y cinética. En la espectroscopia Raman se hace incidir un haz de luz sobre la materia y se estudia la radiación dispersada. Una vez que incide el haz de luz sobre la muestra induce un estado excitado, el cual implica un proceso de relajamiento, dentro del cual pueden ocurrir dos mecanismos de liberación de energía (véase **Fig. 14**):

- Dispersión elástica o de Rayleigh: La materia regresa al estado energético basal en el que se encontraba, por lo que libera una energía de igual magnitud a la absorbida.
- Dispersión inelástica: La energía liberada es distinta de la absorbida, lo que da lugar a un intercambio de energía. Este comportamiento es característico del fenómeno Raman y se divide en dos tipos:

- **Dispersión Stokes:** La energía liberada es menor a la absorbida, por lo que aumenta la longitud de onda y disminuye la frecuencia de la radiación.
- **Dispersión anti-Stokes:** La energía liberada es mayor a la absorbida, lo que disminuye la longitud de onda y aumenta la frecuencia de la radiación.

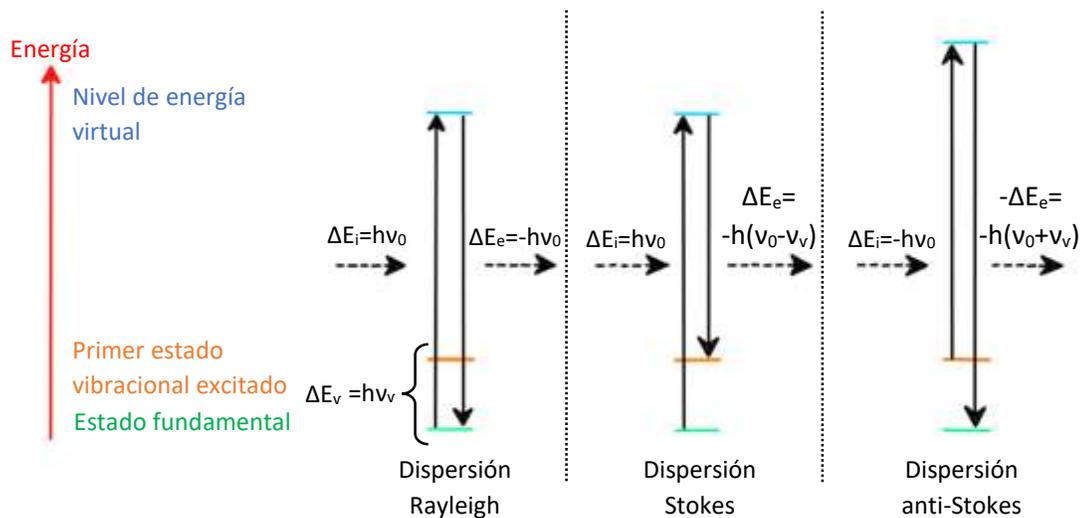


Fig. 14 Mecanismo de liberación de energía en el fenómeno Raman.

El espectro Raman que se obtiene se representa en una gráfica de intensidad como función de frecuencia, lo que permite identificar modos vibracionales mediante las frecuencias asociadas a la cuantificación del desplazamiento entre la energía del haz incidente y el dispersado.

Un equipo Raman se compone de una fuente de excitación, que genera el haz de fotones que incidirá en la muestra, los espejos y el enfoque que mejoraran la calidad de la señal que llega al detector, tras dispersarse la muestra, el eliminador de la dispersión elástica (que filtra la señal Raman), las rejillas que dispersan la señal y el detector (véase **Fig. 15**).

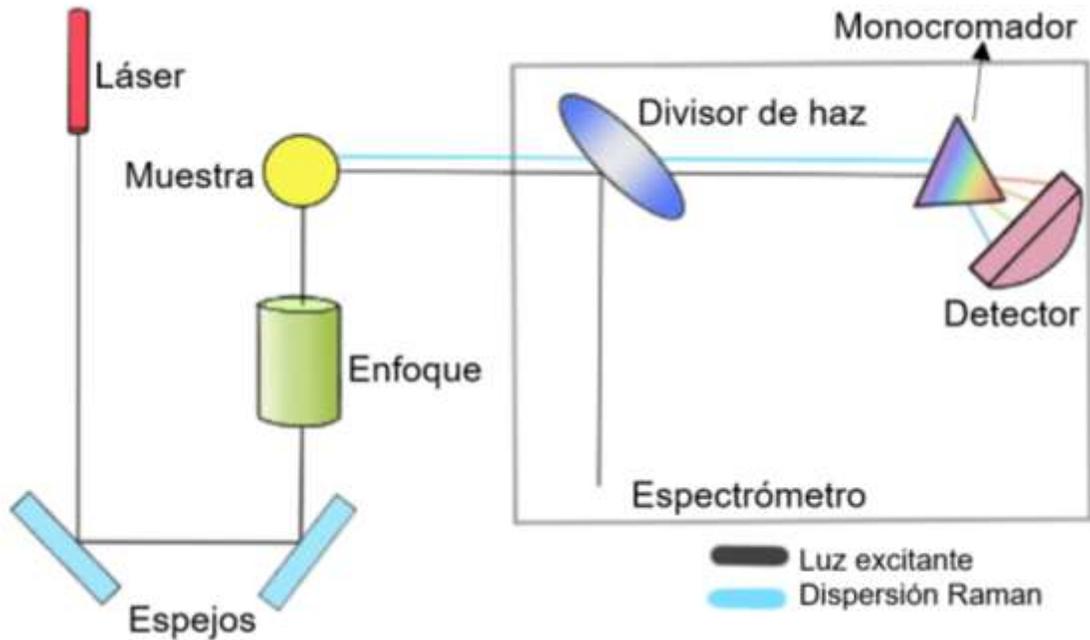


Fig. 15 Diagrama de un equipo Raman.

II.B.6 Antibiograma

Utilizada como prueba microbiológica para determinar la efectividad de un antibiótico o sustancia para evitar el crecimiento bacteriano. Se realiza tomando un inóculo del microorganismo problema y se siembra en una caja petri con medio de cultivo Müller-Hinton, posteriormente se colocan los discos, con el antibiótico o la sustancia, sobre el medio de cultivo dejando una separación entre disco y disco. Se incuba a 37°C durante el tiempo que, según la literatura, necesite cada microorganismo para crecer (Véase **Fig. 16**).

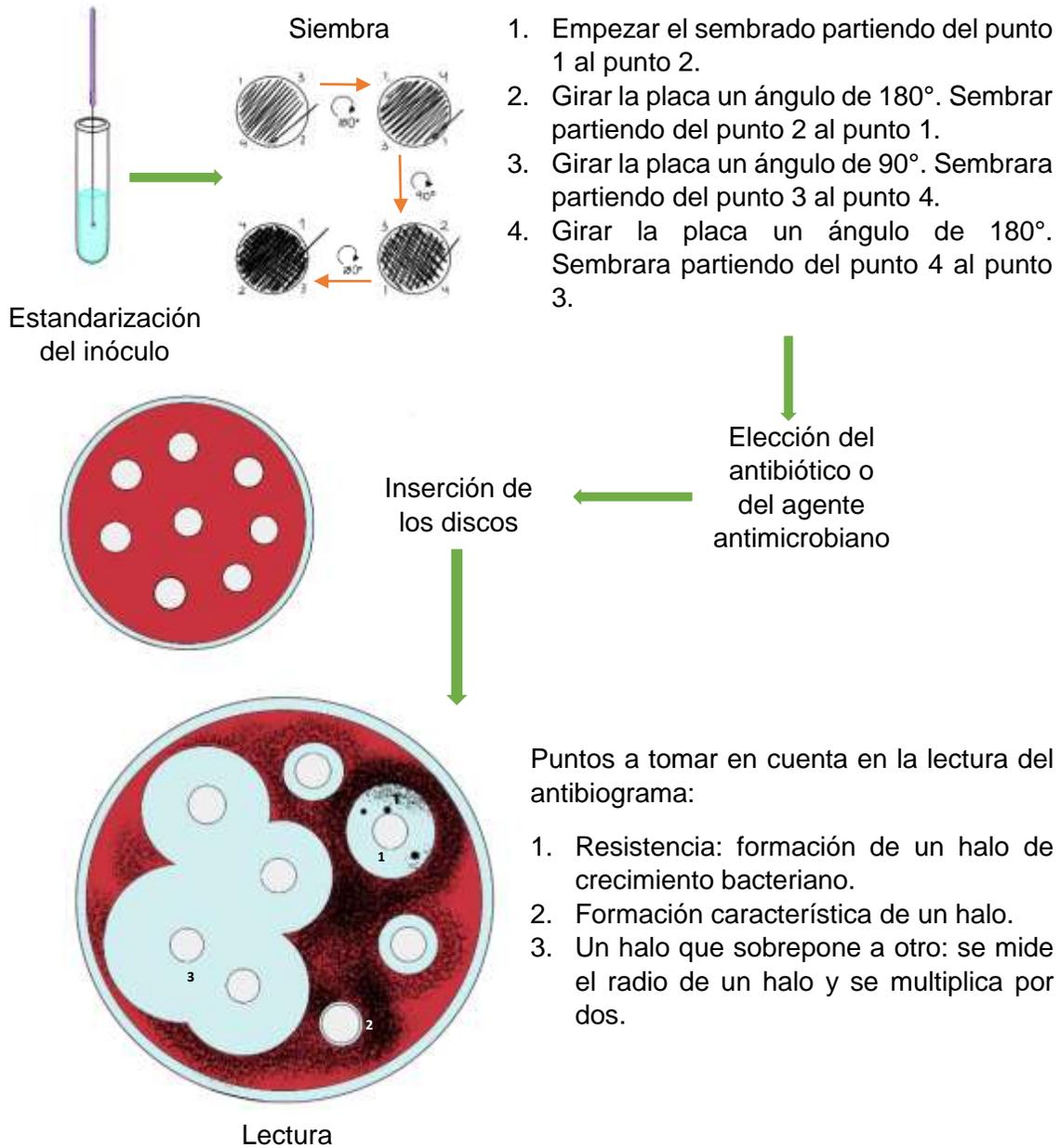


Fig. 16 Esquema de los pasos a seguir para la realización de un antibiograma.

Para determinar la efectividad del antibiótico o la sustancia analizada se debe observar la inhibición del crecimiento bacteriano y la propagación por el resto del medio de cultivo por difusión. La lectura de resultados de la sensibilidad del microorganismo frente al antibiótico o sustancia se realiza acorde con lo indicado en la **Tabla 12**.

Tabla 12 Interpretación del halo de inhibición del antibiograma.

<i>Resultado</i>	<i>Halo de inhibición</i>
<i>Sensible</i>	Grande
<i>Sensibilidad intermedia</i>	Mediano
<i>Resistente</i>	Inexistente o muy pequeño

II.B.7 Prueba de concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima bactericida (MBC)

Estas pruebas son utilizadas como métodos para la cuantificación de la actividad antimicrobiana y en la determinación de las concentraciones apropiadas requeridas para un producto final, generalmente de uso farmacéutico.

Estas pruebas se realizan en conjunto, ya que la información proporcionada por ambas es la que permite establecer un criterio de evaluación para el análisis de la actividad antimicrobiana. La descripción general del procedimiento para llevarlas a cabo se encuentra en las [Fig. 17](#) y la [Fig. 18](#).

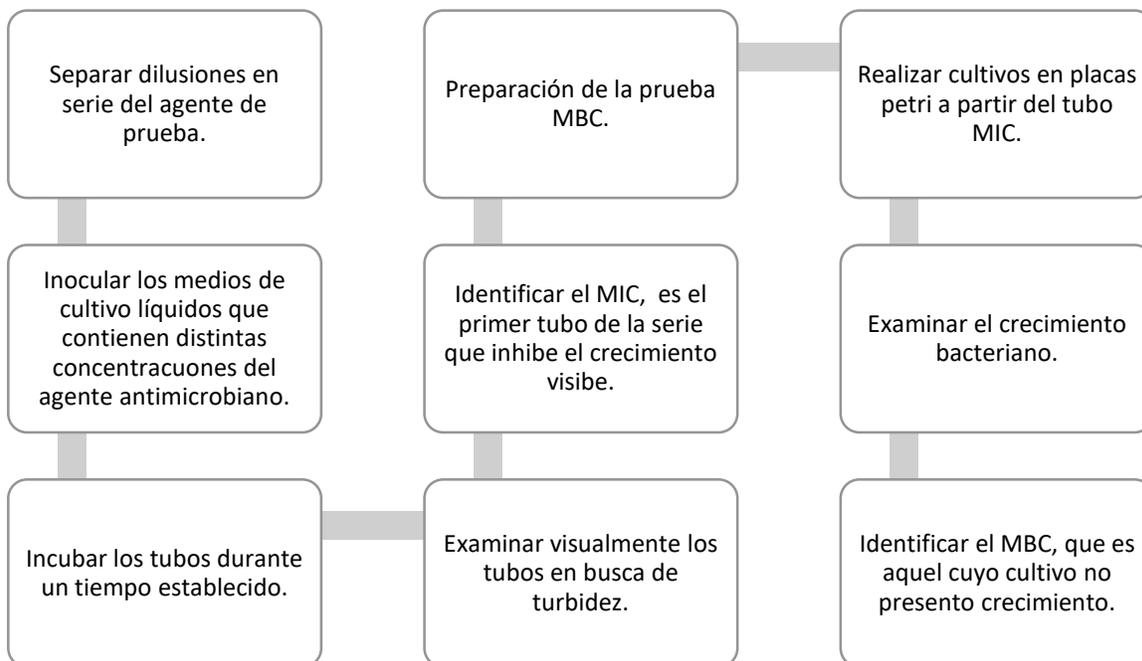


Fig. 17 Pasos para realizar un análisis MIC y MBC.

