

# DESARROLLO DE RECUBRIMIENTO DE HIDROXIAPATITA CON NANOPARTICULAS DE PLATA SINTETIZADAS MEDIANTE EXTRACTO DE NOPAL EN BASE A LA TECNICA DE PROYECCION TERMICA POR PLASMA

V. Orozco Carmona (CIMAV, Chihuahua, México, victor.orozco@cimav.edu.mx),  
A. Borunda Terrazas (CIMAV, Chihuahua, México, adan.borunda@cimav.edu.mx),  
J. Chacón Nava (CIMAV, Chihuahua, México, chacon.nava@cimav.edu.mx),  
D. Lozoya Rodríguez (CIMAV, Chihuahua, México, denisse.lozoya@cimav.edu.mx),  
R. Gómez Batres (CIMAV, Chihuahua, México, kpu\_turco@hotmail.com),  
M. Bazaldua Domínguez (CIMAV, Chihuahua, México, minerva1000@hotmail.com),  
García Romero (CIQA, Saltillo, México, jromero@ciqa.mx),  
A. Ledezma Pérez (CIQA, Saltillo, México, aledezma@ciqa.mx),  
C. Martínez Pérez (UACJ, Cd. Juárez, México, camartin@uacj.mx),  
Renata Lima (UNISO, Sorocaba, São Paulo, Brasil. renata.lima.ppba@gmail.com),  
Leonardo Fraceto (UNESP, Sorocaba, São Paulo, Brasil.leonardo@sorocaba.unesp.br),  
A. Martínez Villafañe (CIMAV, Chihuahua, México, martinez.villafane@cimav.edu.mx)

## RESUMEN

Trabajos recientes han demostrado la eficiencia de la plata, ya sea en su forma iónica o metálica, cuando se incorpora en pinturas para evitar la corrosión microbiológica o asegurar superficies higiénicas. Las nanopartículas de plata (nAg) han jugado un importante rol debido a su fuerte actividad bactericida y fungicida. Por otro lado, la incorporación a los recubrimientos de aditivos bactericidas y fungicidas de nulo impacto ambiental se encuentra en pleno desarrollo. Dentro de los métodos de síntesis para la obtención de nanopartículas metálicas, la síntesis biológica representa una alternativa limpia, presumiblemente no tóxica y amigable con el medio ambiente, por lo que, la obtención de nanopartículas de plata a través de métodos ecológicos resulta relevante. El empleo de plantas y sus respectivos extractos en la obtención de nanopartículas metálicas ha sido desarrollado recientemente. Por otra parte, los recubrimientos de HA han sido empleados para resolver los problemas asociados con la fijación de prótesis. En el presente trabajo son desarrollados recubrimientos de HA mezclados 0, 0.5, 1 y 3% de extracto de nopal con nanopartículas de plata (nAgEN) mediante proyección térmica por plasma (APS) en un dispositivo marca Praxair (modelos SG100) sobre un sustrato de Ti6Al4V y evaluada su eficiencia antibacterial sobre bacterias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Los parámetros de aplicación de los recubrimientos fueron: energía 15 kW, velocidad de proyección 2.0 lb/h, empleando He como gas primario y Ar como gas secundario. Se observó mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) en los recubrimientos de HA/nAgEN la presencia de nanopartículas de Ag distribuidas homogéneamente en la superficie. Las pruebas de eficiencia antibacterial fueron desarrolladas en base a la norma JISZ2801 "Antimicrobial products-Test for antimicrobial activity and efficacy". Los resultados mostraron una eficiencia antibacterial del 99.9% sobre las bacterias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas aeruginosa* desarrollada por los recubrimientos con una concentración a partir de 1% nAgEN, por debajo de esta concentración dichos recubrimientos no presentaron una aceptable eficiencia antibacterial (menor al 99%). Pruebas de liberación de iones mostraron que los recubrimientos desarrollados en el presente trabajo, no liberaron iones de Ag en una solución buffer de fosfatos, por otra parte, pruebas electroquímicas evaluadas en una solución de sustituta de fluidos corporales a 25 y 37°C, presentaron una densidad de corriente de 1e-5 A/cm<sup>2</sup> en promedio, lo que indica que el mecanismo de acción antibacterial es asociado a la captación de H y OH presente en el entorno del recubrimiento por procesos químicos y electroquímicos, provocando un desorden en el proceso ATP y en la membrana celular de las bacterias evaluadas, provocando por lo tanto su muerte. Los recubrimientos presentaron excelente propiedad de adherencia (35 MPa en promedio).