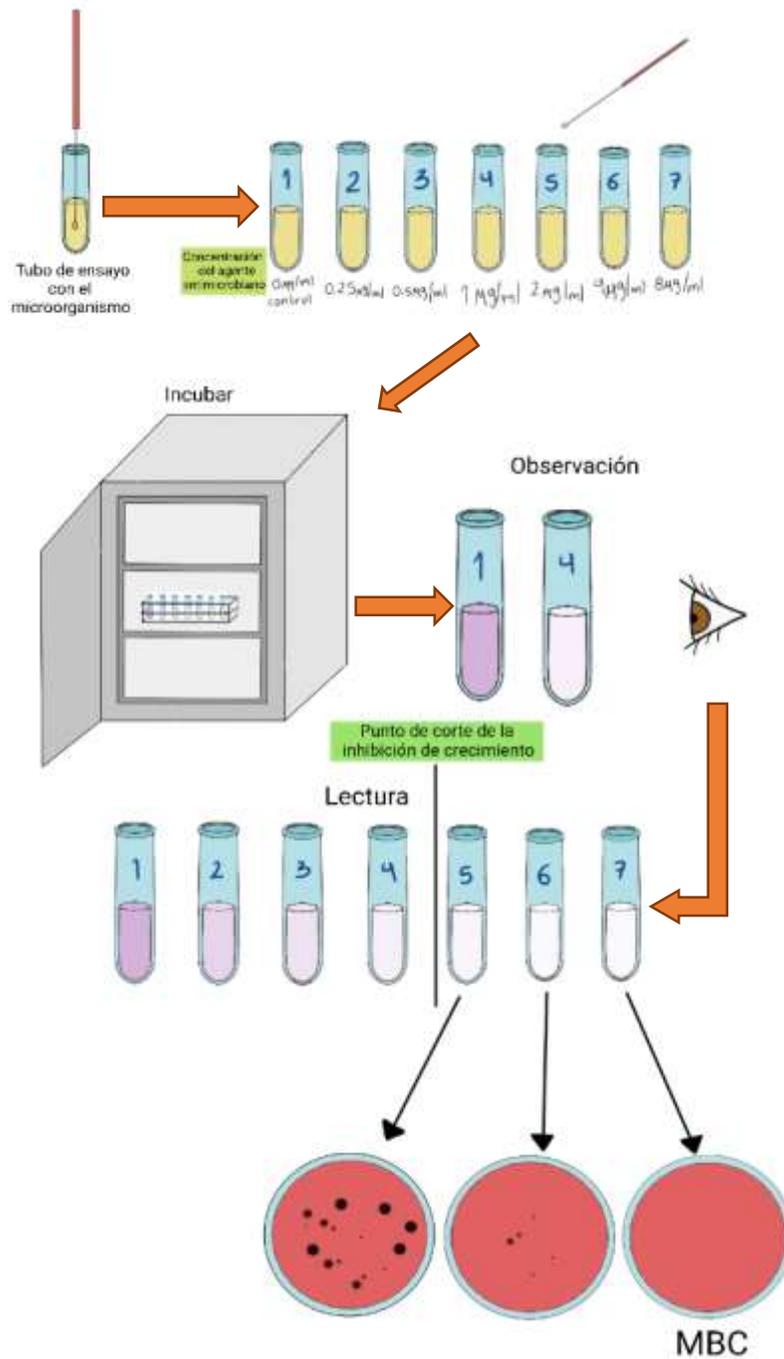


Fig. 18 Proceso para realizar un MIC y un MBC.

La prueba MIC determina la concentración mínima inhibitoria necesaria de un agente antimicrobiano, es decir, aquella necesaria para inducir un efecto bacteriostático contra una bacteria específica.

La prueba MBC determina la concentración mínima bactericida de un agente bacteriostático específico, es decir, aquella requerida para inducir la muerte de una bacteria en un periodo fijo.

II.B.8 Viabilidad bacteriana LIVE/DEAD BacLight – Espectroscopia

Este método se usa para conocer la viabilidad e integridad de las bacterias, que componen una colonia bacteriana, en función de la integridad de su membrana celular. Proporciona información que permite distinguir y cuantificar las bacterias vivas y muertas.

Normalmente los kits utilizados para realizar este método basan su principio en tinciones, especialmente con el uso de los marcadores SYTO®9 así como yoduro de propidio (PI). El uso de estos marcadores se debe a que las células consideradas viables, tienen membranas celulares intactas y firmes que impiden el paso de algunos compuestos de tinción, mientras que las células que han muerto tienen membranas rotas que no impiden el paso de los compuestos de tinción (véase [Fig. 19](#)).

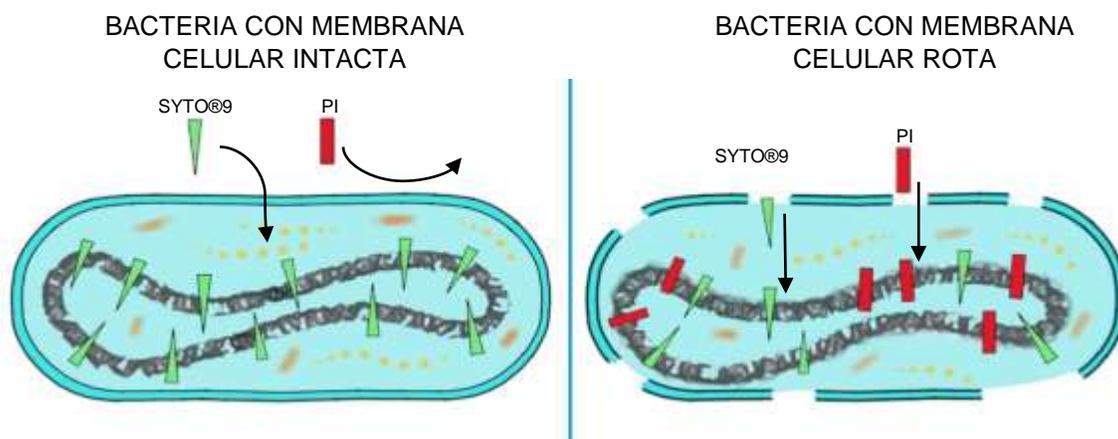


Fig. 19 Ejemplificación de cómo interactúan los colorantes de tinción con la membrana bacteriana.

CAPITULO III

FABRICACIÓN DEL “DISPOSITIVO ORTOPÉDICO”

III.A DISEÑO DEL DISPOSITIVO ORTOPÉDICO

El diseño de un recubrimiento para un implante ortopédico, mejorado con nanoestructuras (nanopartículas), requiere el análisis de las características generales que le permitan tener una fuerte actividad biocida y una buena osteointegración, sin que se comprometan sus propiedades mecánicas. Estas características pueden dividirse inicialmente en dos, las relacionadas con el recubrimiento y aquellas atribuidas a las nanopartículas.

El proceso de osteointegración que ocurre como resultado de una buena aceptación del implante (véase [Fig. 20](#)) se da de la siguiente manera:

1. Respuesta inflamatoria: Ocurre una vez que el implante se coloca en el cuerpo, lo que origina la formación del coágulo sanguíneo y de la matriz de fibrina (por liberación de proteínas y citosinas).⁴³
2. Osteoinducción: Se da cuando las células madre se diferencian en las células osteogénicas que forman el tejido óseo,⁴⁴ al mismo tiempo que ocurre la angiogénesis (formación de vasos sanguíneos).⁴³
3. Osteogénesis: Las células osteogénicas forman sitios de nucleación para el crecimiento de nuevo material óseo. Esto se puede dar de dos formas:
 - Osteogénesis de contacto: La formación del tejido óseo se da por las células osteoprogenitoras, desde la superficie del implante hacia el hueso circundante. Forma el tejido óseo a una velocidad 30% mayor que la osteogénesis a distancia y depende esencialmente de la biocompatibilidad del material y sus características superficiales.⁴⁴
 - Osteogénesis a distancia: La formación de tejido óseo se da por las células osteoprogenitoras que proliferan desde la superficie del hueso circundante hacia el implante.⁴⁴
4. Osteoconducción: Es la colonización del implante por las células osteoprogenitoras, se da por una adecuada formación y viabilidad del hueso,

con la presencia de osteocitos alrededor implante, esto permite una correcta osteointegración en la interfaz de contacto hueso-implante.⁴⁴

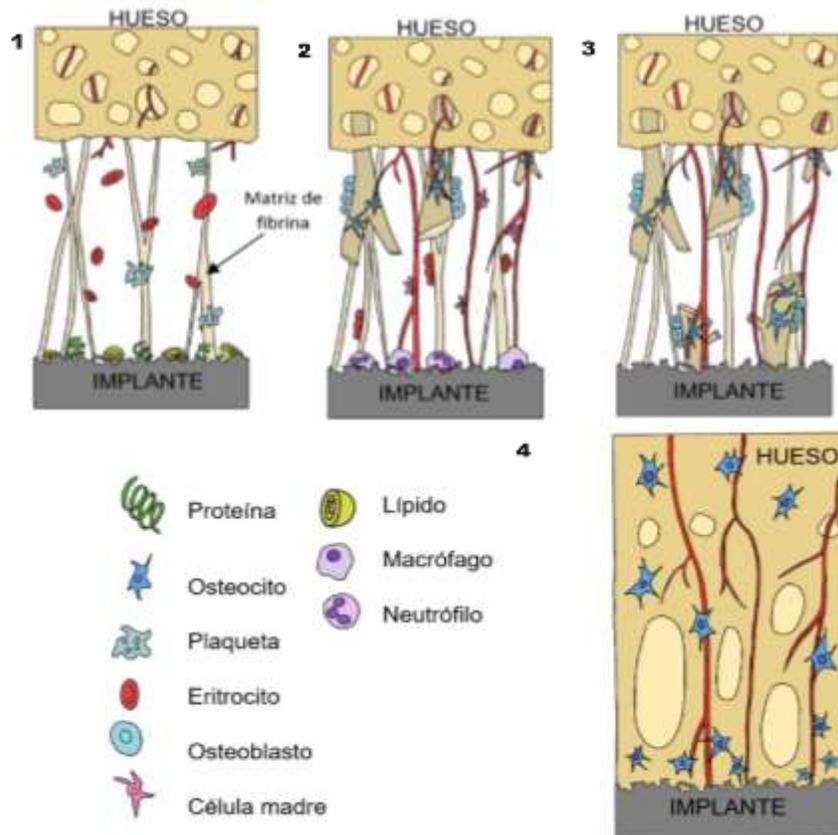


Fig. 20 Etapas del proceso de osteointegración: 1) Respuesta inflamatoria, 2) Osteoinducción, 3) Osteointegración y 4) Osteoconducción.

A continuación, se describen los principios que se consideraron para el diseño del dispositivo ortopédico propuesto en esta tesis, esto, con la finalidad de lograr una buena implantación y fijación del mismo.

III.A.1 Capa bioactiva (Recubrimiento)

Las características de la capa bioactiva deben promover una oposición ósea superior, una fijación más fuerte y reducir el tiempo de curación de la lesión, para lograr esto, fue necesario tomar en cuenta lo siguiente:

Rugosidad

Determina la superficie de contacto entre el implante y el hueso, lo que influye directamente en la velocidad de crecimiento del hueso circundante hacia el implante para integrarlo. Esto se debe a que entre mayor sea la irregularidad de la superficie existirá una mayor superficie de contacto entre el implante y el hueso circundante, mejorando así la fijación a largo plazo.⁴⁵ Esto se puede observar en la [Tabla 13](#), basada en un estudio realizado por *Borsari et. al.*, con recubrimientos de HAp sobre Ti a diferentes rugosidades.⁴⁶

Tabla 13 Importancia de la rugosidad en el diseño de los recubrimientos para implantes.

Rugosidad media aritmética (Ra)	Rugosidad	Característica
4 μm	Baja	Baja adhesión entre el recubrimiento de HAp y el Ti.
18 μm – 40 μm	Media y alta	Mayor adhesión y reacción celular.
74 μm	Ultra alta	Menor adhesión y proliferación celular.

Además, se ha establecido que las modificaciones superficiales en las dimensiones nanométricas tienen influencia en la morfología, orientación y adhesión celular.⁴⁴ Por lo que se considera una rugosidad media y alta (entre 18 – 40 μm), para generar una buena integración entre el implante y el recubrimiento.

Espesor

El espesor determina la resistencia mecánica del recubrimiento y la tasa de crecimiento óseo a su alrededor. Una capa delgada se absorbe a mayor velocidad, lo cual no permite un crecimiento óseo suficiente a su alrededor, mientras que, una capa demasiado gruesa puede ser más frágil y corre el riesgo de desprenderse durante el procedimiento quirúrgico. Se ha reportado que los recubrimientos con un espesor en el rango de 25 – 100 μm , poseen buena estabilidad,⁴⁵ mientras que los de un espesor mayor a 150 μm son frágiles. Esto se debe a flujos de calor durante el depósito del recubrimiento, lo que ocasiona aceleraciones en los mecanismos de transferencia de calor por conducción así como de radiación, afectando en mayor

medida a los revestimientos más gruesos debido a los tiempos de pulverización prolongados que son necesarios para su crecimiento.⁴⁷ Adicional a esto se ha mencionado que el daño causado al sustrato por las grietas más grandes en los recubrimientos más gruesos es mayor que el daño al sustrato por las grietas más pequeñas en los recubrimientos delgados. Sin embargo, el espesor del recubrimiento puede variar dependiendo del sitio donde será colocado el implante. A continuación, en la **Tabla 14**, se muestran distintos espesores reportados para tipos específicos de prótesis.⁴⁵

Tabla 14. Rango de espesores para recubrimientos utilizados en distintas prótesis.

<i>Tipo de prótesis</i>	<i>Espesor</i>
<i>Cadera</i>	3 – 8.4 mm
<i>Rodilla</i>	425 – 710 μm
<i>Tobillo</i>	75 – 200 μm

Con base en lo antes mencionado se estableció un rango alto de espesor para el recubrimiento propuesto.

Pureza del recubrimiento

Los recubrimientos de HAp generalmente poseen una pureza superior al 90%, con la presencia de carbonatos (CO_3^{2-}) o hidrogeno fosfatos (HPO_4^{2-}) como impurezas. Posee una relación molar Ca/P de 1.67,⁴⁵ lo que permita reemplazar el hueso casi por completo sin afectar ninguna de sus funciones.

Cristalinidad

Determina la rapidez de reabsorción de las sales de calcio o HAp para permitir una integración rápida y duradera de los recubrimientos. Este parámetro es importante debido a que influye en la durabilidad de la unión mecánica entre el recubrimiento y el metal, así como en la liberación de partículas desde el revestimiento.⁴⁸ Esto se puede observar en la **Tabla 15**, donde se analiza el comportamiento de los recubrimientos de HAp con cristalinidades del 50% y del 75%.

Tabla 15 Influencia de los recubrimientos de HAp, con cristalinidades de 50% y 75%, en la fijación de los implantes. *Overgaard S. et al.*⁴⁸

Cristalinidad (%)	Comportamiento		
	16 semanas	32 semanas	>32 semanas
HAp-50%	Se triplica la fijación de los implantes en comparación con los implantes de HAp-70%. Hay un 100% más de crecimiento óseo.	Se mantiene estable, sin ningún cambio. Se eliminó más recubrimiento de HAp, en comparación con aquellos de HAp-70%.	No se muestra pérdida adicional de HAp en el revestimiento.
HAp-75%	Se mantuvo estable, sin ningún cambio.	Aumento la fijación del recubrimiento.	

Con base a lo indicado en la **Tabla 15** podemos observar dos fases de reabsorción del recubrimiento, una pérdida inicial rápida y una posterior lenta.⁴⁸ Del mismo modo también se muestra que los recubrimientos con una alta cristalinidad (75%) tardan más en reabsorberse, por lo que la integración entre el implante y el hueso es más lenta. Por otro lado, cuando se tiene un recubrimiento con menor cristalinidad (50%) o una estructura más amorfa, se disuelve en un medio con pH neutro con mayor rapidez,⁴⁵ los estudios de *Overgaard S. et al.* También mostraron que el recubrimiento de HAp reabsorbido fue reemplazado en parte por tejido óseo, por lo que se espera que la fijación del implante sea duradera.⁴⁸ Lo descrito anteriormente sugiere que se necesita una proporción adecuada entre las sales cálcicas amorfas y la HAp para lograr una integración rápida y duradera entre el implante y el hueso.

Porosidad

Se refiere a la presencia de pequeños orificios o espacios en donde pueden proliferar los osteoblastos que permitirán la integración del implante.⁴⁵ Los poros promueven que los implantes con una estructura porosa generen una rápida y mejor formación de hueso. Esto se debe a que los poros mejoran la permeabilidad de los implantes y generan espacios para los intercambios de nutrientes, lo que a su vez mejora la biocompatibilidad y el potencial de osteointegración.⁴³

Existen parámetros que permiten evaluar y determinar las propiedades mecánicas de los implantes porosos, estos son, porosidad, tamaño e interconectividad de los poros. A continuación, se describen los criterios de evaluación de cada uno de ellos.

Porosidad: Se define como el porcentaje de espacio vacío que hay en una estructura sólida y se calcula con un método gravimétrico con la ecuación:

$$\rho = \left(1 - \frac{\rho_{estructura}}{\rho_{material}}\right) \cdot 100\%$$

Donde:

$\rho_{estructura}$, es la densidad de la estructura porosa.

$\rho_{material}$, es la densidad del material a granel.

La porosidad juega un papel importante en el diseño de un recubrimiento, y de esta dependen la diferenciación, el reclutamiento, la agregación y la vascularización celular.⁴⁹ Generalmente la porosidad del hueso esponjoso varía del 30% al 95% o del 50% al 90%.^{42,43} Las propiedades generadas por la porosidad se encuentran definidas en la siguiente tabla:

Tabla 16 Propiedades otorgadas a los biomateriales según su grado de porosidad.

	<i>Descripción</i>
<i>Elevada porosidad</i>	<p>Expande el área de superficie disponible para la adhesión y proliferación celular.</p> <p>Mejora el potencial de vascularización y perfusión con la finalidad de lograr la integración del implante.</p> <p>Disminuye las propiedades mecánicas y su resistencia a la corrosión.</p>
<i>Elevada porosidad</i>	<p>In vitro: Aumenta la proliferación y el transporte de oxígeno y nutrientes.</p> <p>In vivo: Apoya el crecimiento del tejido y la formación del hueso.</p>
<i>Baja porosidad</i>	<p>In vitro: Apoya la agregación celular y la diferenciación osteogénica.</p>

*Liu Y. et al.*⁴³, *J. Faig-Martí et al.*⁴⁵

*S. Sundelacruz et al.*⁴⁹

Como se muestra en la **Tabla 16**, se tienen mayores beneficios con estructuras de porosidad elevada; no obstante, esto también puede generar una deficiencia en las propiedades mecánicas del recubrimiento, por lo que se sugiere buscar un punto de equilibrio que permita optimizar el diseño del implante.

Tamaño de poro: El tamaño del poro modula las propiedades de infiltración, migración, proliferación, distribución celular, el depósito y distribución de la ECM (matriz extracelular), que tienen como objetivo el intercambio de nutrientes y oxígeno.⁴⁹ El tamaño de poro es un parámetro que ha sido ampliamente discutido, pues no se ha llegado a un consenso general. Algunos autores mencionan que el tamaño mínimo de poro para permitir la generación de hueso mineralizado y la migración de osteocitos debe ser de 100 μm .⁴³ Sin embargo se ha observado que los poros de menores tamaños favorecen la condrogénesis, seguida de la osteogénesis. Por otro lado, los poros grandes favorecen la osteogénesis directa, pueden reducir el módulo de Young y el límite elástico, lo que puede disminuir la rigidez y la resistencia mecánica del implante.^{43,49} Otros autores establecen tamaños diferentes de poros que mantienen las propiedades deseadas para el diseño de un recubrimiento (véase **Tabla 17**).

Tabla 17 Propiedades conferidas a biomateriales con diferentes tamaños de poro.

<i>Tamaño de poro</i>	<i>Descripción</i>
10 – 75 μm	Fomentan el crecimiento del tejido fibroso.
100 – 400 μm	Favorecen la osteointegración.
200 – 300 μm	Benefician la formación de capilares para formar una red de vasos sanguíneos.
500 μm	Mejor formación del hueso en el lecho del hueso esponjoso.
600 μm	Elevada capacidad de fijación.
	<i>Liu Y. Et al.</i> ⁴³
50 – 100 μm	Promueven el crecimiento óseo.
100 – 300 μm	Beneficia el crecimiento óseo.

*Sundelacruz S. et al.*⁴⁹

Interconectividad de poros: Determina la circulación de sangre y la migración celular al núcleo del implante, por lo que está estrechamente relacionada con la permeabilidad, es decir; la capacidad de transmitir una sustancia a través de un material poroso. Una estructura porosa de alta conectividad facilita el

intercambio de células, proteínas y nutrientes a través del implante, lo cual es esencial para el proceso de osteointegración.⁴³

Con fundamento en lo antes mencionado se ha demostrado que existen diferentes parámetros a considerar en el diseño de un implante poroso, pero ciertamente se pueden sugerir rangos de trabajo para el diseño y fabricación de un recubrimiento.

Se propone que el prototipo de implante debe cumplir con los siguientes parámetros:

- Porcentaje de porosidad comprendido entre el 30 % y 95 % para asemejar a la porosidad del hueso.
- Tamaño de poro:
 - En el rango de 50 a 100 μm , que funcionaran como microporos para favorecer la interconectividad entre los mismos.
 - En el rango de 200 a 500 μm , que funcionara como macroporos para la infiltración, migración, proliferación y distribución celular

Unión entre la prótesis y el recubrimiento

Un factor importante para considerar es el mecanismo que se utilizara para generar una fuerte unión entre la interfaz prótesis-recubrimiento, esto se debe a que, si no se realiza de forma correcta, se corre el riesgo de que el recubrimiento se desprenda durante el procedimiento quirúrgico de implantación.

Se toma como referencia el diseño utilizado por *Kou et al.*⁵⁰ donde considera una multicapa basada en Ti e HAp, con diferentes concentraciones, a fin de realizar un cambio gradual entre los materiales que permita lograr una buena unión entre la prótesis y el recubrimiento, como se muestra en la **Tabla 18**.

Tabla 18 Composición de las distintas capas de un recubrimiento de HAp.

<i>No. De capa</i>	<i>Material</i>	<i>Espesor de la capa</i>
1	Ti pulverizado	38.6 μm
2	35% Ti y 43.9% HAp	21.9 μm
3	95.8% HAp	8.6 μm

Con fundamento en lo reportado, donde se establece que esta estructura permite que el material se incorpore de mejor manera y a su vez minimice el riesgo de desprendimiento del recubrimiento, se tomó como base para realizar la propuesta de diseño del recubrimiento propuesto en esta tesis.

III.A.2 AgNPs con elevada actividad biocida y baja citotoxicidad

Las nanopartículas de plata con propiedades bactericidas y bacteriostáticas deben ser biocompatibles y con bajo grado de citotoxicidad. La funcionalidad de las AgNPs en general puede describirse en términos de algunas características en relación con el control de algunos parámetros, como se comenta a continuación.

1. Buen control de la química de superficie para que la nanopartícula tenga una alta estabilidad de dispersión frente a la agregación.²⁵
2. Baja estabilidad química que permita promover la liberación de iones.²⁵
3. Carga superficial positiva para mejorar la unión superficial con la membrana celular.²⁵
4. Buen control de tamaño para lograr una mayor área superficial, que incremente la interacción con las bacterias, sin generar un alto grado de citotoxicidad al ser eliminadas por vía renal.
5. Concentraciones mínimas necesarias para generar un efecto antimicrobiano sin producir citotoxicidad o daño en las células sanas del paciente.

Existe un rango de tamaño donde la nanopartícula posee una habilidad de penetración superior, esto se debe a que conforme el tamaño de la nanopartícula disminuye, aumenta la relación superficie-volumen, lo que genera una mayor área de interacción de la AgNPs con las membranas de las bacterias.²⁰ Para poder establecer un rango de tamaño adecuado se revisaron los resultados reportados en diferentes artículos y se condensaron en la [Tabla 19](#).

Tabla 19 Propiedades antibacterianas de las AgNPs con dependencia del tamaño.