## INTRODUCCION

El empleo de materiales en el área de la medicina se ha enfocado, en las propiedades y aplicaciones de dichos materiales (sintéticos y naturales), para su uso en contacto con sistemas biológicos. En aplicaciones médicas, los biomateriales rara vez son empleados de manera aislada siendo más común el que sean integradas dentro de dispositivos o implantes, por lo tanto, aunque los biomateriales se encuentran dentro del área de los materiales, es puesto de manifiesto que dichos biomateriales no pueden ser desarrollados sin ser considerados como dispositivos biomédicos y basado en su respuesta biológica. Por lo tanto, el impacto de los materiales o dispositivos en el receptor y, los tejidos del receptor en el dispositivo, puede originar fallas en dichos dispositivos.

En las últimas décadas una amplia investigación sobre implantes recubiertos base Hidroxiapatita (HA) no se han centrado únicamente en la interfaz del tejido-implante, sino también sobre los problemas relacionados con proceso del recubrimiento y optimización de los parámetros para mejorar la respuesta del tejido al recubrimiento. Una variedad de recubrimientos superficiales como proyección por plasma, deposición electroforética, deposición física de vapor mediante láser, arco de micro-oxidación, pulverización catódica, recubrimientos obtenidos por sol-gel, etc. actualmente se están empleado para depositar HA en aleaciones base Ti, cumpliendo con las normas y directrices establecidos por la Food and Drug Administration (FDA) y la ISO. Entre estas metodologías, la proyección térmica por plasma es la técnica de más uso comercial para ortopedia e implantes dentales, pero esta sufre de ciertas desventajas como la baja adherencia del recubrimiento al sustrato, baja resistencia a la fractura de la capa cerámica, la falta de la uniformidad del recubrimiento, el grosor, la biodegradación, la fatiga y el desgaste <sup>[1,2]</sup>.

De acuerdo a National Nosocomial Infections Surveillance System (NNIS), un total de 134,731 casos de trasplante de prótesis de cadera realizadas de enero de 1992 a junio del 2004 en los Estados Unidos, presentaron en dichos implantes infección entre el 0.86 al 2.52 % <sup>[3]</sup>.

Dado el riesgo asociado con el uso de antibióticos, se han desarrollado novedosas tecnologías de recubrimientos de plata para ser probados como un recubrimiento antibacteriano. Se han usado técnicas de proyección térmica con HA conteniendo Ag, la cual es fuertemente antibacteriana sobre una gran variedad de microorganismos. La plata además inhibe colonización de bacterias y presenta baja toxicidad celular. Además, las bacterias muestran bajas propiedades de desarrollo de resistencia a las propiedades antimicrobianas de la plata <sup>[4,5]</sup>.

Existen numerosos métodos disponibles para sintetizar nanopartículas con un intervalo de tamaño entre 1- 100 nm, sin embargo el enfoque o desafío actual se dirige hacia el control del tamaño de la nanopartícula, distribución de tamaño, morfología, cristalinidad y propiedades <sup>[6]</sup>. La síntesis biológica de nanopartículas se denomina también como "*síntesis verde*", donde es factible llevar a cabo la síntesis de nanopartículas a partir del uso de microorganismos, biomasa de microorganismo, plantas o sus extractos y también mediante la participación de proteínas, azúcares, fenoles y otras enzimas. De esta forma la síntesis biológica representa una alternativa limpia, presumiblemente no tóxica, amigable con el medio ambiente y que además su uso en algunas ocasiones iguala o sobrepasa las expectativas de las nanopartículas sintetizadas por métodos físicos y químicos, en cuanto a costo y calidad de las nanopartículas obtenidas <sup>[7]</sup>.

Para prolongar la vida útil de las nanopartículas metálicas, y evitar efectos no deseados como la agregación en soluciones acuosas y solventes orgánicos, así como la reutilización y el reciclaje de las nanopartículas, es vital seleccionar agentes estabilizadores y formas de funcionalización que sean amigables con el medio ambiente, no tóxicas y fáciles de implementar <sup>[8]</sup>. Es por ello que la formación de nanopartículas mediante el uso de plantas y sus extractos como agente reductor y como agente estabilizante ha captado gran atención.