<i>Artículo</i>	<i>Tamaño</i>	<i>Propiedades antibacterianas</i>
-----------------	---------------	------------------------------------

<i>Silver nanoparticles as potential antibacterial agents.</i> ²⁰	5.5 nm	Actividad biocida optima contra <i>S.aureus</i> a una MIC de 0.2 – 4 µg/ml
	13.5 nm	Actividad biocida optima contra <i>S.aureus</i> a una MIC > 33 nM
	10 – 15 nm	Actividad biocida optima contra <i>S.aureus</i> a una MIC 100 µg/ml
	21nm	Actividad biocida optima contra <i>P. aeruginosa</i> a una MIC de 75 µg/ml
	20 – 30 nm	Actividad biocida optima contra <i>P.aeruginosa</i> a una MIC 20 µg/ml
	< 30nm	Actividad biocida optima contra <i>S. aureus</i> y <i>K. pneumoniae</i> .
	55 nm	Actividad biocida optima contra <i>S.aureus</i> a una MIC de 0.25 µg/ml
<i>Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity.</i> ²¹	< 10 nm	Contacto célula–partícula más eficiente.
	20 – 80 nm	Toxicidad por liberación de iones de plata.
<i>Antibacterial activity of silver nanoparticles: Structural effects.</i> ²⁵	1 – 10 nm	Actividad biocida optima contra <i>P. aeruginosa</i> y <i>S. typhus</i> . Mecanismo de acción por adherencia a la membrana bacteriana.
	5 nm	Actividad biocida optima contra <i>S.aureus</i> a una MIC de 70 µg/ml y una MBC de 80 µg/ml.
	9 nm	Elevada actividad bactericida.
	10 nm	Posee una alta tasa de liberación de iones.
<i>Perturbation of cellular mechanistic system by silver nanoparticle toxicity: Cytotoxic, genotoxic and epigenetic potentials.</i> ²⁶	< 10 nm	Actividad biocida por liberación de iones.
	> 10nm	Efecto directo o específico de la partícula sobre la célula.
<i>Silver nanoparticles: therapeutical uses, toxicity and safety issues.</i> ⁵¹	13.5 nm	Alteración de la permeabilidad de la membrana y la respiración celular de <i>P. aeruginosa</i> .
<i>Biocompatibility of silver nanoparticles and silver ions in primary human</i>	13.5	Actividad biocida optima contra <i>S.aureus</i> a una MIC de 5 µg/ml

<i>mesenchymal stem cells and osteoblastos.</i> ⁵²	
<i>Bactericidal and cytotoxic properties of silver nanoparticles.</i> ⁵³	11 nm Actividad biocida optima contra <i>S.aureus</i> y <i>P. aeruginosa</i> a una MIC de 1 y 2 µg/ml.

Con la información de la **Tabla 19** se puede sugerir un rango de tamaño de 5 – 15 nm para el diseño del dispositivo, esto a fin de que exhiba las propiedades bactericidas y bacteriostáticas deseables. Las nanopartículas de tamaños más grandes (> 10 nm) tienen como principal mecanismo de acción un efecto directo de la partícula con la célula, mientras que las nanopartículas más pequeñas (≤10 nm) poseen una mayor actividad biocida por liberación de iones de plata. Además, los tamaños de nanopartícula elegidos están en el rango de diámetro hidrodinámico aceptable (5 – 15 nm) para que el cuerpo humano pueda eliminarlas por vía renal en un periodo de tiempo razonable, esto puede prevenir que exista un riesgo de citotoxicidad a largo plazo por acumulación de nanopartículas.^{25,54} Las dimensiones de las nanopartículas elegidas poseen una MIC relativamente baja y actividad biocida específica en contra de microorganismos frecuentes en infecciones nosocomiales.

III.A.3 Recubrimiento multicapa para una prótesis ortopédica con la incorporación de plata en una matriz de hidroxiapatita.

Con base en el análisis de las investigaciones y en los conocimientos previamente desarrollados, se propone el diseño de un recubrimiento para implantes ortopédicos que posea las características y los parámetros indicados en la **Tabla 20**.

Tabla 20 Parámetros generales del recubrimiento propuesto.

	<i>Parámetros</i>
<i>Pureza</i>	> 90%
<i>Relación Ca/P</i>	1.67
<i>Cristalinidad</i>	50%
<i>Porosidad</i>	30 % - 90 %

<i>Espesor</i>	75 μm – 840 μm
----------------	--------------------------------------

La estructura general del recubrimiento se basa en una heterounión multicapa, como se muestra en la **Fig. 21**, que pretende aprovechar tanto los mecanismos bacteriostáticos como bactericidas de las nanopartículas de plata.

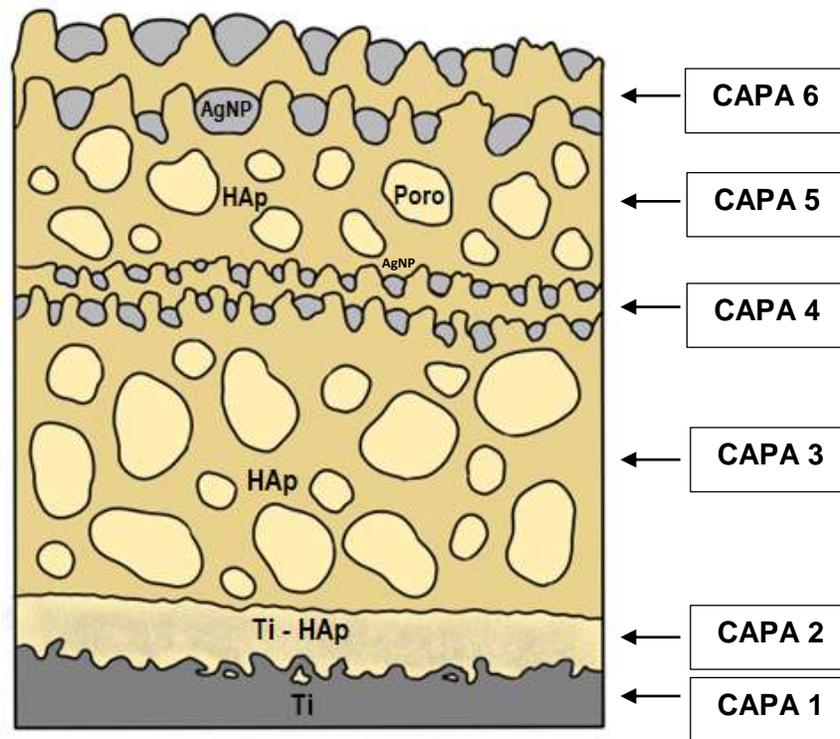


Fig. 21 Recubrimiento multicapa de HAp con AgNPs para prótesis ortopédicas.

Este diseño multicapa se propone de esta manera para aprovechar distintas propiedades, mostradas en la **Tabla 21**, que le otorguen al recubrimiento, no solo un alto grado de biocompatibilidad, sino que al mismo tiempo posea propiedades bactericidas y bacteriostáticas que permitan prevenir infecciones nosocomiales orientadas a garantizar una mayor tasa de éxito de la colocación del implante.

Tabla 21 Especificaciones y propiedades de cada capa que compone el recubrimiento.

Capa	Característica	Espesor	Especificaciones	Propiedades
1	Ti pulverizado	~ 40 μm	Rugosidad media entre 18 – 40 μm .	Mejor adhesión y proliferación celular.

2	35% Ti y ~ 40 % HAp	~ 20 μm	Menor concentración de Ti con respecto a la concentración de HAp.	Evita el desprendimiento del recubrimiento y mejora la unión entre Ti y HAp.
3	HAp al 90%	~ 1000 μm	Porosidad en el rango de 30 a 90 %. Se sugieren dos tamaños de poro en los rangos de 50 a 100 μm y de 200 a 500 μm .	Los microporos de 50 a 100 μm favorecen la interconectividad entre los mismos. Los macroporos de 200 – 500 μm , ayudan a la infiltración, migración, proliferación y distribución celular.
4	HAp con AgNPs	~ 0.015 μm	Recubrimiento de HAp con AgNPs de entre 5 a 9 nm.	Tienen actividad biocida por liberación de iones de plata
5	HAp al 90 %	~ 300 μm	Tiene una porosidad del 30 al 90 % con presencia de microporos así como de macroporos	Buscan favorecer la interconectividad, la infiltración, la migración, la proliferación y la distribución celular.
6	HAp con AgNPs	~ 0.05 μm	Recubrimiento de HAp con AgNPs de entre 10 a 15 nm.	Tienen actividad biocida por efecto directo de la partícula con la célula.

La unión gradual de la capa de Ti con la HAp, mediante la incorporación de distintas concentraciones de ambos materiales, dará como resultado una fuerte unión entre la interfaz prótesis-recubrimiento, que busca prevenir el desprendimiento de este durante la intervención quirúrgica.

Las capas porosas de HAp, con poros de distintos tamaños, funcionarán como canales de interconectividad que permitirán una buena migración, proliferación y distribución celular. Así como también favorecerán el transporte de nutrientes y oxígeno que mejorará la biocompatibilidad y osteointegración del implante, al

generar una estructura similar al hueso humano que permitirá la diferenciación, el reclutamiento y la agregación celular, tanto como la vascularización.

Para dotar al recubrimiento de propiedades bactericidas y bacteriostáticas se utilizaron algunas capas de nanopartículas de plata de distintos tamaños como mecanismos de defensa en contra de bacterias Gram positivas (*S. coagulasa negativa*, *S. aureus* y *Enterococos*) y Gram negativas (*P. aeruginosa*, *Enterobacter. spp* y *Klebsiella. spp*) que son los principales microorganismos responsables de las infecciones nosocomiales en intervenciones quirúrgicas de implantes ortopédicos.

La primera capa de nanopartículas que tiene contacto con el medio biológico se propone que debe poseer un rango de tamaños de entre 10 a 15 nm y se considera como la primera línea de defensa en contra de las bacterias y la generación de biofilms sobre la superficie del implante. Su principal mecanismo de acción se dará por contacto directo de la AgNPs con las bacterias, al interactuar con las proteínas de la pared celular y provocar una fuga del contenido celular por la creación de “pozos” en la membrana celular, que tienen como consecuencia la lisis celular, además de un transporte incontrolado de iones y bloqueo de los sitios de unión activos. También son capaces de generar interferencia en la replicación y transcripción celular, provocando daño y alteración del ADN. Además, su interacción con la cadena respiratoria deriva en una dificultad para la producción de energía. Las AgNPs previenen la formación de colonias bacterianas sobre la superficie del recubrimiento, al afectar su desarrollo y crecimiento, induciendo el desprendimiento de bacterias con rapidez y eficacia, lo que provoca la inhibición y la disminución de la adhesión de las bacterias.

La segunda capa está compuesta por nanopartículas de tamaños de entre 5 a 9 nm, su mecanismo de acción se basa en la liberación de iones, que aprovechan los fenómenos de difusión y transporte a través del material poroso. Estas nanopartículas se consideran la segunda línea de defensa presente en el recubrimiento, que lo protegerán de las bacterias que sean capaces de evadir la primera capa de nanopartículas. Los iones que liberen serán capaces de ingresar a la célula bacteriana y, mediante la generación de radicales libres provocaran daño

mitocondrial, daño al ADN por interferencia en la replicación y transcripción celular, desnaturalización de sus proteínas y lisis celular por la generación de “pozos” en la superficie bacteriana. Además, son capaces de estimular distintas vías de señalización que promoverán la inhibición de la proliferación celular, bloqueo en la división celular, necrosis y autofagia.

III.B SISTEMA DE FABRICACIÓN DEL DISPOSITIVO ORTOPÉDICO

El diseño multicapa del recubrimiento para dispositivos/implantes ortopédicos requiere de distintas condiciones de fabricación, debido a que cada capa posee propiedades y morfologías distintas, sin embargo, para fines prácticos y sabiendo que cada una de las capas tiene funciones específicas, podemos dividir el trabajo de fabricación en dos etapas: una enfocada en las primeras tres capas (Ti, Ti-HAp y HAp), cuyo propósito es mantener la unión entre la prótesis y los recubrimientos de HA con AgNPs, mientras que la segunda etapa corresponde a la síntesis de los recubrimientos de HAp con diferentes tamaños de AgNPs que tiene como finalidad servir de barrera de protección entre el implante y las bacterias.

En el presente trabajo, no se profundizará en el desarrollo de la primera etapa, sino que nos centraremos en la síntesis del material que contendrá las nanopartículas metálicas. Sin embargo, se puede mencionar que es posible lograr la primera etapa mediante la erosión catódica de la capa del Ti y de la capa de HAp con Ti, mediante la aplicación de distintas técnicas, como: ataque químico, sputtering o un tallado mecánico.

El desarrollo de la segunda etapa consiste en la síntesis y el diseño de las diferentes capas de HAp con AgNPs de distintos tamaños. Para lograr el crecimiento de las capas se propone el uso de la técnica de RF sputtering, que hace uso de un sistema de crecimiento similar al que se ilustra en la [Fig. 22](#). La técnica de sputtering es comúnmente utilizada para el depósito de películas delgadas o recubrimientos, así como de la modificación de sus superficies. La elección de esta técnica se debe a que se pretenden sintetizar capas de distintos espesores de HAp que presenten cierto grado de rugosidad superficial, estas rugosidades se emplearán como moldes

para la formación de las nanopartículas de plata, por lo que se debe tener un rango de rugosidad media acorde con el tamaño deseable de la partícula propuesta en el diseño. Además, la técnica de co-sputtering permite el depósito de dos materiales simultáneamente y el modo de funcionamiento de sputtering con radiofrecuencia permite utilizar tanto materiales conductores como aislantes, por lo que, se puede trabajar con dos blancos; en este caso con uno de HAp y el otro de Ag, de forma alterna para formar distintas capas a diferentes concentraciones de ambos materiales.