El presente trabajo se plantea el empleo de nanopartículas de plata sintetizadas mediante un procedimiento simple usando el extracto nopal como agente reductor. Dichas nanopartículas de plata (nAg) soportadas en extracto de nopal son incorporadas a polvos de Hidroxiapatita (HA), para finalmente desarrollar recubrimientos de HA con nAg mediante la técnica de proyección térmica por plasma. Se desarrollaron pruebas para la

determinación del porcentaje de eficiencia antibacterial y el mecanismo de acción de las nanopartículas para alcanzar dicho porcentaje de eficiencia antibacterial, así mismo, se realizó pruebas de adherencia.

Por otro lado, dado que las bacterias evaluadas en el presente estudio, cubren ambas familias de bacterias gram positivo y gram negativo, el empleo de nanopartículas de plata sintetizadas mediante extracto de nopal en recubrimientos de cerámicos tales como alúmina, zirconia, etc., son potencialmente una buena opción para ser empleadas como agente antibacterial a bajas concentraciones (del orden de 1%) sobre bacterias promotoras de mecanismos de corrosión inducida por bacterias en la industria petrolera, tales como los *thiobasilus* (gram negativo), ya que como se mostrará posteriormente el efecto de las nanopartículas de plata afectan directamente el proceso ATP, crítico en el desarrollo de las bacterias.

## ANTECEDENTES

Los métodos verdes para la síntesis de nanopartículas empleando extractos de plantas es una simple y viable alternativa a los métodos de procesamiento químico y físico. Los métodos químicos y físicos son dañinos debido al empleo de químicos que son tóxicos, inflamables y no son fácilmente dispuestos en el medio ambiente. En años recientes, la biosíntesis de nanopartículas han tenido considerable atención debido a la creciente necesidad de desarrollar químicos limpios y no tóxicos, en base a solventes amigables con el medio ambiente y con materiales renovables. Las plantas tensoactivas han sido ampliamente usadas para la síntesis de nanopartículas de plata sin ningún agente reductor especial. Generalmente los tensoactivos actúan como agente de protección que previene el crecimiento y la aglutinación de las nanopartículas. Las plantas tensoactivas han sido empleadas en la síntesis de nanopartículas de plata [9].

Chandran y colaboradores [10], sintetizaron nanotriángulos de oro y nanopartículas esféricas de plata mediante un procedimiento simple usando el extracto de la hoja del *Aloe Vera* como agente reductor. La reducción de los iones de plata condujeron a la formación de nanopartículas de plata esféricas de  $15.2 \pm 4.2$  nm de tamaño. El análisis por TEM y difracción de electrones comprobó la formación de nanopartículas esféricas de Ag (0), presentando planos cristalinos con índices de Miller (111), (200), (220) y (311) en la estructura cúbica centrada en las caras (FCC).

El efecto antibacterial de las partículas de Ag, al ser empleadas con HA para formar recubrimientos o películas delgadas a través de múltiples sistemas de aplicación ha sido investigado ampliamente, por ejemplo, Fielding et al. desarrollaron recubrimientos mediante la técnica de RF plasma spray a base de polvos de HA dopados con 2% Ag<sub>2</sub>O aleados mecánicamente, presentando una adecuada eficiencia antibacterial a largo plazo sobre la bacteria *P. aeruginosa* posterior a 24 horas [11]. Chen et al., desarrollaron recubrimiento mediante la técnica de vacuum plasma spraying (VPS) (F4-VB, Sulzer Metco, Switzerland) a base de polvos de HA – Ag (40-100 μm) aleados mecánicamente, en concentraciones de 1, 3 y 5% de contenido de Ag, determinando que la concentración mínima para tener un efecto antibacterial eficiente sobre las bacterias *E. Coli* y *P. Aeruginosa* fue del 3% [12]. Li et al., desarrollaron un recubrimiento mediante la técnica atmosphere plasma spraying (APS) (F4-MB, Sulzer Metco, Switzerland) a base polvos de silicato de calcio dopados con nAg (10 -100 nm) sintetizados mediante Sol-Gel a una concentración de 1 y 2% wt de AgNO<sub>3</sub>, observando un incremento en la efectos antibacteriales sin tener efectos citotóxicos [13]. Jelíken et al. desarrollaron una película delgada mediante la técnica pulsed laser deposition (PLD) de HA dopada con Ag (empleando targets de HA y Ag), obteniendo una eficiencia superior al 99% a partir de una concentración de 17.9% wt de Ag [14]. Li et al., desarrollaron un recubrimiento mediante la técnica Atmospheric plasma spray system (APS-2000, Sulzer Metco, Switzerland) de wollastonita con Ag (20 – 100 μm) a una concentración de 5% wt, presentando una eficiencia antibacterial del 100% sobre *E. Coli* posterior a 24 horas. [15]. Noda et al., desarrollaron un recubrimiento mediante la técnica flame spraying de HA con 3% wt de Ag<sub>2</sub>O mezclados por 5 minutos en un contenedor de plástico, posterior a 24 dicho recubrimiento presentó una actividad antibacterial de 3.9 sobre la bacteria *Staphylococcus aureus* [16].