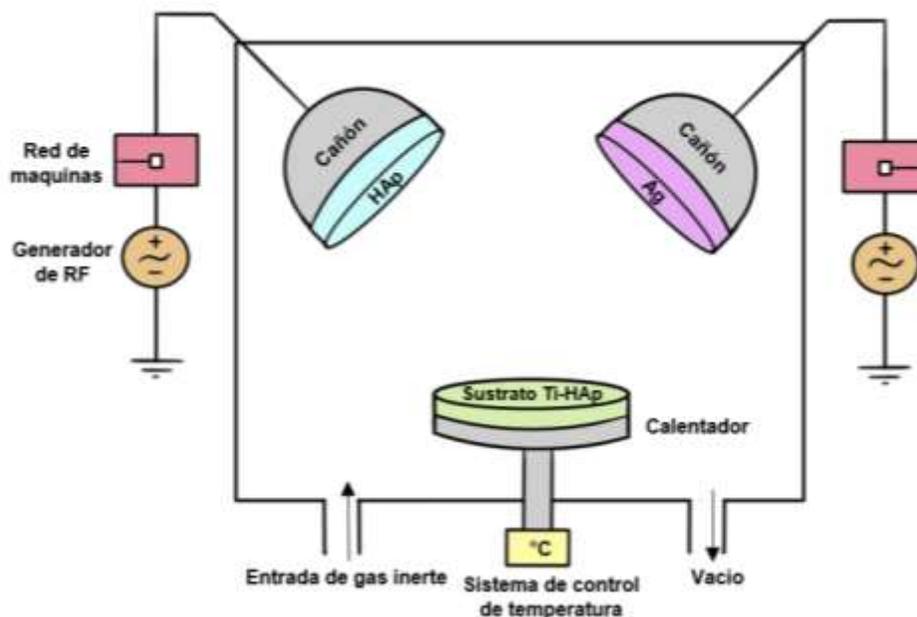


Fig. 22 Sistema de co-sputtering con RF para la síntesis del recubrimiento de HAp con AgNPs.

III.B.1 Parámetros de crecimiento del sistema

El control de la morfología y la porosidad del recubrimiento ocurre mediante la variación de diferentes parámetros de crecimiento por la técnica de sputtering, los cuales se mencionan a continuación:

Temperatura del sustrato

Es la temperatura a la que se tendrá la platina durante el proceso de erosión del material y es responsable de los cambios en las propiedades del recubrimiento que

ocurren durante el proceso.⁵⁵ Su variación traerá cambios significativos en la morfología y la porosidad del recubrimiento, por ejemplo; a temperaturas altas existe una difusión atómica rápida, lo que da como resultado un recubrimiento con una topografía montañosa (típicamente rugosa), mientras que, a temperaturas más bajas, la difusión atómica se congela, generando superficies de recubrimientos menos ásperos.⁵⁶

Tiempo de deposito

Este parámetro afecta directamente el crecimiento de la película y controla su espesor,^{55,54} además de estar ligado a uno de los parámetros de control más importantes en la técnica de sputtering: la tasa de crecimiento del material.

Potencia

La potencia aplicada a los cañones genera cambios en el espesor en el recubrimiento y es directamente proporcional a la velocidad de erosión del blanco. Es bien sabido que a menor potencia menor será la tasa de crecimiento, así que, si se quiere aumentar la tasa de depósito del material, lo lógico sería aumentar la potencia. Sin embargo, la potencia que se aplique a los cañones debe dispersarse en algún punto del sistema, y comúnmente el 75% de esta potencia calienta el sistema de refrigeración del cañón, por lo que una potencia muy elevada es la principal causa del deterioro del blanco, así como del cañón de erosión. En este sentido, es importante tener en cuenta la conductividad térmica, el coeficiente térmico de expansión, las características de resistencia mecánica y el punto de fusión del blanco.⁵⁷

Para encontrar la potencia ideal del blanco, se debe hacer un aumento gradual de la potencia a partir de densidades de potencia documentadas, como lo menciona Lesker Tech en su publicación "Practical Process Tips - Sputtering",⁵⁷ donde se da una guía para encontrar la máxima potencia que se puede administrar al objetivo sin causar grietas, sublimación o fusión.⁵⁸

Presión de trabajo

La morfología, la porosidad y la tasa de crecimiento son controladas a partir de la presión del gas, si la presión del gas disminuye habrá un ligero aumento de la tasa de depósito, por dos razones:

- Los átomos que son liberados del blanco aumentan su camino libre medio, por lo que ocurrirán menos colisiones de termalización, y una mayor concentración de átomos llegará al sustrato.⁵⁷
- Al utilizar fuentes RF o DC, el voltaje del plasma sobre el blanco aumenta, provocando que los iones que colisionan contra el blanco tengan energías más altas, maximizando el número de átomos expulsados por cada partícula de gas incidente.⁵⁷

Si la presión del gas de trabajo aumenta a un voltaje dado, existe un incremento en la recolección de iones en el cátodo.⁵⁸

Cambios en la distancia de proyección

Los cambios en la distancia de proyección generan variaciones en la tasa de depósito, en el espesor de los recubrimientos, así como cambios en las propiedades de los recubrimientos. Una disminución en la distancia de proyección genera interacciones con partículas de mayor energía y tasa de electrones perdidos, esto trae efectos benéficos al proceso de depósito, como la reducción en la tensión de la película y mejora la adhesión de monocapas. Sin embargo, también existen desventajas al disminuir la distancia de proyección, entre las que se encuentran la desgasificación excesiva del sustrato, el aumento en la tensión de compresión del sustrato y la fusión del sustrato.⁵⁷

Tamaño del objetivo

El diámetro del objetivo define el área de erosión catódica disponible, es decir, la tasa de erosión del material.⁵⁷

Número de cañones

El uso de un sistema con múltiples cañones, que almacenan diferentes materiales en cada cañón (conocido como co-sputtering) permiten generar recubrimientos de

dos o más componentes, donde los átomos de los materiales “blanco” se mezclan para inducir cambios en su estructura y en su composición.^{56,57}

Una correcta variación de los parámetros antes mencionados permitirá obtener el mejor rendimiento de erosión por parte del sistema. Este rendimiento es una variante del sistema sputtering y mide la eficiencia de la erosión catódica que se está obteniendo por parte del sistema. Y se define mediante la relación:

$$s = \frac{\text{Numero de atomos expulsados}}{\text{Particula incidente}}$$

Este valor es característico de cada material y varía dependiendo de la masa del ion entrante, el voltaje a través del cual se acelera el ion y su ángulo de incidencia sobre el blanco.⁵⁷ Además, su localización en la tabla periódica también juega un papel importante, pues se ha comprobado con elementos metálicos como el Zr, Nb, Mo, Ru, Pd y Ag, que existe un aumento continuo en s de ~0.5 a ~2.7 a medida que el elemento se recorre más a la derecha en la tabla periódica.⁵⁶

Otro valor que nos permite medir el rendimiento del sistema de pulverización es la tasa de depósito del material, la cual mide la cantidad de material depositado en la superficie del sustrato por segundo. Está definida por diferentes factores, como la densidad de potencia en la superficie del blanco, el tamaño del área de erosión, la distancia fuente-sustrato, el material objetivo y la presión del gas de trabajo.⁵⁸ Por ejemplo, a altas presiones de gas se da una disminución de la tasa de depósito, lo que afecta el crecimiento del recubrimiento, debido a que las moléculas del gas dispersan los átomos erosionados, provocando una disminución de la tasa de depósito. La masa relativa del átomo erosionado también juega un papel importante en el grado de variación de la tasa de depósito con la presión, pues mientras mayor sea la masa relativa del átomo, en comparación con el átomo del gas, es mayor la probabilidad de que mantenga su dirección hacia el sustrato sin dispersarse a otra dirección.⁵⁹

III.B.2 Crecimiento del recubrimiento

El crecimiento se da por distintas etapas que dan como resultado la condensación de los átomos sobre la superficie del sustrato para formar las películas delgadas o los recubrimientos. Estas etapas son:

Condensación y nucleación

Cuando un átomo, proveniente de un entorno al vacío, choca con la superficie del sustrato pueden ocurrir distintos fenómenos, ya sea que se refleje, evapore o condense en la superficie. Los átomos que no reaccionan de forma inmediata con la superficie permanecerán en movimiento antes de condensarse, a estos átomos móviles se les conoce como ad-átomos.⁵⁵

Crecimiento de centros de nucleación

El crecimiento de los centros de nucleación se da cuando los ad-átomos se reúnen directamente su alrededor o cuando estos se mueven sobre la superficie hasta encontrar otro centro de nucleación. Existen tres mecanismos diferentes de nucleación:

- Mecanismo de Van der Merwe: Se trata de un crecimiento por monocapas (capa por capa) y se caracteriza por lograr cubrir completamente el sustrato a bajos espesores.⁵⁵
- Mecanismo Volmer-Weber: Se da por el crecimiento tridimensional alrededor de los núcleos, lo que da como resultado la formación de islas.⁵⁵
- Mecanismo Stranski-Krastanov: Es un crecimiento de capa más isla que se da de la siguiente forma, primero ocurre el crecimiento de varias monocapas sobre el sustrato y posteriormente el crecimiento por islas.⁵⁵

Formación de la interfaz

La región interfacial es aquella en la cual el sustrato entra en contacto con el material depositado, esta región se forma mediante la difusión y posterior reacción del sustrato con el material depositado, y da origen a un material denominado “material de interfaz”. Las propiedades del material de interfaz definen las características eléctricas, electrónicas y de adhesión de los sistemas recubrimiento-sustrato.⁵⁵ Estas regiones interfaciales se muestran en la **Fig. 23** y se clasifican en:

- **Abrupta:** Se da por un cambio abrupto entre el material depositado y el material del sustrato. Por lo general, se forma debido a una reacción química débil entre el sustrato y los átomos del material depositado, una temperatura de depósito baja, contaminación de la superficie del sustrato o falta de solubilidad entre el material de superficie y el material depositado.⁵⁴
- **Mecánica:** Se caracteriza por “rellenar” las rugosidades presentes en la superficie, con el material depositado, a fin de lograr un enclavamiento mecánico. La fuerza de adhesión de esta interfaz se encuentra definida por las propiedades mecánicas del recubrimiento y el sustrato, además de verse afectada si no se rellenan las rugosidades, ya que la falta de contacto entre el sustrato y el material depositado, más los vacíos interfaciales, disminuye la adherencia.^{55,56}
- **Difusión:** Se caracteriza por un cambio gradual en la composición, a través de la región interfacial, entre el recubrimiento y el sustrato sin que ocurra la formación de un compuesto. La formación de esta interfaz se debe a la existencia de la solubilidad entre el sustrato y el recubrimiento, así como a una temperatura alta y un tiempo de depósito largo para permitir el proceso de difusión.^{55,56}
- **Compuestas:** Se caracteriza por la formación de un compuesto nuevo en la interfaz, como resultado de la reacción química, así como de la difusión entre el recubrimiento y los átomos del sustrato. Los compuestos formados suelen ser quebradizos, debido a las elevadas tensiones originadas por los cambios volumétricos presentes durante la reacción química. La adherencia del recubrimiento puede disminuir si la capa interfacial es muy gruesa, por la formación de porosidades y grietas.^{55,56}

- *Pseudo-difusión*: La interfaz se origina como resultado de la deposición simultánea de dos o más compuestos, para dar origen a la formación de una interfaz fuerte e incrementando su adhesión. Su formación se puede dar entre dos materiales insolubles, a temperaturas bajas donde sus fases no se segreguen.⁵⁵

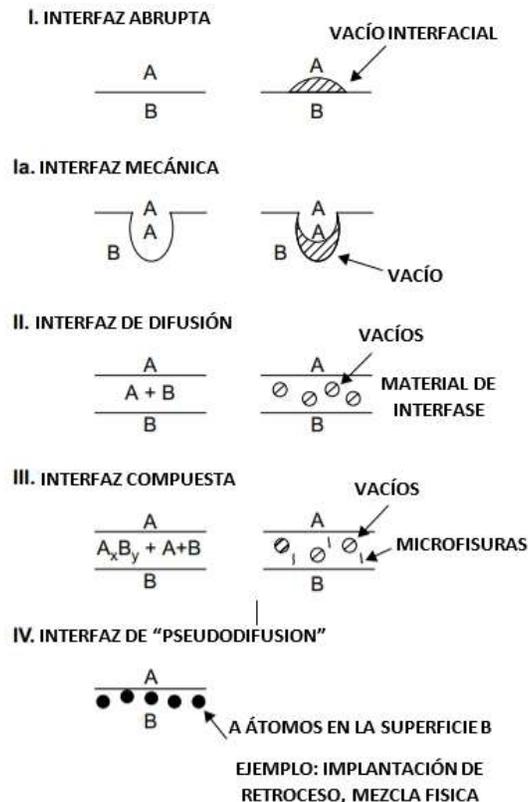


Fig. 23 Clasificación de las diferentes regiones interfaciales.⁵⁵

Crecimiento del recubrimiento

El recubrimiento crece por una constante nucleación y la reacción de los átomos del material a depositar con el material previamente depositado. Típicamente, a medida que crece el recubrimiento, hay un aumento en la rugosidad de la superficie, debido a que algunos núcleos o planos cristalográficos crecen más rápido que otros.⁵⁵ El crecimiento del recubrimiento se ve afectado por tres variables, temperatura, presión y tipo de sustrato. Además, el recubrimiento formado cerca de la interfaz toma un espesor apreciable, influenciado por el material de interfaz o el sustrato, antes de establecer un modo de crecimiento particular. Cuando el recubrimiento ya

ha establecido su modo de crecimiento se puede describir la morfología del recubrimiento mediante el modelo de la estructura de zona adaptado por Thornton, mostrado en la [Fig. 24](#), el cual suele denominarse SZM (por sus siglas en inglés, Structure Zone Model).⁵⁴ Este modelo es un diagrama de presión de trabajo contra la temperatura del sustrato, que se encuentra dividido por zonas:

- Zona 1: Aquí la difusión de los ad-átomos sobre la superficie es insuficiente para superar el sombreado geométrico característico de la superficie, lo que producirá un recubrimiento con un área superficial alta y una morfología columnar, que pueden tener diferentes formas, por ejemplo, columnas redondas y plaquetas. Tanto los materiales amorfos como los cristalinos pueden tomar el modo de crecimiento columnar.⁵⁵
- Zona T: Se forma debido al bombardeo energético de los átomos neutros, provenientes del objetivo, hacia el sustrato a bajas presiones del gas de trabajo. Estos átomos neutros erosionan los picos y llenan parcialmente los valles de la superficie, lo que resulta en la formación de una morfología fibrosa y es considerada una zona de transición entre las zonas 1 y 2.⁵⁵
- Zona 2: La difusión superficial de los ad-átomos es la responsable del proceso de crecimiento, lo que permite la densificación de los límites intercolumnares. En esta zona el tamaño de grano aumenta, pero la morfología columnar aún persiste.⁵⁵
- Zona 3: Se caracteriza por la recristalización, el crecimiento de granos y la densificación del recubrimiento, debido a la alta tasa de difusión de ad-átomos sobre la superficie. Generalmente, la morfología columnar es modificada y estas columnas están formadas por monocristales del material.⁵⁵

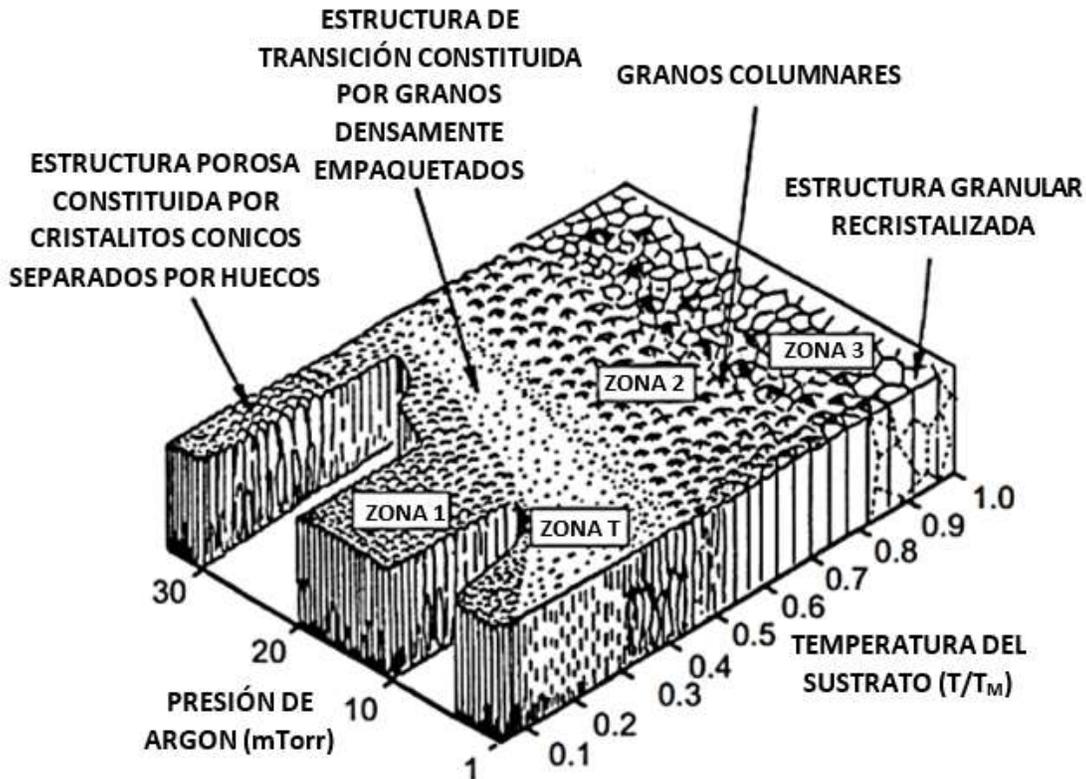


Fig. 24 Modelo de la estructura de zona en el depósito de material por la técnica de sputtering, adaptado por Thornton.⁵⁵

En general, a temperaturas muy bajas, existe una limitación en la movilidad de los ad-átomos sobre la superficie, lo que da lugar a la formación de estructuras porosas, conforme se va aumentando la temperatura comienza la formación de granos más densos y grandes. Entre más se aumente la temperatura del sustrato se desarrollarán estructuras con morfología columnar y tamaños de granos más grandes. Por otro lado, el aumento de la presión provoca una disminución en la formación de la estructura del material, debido a que hay un aumento en las colisiones entre los átomos del blanco y los átomos del gas de trabajo que disminuyen la cantidad de átomos que llegan a la superficie del sustrato.

La interfaz formada entre el sustrato y la película delgada puede definirse como una interfaz mecánica, ya que se pretende “rellenar” las rugosidades presentes en la superficie de la hidroxiapatita (generadas por la erosión catódica) con plata, a fin de

lograr un “enclavamiento mecánico” de la plata, que funcione como molde para las AgNPs. La adherencia de la interfaz estará sujeta al contacto entre la plata y la hidroxiapatita, por lo que se pretende moderar las variables de temperatura, presión, potencia y tiempo de depósito para lograr que se genere una superficie rugosa en la capa de hidroxiapatita con profundidades de rugosidad equivalentes al tamaño de la nanopartícula que se desee obtener, posteriormente se detendrá la erosión del blanco de la hidroxiapatita y se comenzara con la erosión del blanco de plata para poder rellenar las rugosidades. Se repetirá este mismo mecanismo varias veces hasta obtener el espesor del recubrimiento deseado.

III.C RECUBRIMIENTOS ORTOPEDICOS BASADOS EN HAp y AgNPs

Previamente se ha establecido la relevancia de las propiedades que exhiben los biomateriales compuestos basados en hidroxiapatita (HAP) y AgNPs, lo que los vuelve materiales atractivos por sus aplicaciones potenciales en el desarrollo y fabricación de dispositivos biomédicos. Lo antes mencionado se ve reflejado en diversos estudios que han tenido como propósito la fabricación de recubrimientos basados en estructuras de HAp y AgNPs, para los cuales se han propuesto el uso de diferentes técnicas de síntesis. Con el propósito de destacar la relevancia e innovación del diseño de recubrimiento propuesto en este trabajo, a continuación, se presenta un condensado de diferentes materiales que han sido sintetizados y analizados a fin de ser empleados en la fabricación de recubrimientos de prótesis ortopédicas.

*Lozoya D.A. et al.*⁶⁰ reportaron la fabricación de un recubrimiento de hidroxiapatita que exhibe textura, microfracturas y con una dispersión homogénea de AgNPs sobre la superficie de este, la descripción general del recubrimiento se encuentra condensado en la **Tabla 22**. Adicionalmente determinaron una distribución de tamaño promedio del composito de 119.75 μm así como un espesor promedio del recubrimiento de 217.33 μm (véase **Fig. 25**).

Tabla 22. Generalidades del recubrimiento fabricado por *Lozoya D.A. et al.*⁶⁰

<i>Material de recubrimiento</i>	<i>Método de síntesis</i>	<i>Propiedades biológicas</i>
Composito de HAp-AgNP (en polvo) ⁶⁰	Proyección térmica de polvos de HA-AgNPs sobre un sustrato de Ti6A14V.	Posee un porcentaje del 99% de eficiencia antimicrobiana contra <i>S.aureus</i> , <i>E. coli</i> y <i>P. aeruginosa</i> . No daña las células del cuerpo.

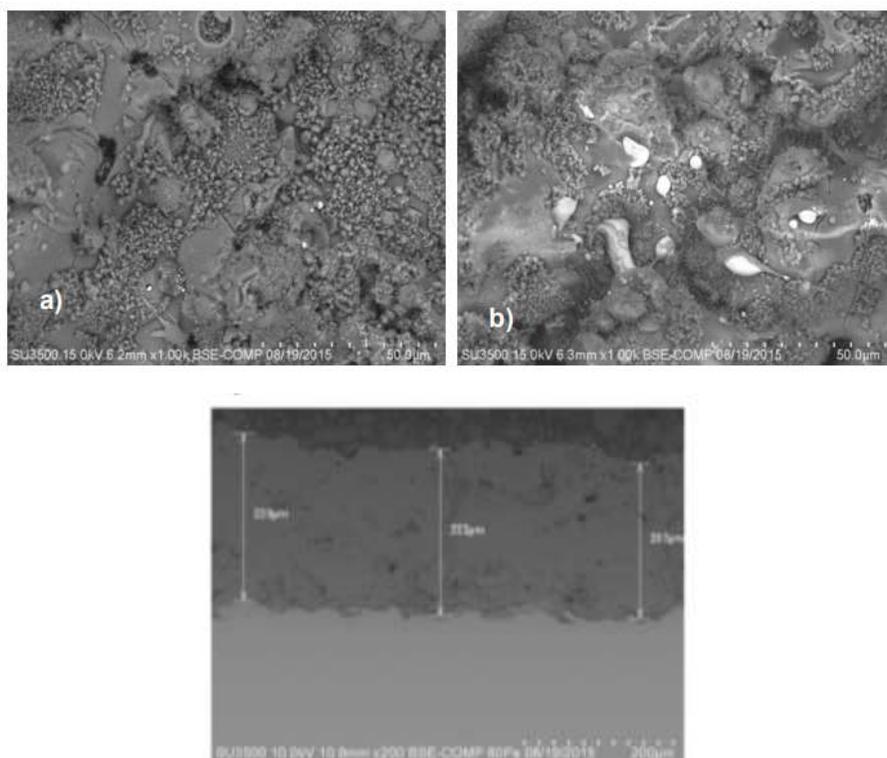


Fig 25. Imágenes BSE-SEM de recubrimientos HAp/AgNP. Las imágenes superiores muestran la superficie del recubrimiento y se pueden identificar la incorporación de partículas de plata, en tanto que, en la parte inferior se muestra una sección transversal del dispositivo permitiendo medir el espesor del recubrimiento.⁶⁰

*Lyasnikova A.V. et al.*⁶¹ reportaron una estructura de material compuesto tipo Ag-HAp con partículas fusionadas estrechamente, empaquetadas y con bordes de salpicadura irregulares. Se determinan tamaños en los rangos 24-40 µm para el composito y 70-200 nm para las partículas de plata (véase **Tabla 22** y **Fig. 26**).

Tabla 23. Generalidades del recubrimiento fabricado por *Lyasnikova D.A. et al.*⁶¹

<i>Material de recubrimiento</i>	<i>Método de síntesis</i>	<i>Propiedades biológicas</i>
Hidroxiapatita sustituida con plata (Ag-HAp) ⁶¹	Pulverización por plasma de polvos de Ag-HAp sobre un revestimiento base de Ti.	Actividad antimicrobiana contra <i>S. aureus</i> .

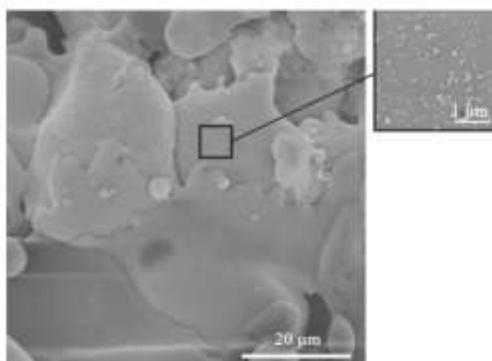


Fig 26. Imagen SE-SEM del recubrimiento de hidroxiapatita sustituido con plata (Ag-HAp), rociado con plasma. Se observan crecimientos irregulares compactos del biocerámico además de que se muestra una sección magnificada del recubrimiento en el que se identifican crecimientos de plata.⁶¹

*Xuefei Z. et al.*⁶² reportó la fabricación de un recubrimiento de cristales de HAp con forma de varilla cuya longitud promedio es ~500 nm, las cuales fueron recubiertas con nanopartículas de Ag que exhiben tamaños en el rango 10-200 nm (véase **Tabla 24** y **Fig. 27**).