A la fecha no existen parámetros de aplicación de polvos de HA para desarrollo de recubrimientos mediante proyección térmica por plasma totalmente definidos, por lo que, existe una gran disparidad en los parámetros

empleados en el desarrollo de los correspondiente recubrimiento de HA. Lo anterior, indica que a pesar de que ya se ha desarrollado en múltiples investigaciones recubrimientos de HA mediante proyección térmica por plasma (APS), no se tiene identificado claramente cuáles son los parámetros ideales para aplicación de polvos de HA mediante un equipo que emplee parámetros de control en base a presiones de los gases primario y secundario. En la presente investigación se logró lo anterior, empleando una técnica mediante la iluminación de partículas mediante un láser infrarrojo pulsado, lo cual, como permitió desarrollar un recubrimiento de HA con una excelente adherencia (aproximadamente 30 MPa) en base a la determinación de la máxima temperatura y velocidad de la partículas (polvos) al momento de ser proyectadas térmicamente, que permitieron que dichas partículas fueras adheridas al sustrato en la condiciones óptimas de estado de fundición, lo cual, permitió una mayor adherencia entre ellas y hacia el sustrato. Con la finalidad de comparar la adherencia obtenida, se buscó comparar dicho valor con resultados previamente publicados, en el caso de Yang et al., determinaron la adherencia entre un recubrimiento de HA y diferentes sustratos, en donde se determinó que la adherencia entre el recubrimiento HA y un sustrato modificado (LGN) es aproximadamente 1.8 mayor que la observada en un sustrato únicamente preparada por un método convencional (granallado). El valor promedio de tres pruebas fue de 29.8 y16.1 MPa en los sustratos modificados y convencional, respectivamente [17]. Fielding et al., determinaron la adherencia de recubrimientos de HA, Sr-HA, Sr/Ag-HA y Ag-HA obteniendo valores de 17.4, 18.21, 16.3 y 16.94 MPa [11].

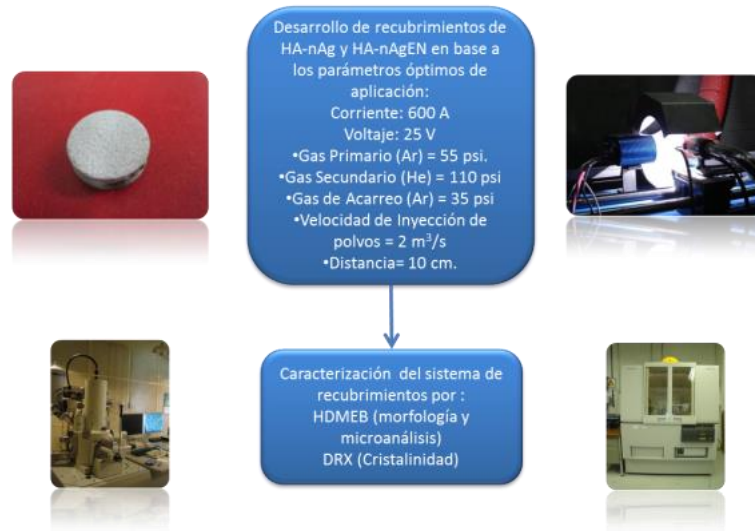
### PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Para la producción de los polvos de HA-nAgEN, se seleccionaron polvos de HA producidos por CaP Biomaterials, LLC (Calcium Hydroxyapatite Lot # HASV110712A) y de nAg sintetizados con extracto de nopal (nAgEN), el cual, es descrito en figura 1.