Tabla 24. Generalidades del recubrimiento fabricado por *Xuefei Z. et al.*⁶²

<i>Material de recubrimiento</i>	<i>Método de síntesis</i>	<i>Propiedades biológicas</i>
Nanopartículas de plata depositadas sobre recubrimientos de hidroxiapatita (Ag-HAp) ⁶²	Método electroquímico de dos etapas + tratamiento térmico.	Actividad antimicrobiana contra <i>E. Coli</i> por liberación de iones.

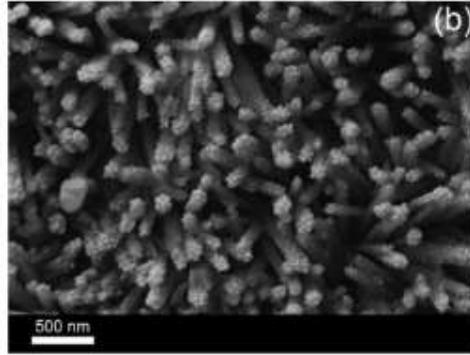


Fig 27. Imagen SEM del recubrimiento tipo Ag-HAp. Se puede observar un crecimiento de varillas de HA, con orientación vertical preferencial, en cuya superficie se depositan AgNPs.⁶²

*Nirmala R. et al.*⁶³ reportó la incorporación de AgNPs con morfología esférica y tamaños en el rango de 8 – 20 nm, unidas principalmente a la superficie del cristal de HA (véase **Tabla 25** y **Fig. 28**).

Tabla 25. Generalidades del recubrimiento fabricado por *Nirmala R. et al.*⁶³

<i>Material de recubrimiento</i>	<i>Método de síntesis</i>	<i>Propiedades biológicas</i>
Híbridos de HA-Ag ⁶³	Método de descomposición térmica y posterior reducción de nitrato de plata con N,N-dimetilformamida (DMF) en presencia de poli(acetato de vinilo) (PVAc).	Actividad de amplio espectro contra cepas bacterianas no SARM, SARM y <i>E. coli</i> .

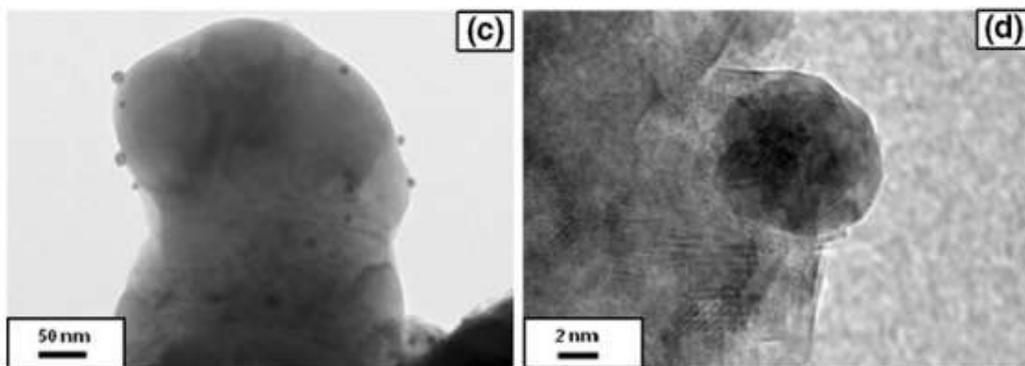


Fig 28. Imágenes TEM de híbridos HA–Ag, en las que se identifica el decorado de la superficie de la matriz HA con nanopartículas de Ag.⁶³

Andrade F.A.C. et al.⁶⁴ reportan la incorporación de AgNPs de morfología esférica con diámetro en el rango 5-10 nm en polvo de HAp. Asimismo, incrementa la concentración de AgNPs presentes, sobre la superficie del recubrimiento, conforme aumenta la proporción en masa de plata presente en la muestra (véase [Tabla 26](#) y [Fig. 29](#)).

Tabla 26. Generalidades del recubrimiento fabricado por Andrade F.A.C. et al.⁶⁴

<i>Material de recubrimiento</i>	<i>Método de síntesis</i>	<i>Propiedades biológicas</i>
Compuestos de HA-AgNPs ⁶⁴	Mediante suspensiones coloidales de AgNP en los que se sumergen polvos de HA.	Actividad antibacteriana frente a <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>

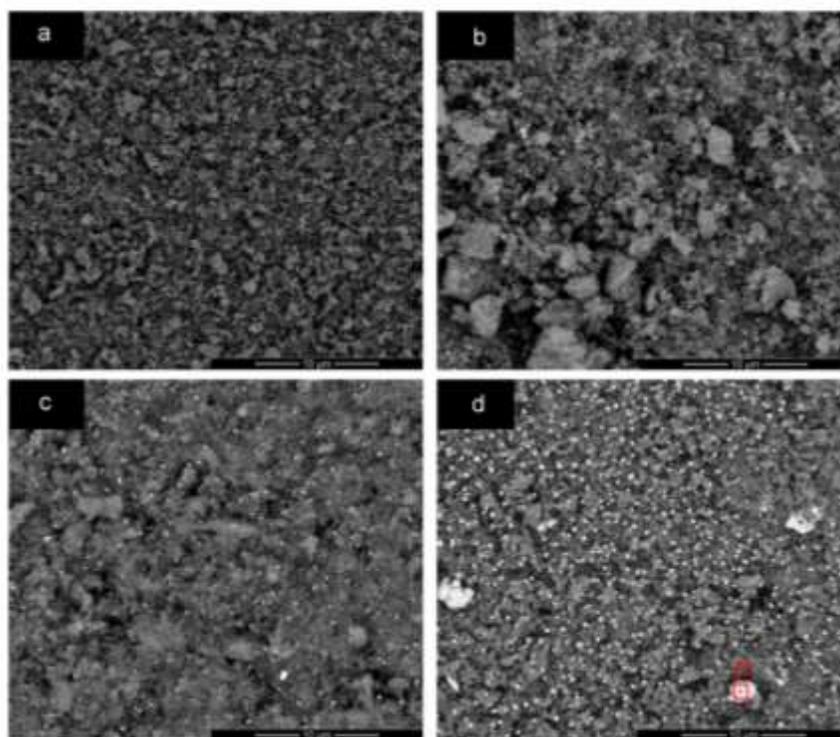


Fig 29. Imágenes BSE-SEM de los recubrimientos de HA-AgNP, sintetizados por inmersión de polvo de HA en soluciones de AgNPs. La densidad de nanopartículas de plata aumenta en dependencia de la proporción de masa de plata en las soluciones.⁶⁴

De manera general se puede identificar a partir de los reportes de fabricación de recubrimientos tipo HA-AgNPs, que la morfología varía dependiendo el método de síntesis utilizado, no obstante, todos emplean como referencia el mismo diseño

base. Esto es, un recubrimiento basado en una matriz de HAp en la que haya la presencia de AgNPs dispersas en la superficie, independientemente de su fuerte tendencia a aglomerarse.

En general, la mayoría de los trabajos tienen como principal propósito generar un biomaterial antibacteriano, con aplicaciones en la reparación y reconstrucción de fracturas óseas, así como en recubrimientos de prótesis ortopédicas que permitan prevenir o erradicar las infecciones nosocomiales desarrolladas por los pacientes durante su proceso de recuperación, después de una intervención quirúrgica.

Por otro lado, se puede hacer notar que muchos de los recubrimientos desarrollados explotan el potencial de las AgNPs para liberar de iones de Ag^+ como mecanismo antibacteriano, esto mediante el depósito sobre la superficie del recubrimiento. No obstante, también es importante el desarrollo de trabajos orientados al estudio de la actividad antibacteriana de las nanopartículas incorporadas al interior de la matriz cerámica, esto con el objetivo de potencializar la protección que otorgara el recubrimiento del implante, además de proporcionar un efecto prolongado por parte de las AgNPs.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES

IV.A CONCLUSIONES GENERALES

Este trabajo de tesis se desarrolló con el objetivo estudiar y comprender las propiedades biocidas de las nanopartículas de plata, así como de la hidroxiapatita, tanto de manera individual como en conjunto. El análisis de la literatura permite identificar los parámetros que se sugiere determinan y mejoran las propiedades de estos materiales en aplicaciones biomédicas, específicamente en lo que se refiere a prevenir o evitar infecciones bacterianas de sitios quirúrgicos asociados a implantes ortopédicos. En base a lo antes mencionado se proporciona evidencia sobre la potencial aplicación de la hidroxiapatita impurificada con nanopartículas de plata en el diseño y desarrollo de dispositivos ortopédicos (prótesis y material de osteosíntesis).

Con base a los conocimientos adquiridos, así como del análisis de la información recopilada, se propone el diseño teórico conceptual de un dispositivo ortopédico (en este caso, un recubrimiento), capaz de cumplir con las características de biocompatibilidad, baja citotoxicidad y durabilidad propias de un implante ortopédico de uso común. Se sugiere que la fabricación del dispositivo debe llevarse a cabo mediante la técnica de co-sputtering, ya que esta permite tener control sobre los parámetros del crecimiento de los materiales involucrados en la fabricación del dispositivo. Esto permite modular las propiedades del recubrimiento a fin de garantizar y mejorar sus propiedades biocidas, así como de biocompatibilidad, además de que exhiba una baja citotoxicidad.

La investigación realizada destaca la relevancia del empleo de la nanotecnología en el desarrollo de potenciales aplicaciones biomédicas. Esto permite evidenciar la importancia e influencia en el desarrollo de materiales que exhiban propiedades deseables, particularmente efectivas y versátiles, para el diseño y fabricación de dispositivos ortopédicos. Sin embargo, también plantean cuestionamientos en relación con los efectos adversos para el organismo a largo plazo por uso de estos materiales. Esto asociado a los posibles efectos adversos derivados del uso del recubrimiento en relación con el deterioro de la salud del ser humano.

IV.B TRABAJO FUTURO

Se debe realizar el desarrollo experimental, a fin de fabricar el dispositivo propuesto a nivel de laboratorio, esto haciendo uso de la metodología, así como de los parámetros establecidos en este trabajo, con el propósito de determinar las propiedades, las características, la eficiencia y la eficacia del dispositivo, también es necesario realizar la caracterización del dispositivo y de sus componentes de manera independiente. Para ello se espera poder hacer mediciones de difracción de rayos X y TEM; para conocer información sobre la estructura del dispositivo y espectroscopia de transmisión de IR, microscopia infrarroja con transformada de Fourier y RAMAN; que proporcionaran información acerca de las estructuras químicas presentes.

Además, es necesario llevar a cabo estudios que nos permitan comprobar la biofuncionalidad del dispositivo y su capacidad antimicrobiana. Esto mediante mediciones de antibiograma, para comprobar la efectividad del recubrimiento en la inhibición del crecimiento antimicrobiano. Así como las pruebas de MIC y MBC para determinar las concentraciones apropiadas de las AgNPs requeridas para lograr una actividad biocida, y finalmente una prueba de viabilidad bacteria (live/dead blaflight – Espectroscopia) que nos permitirá analizar el daño que el dispositivo infringe sobre la integridad de la estructura bacteriana.

Finalmente, se podría plantear el desarrollo de estudios orientados a establecer y estudiar los efectos citotóxicos, genotóxicos, así como antiproliferativos derivados del empleo de las nanopartículas de plata en la fabricación del dispositivo propuesto.

REFERENCIAS

- [1] Florea D. A., Chircov C., & Grumezescu A. M.; “Hydroxyapatite Particles—Directing the Cellular Activity in Bone Regeneration Processes: An Up-To-Date Review”; *Applied Sciences*, 2020, 10(10), 1-12.
- [2] Nwasike C., Reeser K., Liu Y., Nagi, J.S., Purr E., Han C. & Doiron A.L.; “Recent advances in controlled release technologies for the co-delivery of antimicrobial and osteoconductive therapeutics”; *Racing for the Surface*, 2020, 35–72.
- [3] Szczeń A., Hołysz L. & Chibowski E.; “Synthesis of hydroxyapatite for biomedical applications”; *Advances in Colloid and Interface Science*, 2017, 249, 321–330.
- [4] México: Secretaría de Salud. “Diagnóstico y tratamiento de las Infecciones Asociadas a Dispositivos Ortopédicos Prótesis y/o material de osteosíntesis”; *Guía de Práctica Clínica*, 2013.
- [5] Betsch B., Eggil S., Siebenrok K., Täuber M.G. & Mühlemann K.; “Treatment of Joint Prosthesis Infection in Accordance with Current Recommendations Improves Outcome”; *Clinical Infectious Diseases*, 2008, 46, 1221-1226.
- [6] Marchetti E., May O., Girard J., Hildebrand H.-F., Migaud H., & Pasquier G.; “Biomateriales en cirugía ortopédica”; *EMC – Técnicas Quirúrgicas – Ortopedia y Traumatología*, 2010, 2(3), 1–24.
- [7] Ciobanu C., Iconaru S., Le Coustumer P., Constantin L. & Predoi D.; “Antibacterial activity of silver-doped hydroxyapatite nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria”; *Nanoscale Research Letters*, 2012, 7(1), 324.
- [8] Gopi D., Shinyjoy E. & Kavitha L.; “Synthesis and spectral characterization of silver/magnesium co-substituted hydroxyapatite for biomedical applications”; *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2014, 127, 286–291.
- [9] Türk S., Altınsoy İ., ÇelebiEfe G., Ipek M., Özacar M. & Bindal, C.; “Microwave–assisted biomimetic synthesis of hydroxyapatite using different sources of calcium”; *Materials Science and Engineering: C*, 2017, 76, 528–535.
- [10] Šupová M.; “Substituted hydroxyapatites for biomedical applications: A review”; *Ceramics International*, 2015, 41(8), 9203–9231.
- [11] Arcos D. & Vallet-Regí M. “Substituted hydroxyapatite coatings of bone implants”; *Journal of Materials Chemistry B*, 2020, 8, 1781-1800.
- [12] Kolmas J., Krukowski S., Laskus A. & Jurkitewicz M.; “Synthetic hydroxyapatite in pharmaceutical applications”; *Ceramics International*, 2016, 42(2), 2472–2487.
- [13] Chen K., Ustiyana P., Moore F. & Sahai N.; “Biological Response of and Blood Plasma Protein Adsorption on Silver-doped Hydroxyapatite”; *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2019, 5, 561–571.
- [14] Vukomanović M., Repnik U., Zavašnik-Bergant T., Kostanjšek R., Škapin S.D. & Suvorov D.; “Is Nano-Silver Safe within Bioactive Hydroxyapatite

- Composites?"; *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2015, 1(10), 935–946.
- [15] Turon P., del Valle L., Alemán C. & Puiggali J.; "Biodegradable and Biocompatible Systems Based on Hydroxyapatite Nanoparticles"; *Applied Sciences*, 2017, 7(1), 60.
- [16] Dorozhkin S.V. & Epple M.; "Biological and Medical Significance of Calcium Phosphates"; *Angewandte Chemie International Edition*, 2002, 41(17), 3130–3146.
- [17] Mohd Pu'ad N.A.S., Koshy P., Abdullah H.Z., Idris M.I. & Lee T.C.; "Syntheses of hydroxyapatite from natural sources"; *Heliyon*, 2019, 5, e01588.
- [18] Monge M.; "Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas."; *Anales de la Real Sociedad Española de Química*, 2009, 105(1), 33-41.
- [19] Sifontes A. B., Melo L., Maza C., Mendes J. J., Mediavilla M., Brito J. L., Zoltan T. & Albornoz A.; "Preparación de nanopartículas de plata en ausencia de 81hysic81os estabilizantes"; *Química Nova*, 2010, 33(6), 1266-1269.
- [20] Franci G., Falanga A., Galdiero S., Palomba L., Rai M., Morelli G. & Galdiero, M.; "Silver Nanoparticles as Potential Antibacterial Agents"; *Molecules*, 2015, 20(5), 8856–8874.
- [21] Durán N., Durán M., de Jesus M.B., Seabra A.B., Fávaro W.J. & Nakazato G.; "Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity"; *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2016, 12(3), 789–799.
- [22] Anees Ahmad S., Sachi Das S., Khatoon A., Tahir Ansari M., Afzal M., Saqib Hasnain M. & Kumar Nayak A.; "Bactericidal Activity of Silver Nanoparticles: A Mechanistic Review"; *Materials Science for Energy Technologies*, 2020.
- [23] Pareek V., Gupta R. & Panwar J.; "Do physico-chemical properties of silver nanoparticles decide their interaction with biological media and bactericidal action? A review"; *Materials Science and Engineering: C*, 2018, 90, 739–749.
- [24] Rodríguez P.A. & Arenas R.; "Hans Christian Gram y su tinción"; *Dermatología cosmética, médica y quirúrgica*, 2018, 16(2), 166-167.
- [25] Tang, S., & Zheng, J. "Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles: Structural Effects"; *Advanced Healthcare Materials*, 2018, 7(13), 1701503, 1-10.
- [26] Dubey P., Matai I., Kumar S. U., Sachdev A., Bhushan B. & Gopinath P.; "Perturbation of cellular mechanistic system by silver nanoparticle toxicity: Cytotoxic, genotoxic and epigenetic potentials"; *Advances in Colloid and Interface Science*, 2015, 221, 4–21.
- [27] Carvajal Carvajal C.; "Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo"; *Medicina Legal de Costa Rica*, 2019, 36 (1), 91-100.
- [28] Wakshlak R.B.-K., Pedahzur R. & Avnir D.; "Antibacterial activity of silver-killed bacteria: the "zombies" effect"; *Scientific Reports*, 2015, 5(1).
- [29] van de Belt H, Neut D., Schenk W., van Horn J.R., van der Mei H.C. & Busscher H.J.; "Infection of orthopedic implants and the use of antibiotic-loaded bone cements: A review"; *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 2001, 72:6, 557-571

- [30] Guimond-Lisher S., Ren Q., Braissant O., Gruner P., Wampfler B. & Maniura-Weber K.; "Vacuum plasma sprayed coatings using ionic silver doped hydroxyapatite powder to prevent bacterial infection of bone implants"; *Biointerphases*, 2016, 11, 011012.
- [31] Denisse A. L., Renata de L., Leonardo F. F., Tatiane P., Mariana G., A. Ledezma P., Mercedes B., Roberto G., J. Chacon N. & V. Orozco C.; "Desarrollo de recubrimiento a base de un composito HA-nAg a partir de una síntesis totalmente verde", 2016.
- [32] Lim P.N., Teo E.Y., Ho B., Tay B.Y. & Thian E.S.; "Effect of silver content on the antibacterial and bioactive properties of silver-substituted hydroxyapatite"; *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2013, 101A, 2456–2464.
- [33] Darouiche R.O.; "Anti-infective efficacy of silver-coated medical prostheses"; *Clinical Infectious Diseases*, 1999, 29(6), 1371-1377
- [34] Liao S.Y., Read D.C., Pugh W.J., Furr J.R. & Russell A.D.; "Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: Relationship to the antibacterial action of silver ions"; *Letters in Applied Microbiology*, 1997, 25(4), 279–283.
- [35] Khurshid Z., Zafar M. S., Hussain S., Fareed A., Yousaf S., & Sefat F.; "Silver-substituted hydroxyapatite"; *Handbook of Ionic Substituted Hydroxyapatites*, 2020, 237–257.
- [36] Lyasnikova A.V., Markelova O.A., Dudareva O.A., Lyasnikov V.N., Barabash A.P. & Shpinyak S.P.; "Comprehensive Characterization of Plasma-Sprayed Coatings Based Silver- and Copper-Substituted Hydroxyapatite"; *Powder Metallurgy and Metal Ceramics*, 2016, 55(5-6), 328–333.
- [37] Nava Hernandez D.U.; "Electrodeposición y caracterización de recubrimientos de Ni-P"; 2013, Tesis de Maestría, Facultad de Electroquímica, CIDETEQ.
- [38] Ambrusi R.E., Querejeta A.L., Arroyo Gómez J.J., del Barrio M.C. & García S.G.; "Formación por vía electroquímica de nanopartículas bimetálicas para su uso en electrocatálisis";
- [39] Zamora Rivera C.A.; "Evaluación de distintas técnicas de deposición de recubrimientos sol-gel en aleaciones de aluminio"; 2014, Tesis de Licenciatura, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México.
- [40] Morales Taborda A.J.; "Diseño y construcción de un sistema para el crecimiento de películas delgadas por el método de recubrimiento por inmersión o dip coating"; 2021, Tesis de Licenciatura, Universidad EAFIT.
- [41] Hernández Hernández L.A.; "Depósito y caracterización de películas delgadas de ZnO mediante erosión catódica reactiva"; 2011, Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de Zacatecas.
- [42] Mediaswanti K., Wen C., Ivanova E.P., Berndt C.C. & Wang J.; "Sputtered Hydroxyapatite Nanocoatings on Novel Titanium Alloys for Biomedical Applications"; *Titanium Alloys - Advances in Properties Control*, 2013, 21-44.
- [43] Liu Y., Rath B., Tingart M. & Eschweiler, J.; "Role of implants surface modification on osseointegration: A systematic review"; *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2019, 108A:470–484.

- [44] Vanegas J.C., Landinez N.S., & Garzón-Alvarado D.A.; “Generalidades de la interfase hueso-implante dental”; *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 2009, 28(3), 130-146.
- [45] Faig-Martí J. & Gil-Mur F.J.; “Los recubrimientos de hidroxiapatita en las prótesis articulares”; *Revista Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología*, 2008, 52(2), 113-120
- [46] Borsari V., Giavaresi G., Fini M., Torricelli P., Salito A., Chiesa R. & Giardino R.; “Physical characterization of different-roughness titanium surfaces, with and without hydroxyapatite coating, and their effect on human osteoblast-like cells”; *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2005; 75B (2), 359–368.
- [47] Lynn A.K. & DuQuesnay D.L.; “Hydroxyapatite-coated Ti–6Al–4V”; *Biomaterials*, 2002, 23(9), 1937–1946.
- [48] Overgaard S., Bromose U., Lind M., Bünger C. & Søballe K.; “The influence of crystallinity of the hydroxyapatite coating on the fixation of implants”; *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 1999, 81-B(4), 725–731.
- [49] Sundelacruz S. & Kaplan D.L.; “Stem cell- and scaffold-based tissue engineering approaches to osteochondral regenerative medicine”; *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2009, 20(6), 646–655.
- [50] Kou M., Toda T. & Fukumasa O.; “Production of fine hydroxyapatite films using the well-controlled thermal plasma”; *Surface and Coatings Technology*, 2008, 202(22-23), 5753-5756.
- [51] Dos Santos C.A., Seckler M.M., Ingle A.P., Gupta I., Galdiero S., Galdiero M., Gade A. & Rai M.; “Silver Nanoparticles: Therapeutical Uses, Toxicity, and Safety Issues”; *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2014, 103(7), 1931–1944.
- [52] Pauksch L., Hartmann S., Rohnke M., Szalay G., Alt V., Schnettler R. & Lips K.S.; “Biocompatibility of silver nanoparticles and silver ions in primary human mesenchymal stem cells and osteoblasts”; *Acta Biomaterialia*, 2014, 10(1), 439–449.
- [53] Liao C., Li Y. & Tjong S.; “Bactericidal and Cytotoxic Properties of Silver Nanoparticles”; *International Journal of Molecular Sciences*, 2009, 20(2), 449.
- [54] Soriano M.L., Rodríguez-Benot A. & Valcárcel M.; “Bases nanotecnológicas de una «nueva» Nefrología”; *Nefrología*, 2018, 38(4), 368–378.
- [55] Mattox D.M.; “*Handbook of Physical Vapor Deposition (PVD) Processing*”; 2010, 2nd Edition; William Andrew.
- [56] Ohring M.; “*Materials Science of Thin Films*”; 2002, 2nd Edition; Academic Press
- [57] J.K. Lesker Company; “*Practical Process Tips - Sputtering*”; Lesker Tech, 2010, 7(1), 1–4.
- [58] Bunshah R.F. & Weissmantel C.; “*Handbook of Hard Coatings Deposition Technologies*”; 2001, 1st Edition; Park Ridge, N.J: Noyes Publications.
- [59] Priestland C.R.D. & Hersee S.D.; “The effects of pressure on the deposition rate in RF sputtering processes”; *Vacuum*, 1972, 22(3), 103–106.
- [60] Lozoya D.A., de Lima R., Fraceto L.F., Pasquôto, Guilger M., Ledezma-Pérez A., Bazaldua M., Gómez R., Chacón-Nava J., Orozco-Carmona V.;

- “Desarrollo de recubrimiento a base de un composito HA-nAg a partir de una síntesis totalmente verde”; 2016, Recuperado de https://cimav.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1004/1737/1/ASCO_R_2016_paper_92.pdf.
- [61] Lyasnikova A. V., Markelova O. A., Dudareva O. A., Lyasnikov V. N., Barabash A. P., & Shpinyak S. P.; “Comprehensive Characterization of Plasma-Sprayed Coatings Based Silver- and Copper-Substituted Hydroxyapatite”; *Powder Metallurgy and Metal Ceramics*, 2016, 55(5-6), 328–333.
- [62] Zhang X., Chaimayo W., Yang C., Yao J., Miller B. L., & Yates M.Z.; “Silver-hydroxyapatite composite coatings with enhanced antimicrobial activities through heat treatment”; *Surface and Coatings Technology*, 2017, 325, 39–45.
- [63] Nirmala R., Sheikh F.A., Kanjwal M.A., Lee J.H., Park S.-J., Navamathavan R. & Kim H.Y.; “Synthesis and characterization of bovine femur bone hydroxyapatite containing silver nanoparticles for the biomedical applications”; *Journal of Nanoparticle Research*, 2010, 13(5), 1917–1927.
- [64] Andrade F.A.C., de Oliveira-Vercik L.C., Monteiro F.J., & da Silva-Rigo E.C.; “Preparation, characterization and antibacterial properties of silver nanoparticles–hydroxyapatite composites by a simple and eco-friendly method”; *Ceramics International*, 2016, 42(2), 2271–2280.