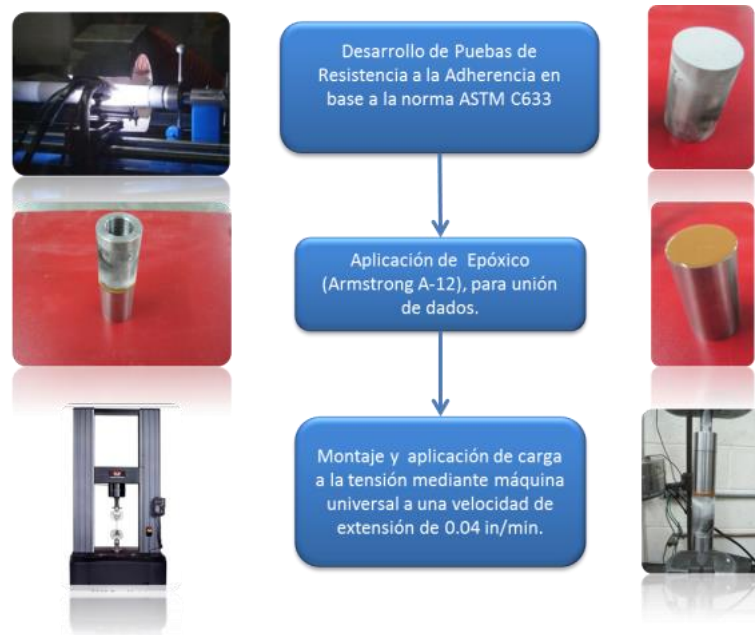
**Figura 1.** Desarrollo y caracterización de los polvos de HA-nAg y HA-nAgEN.

El recubrimiento de HA-nAgEN se desarrolló en base la metodología descrita en la figura 2.



**Figura 2.** Desarrollo y caracterización de los recubrimientos de HA-nAg y HA-nAgEN

Para la determinación de la adherencia del sistema de recubrimientos se empleó el método descrito en la norma ASTM C633. El desarrollo experimental se muestra en la figura 3.



**Figura 3.** Desarrollo y caracterización de resistencia mecánica de los recubrimientos de Ti6Al4V, HA, HA-nAg y HA-nAgEN.

El recubrimiento de HA-nAgEN fue sometido a la determinación de su actividad y eficiencia antibacterial por triplicado, tomando como referencia la norma japonesa JIS Z2801:2000 [35]. El valor de la actividad antibacterial obtenido mediante los métodos de prueba de esta norma, no debe ser menor a 2.0 para que el producto sea considerado eficiente.

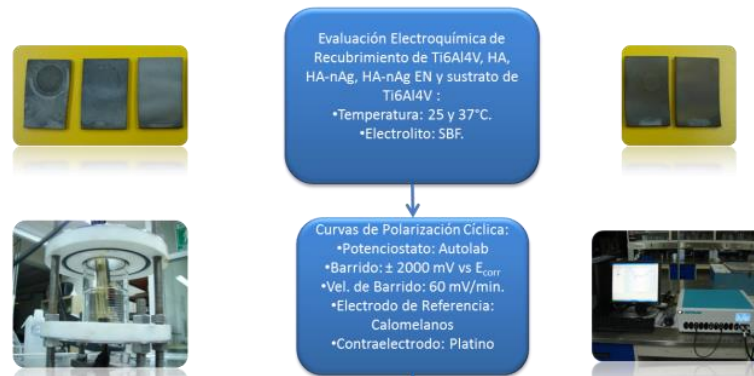
Las bacterias analizadas fueron:

- *Staphylococcus aureus*
- *Escherichia coli* [35]
- *P. Aeruginosa*



Con la finalidad de determinar el posible mecanismo de acción antibacterial de las nanopartículas de plata, y en base a la revisión bibliográfica se consideran realizar pruebas electroquímicas y de determinación de liberación de iones de Ag.

En la figura 3, se muestra el desarrollo experimental empleado para las pruebas electroquímicas.

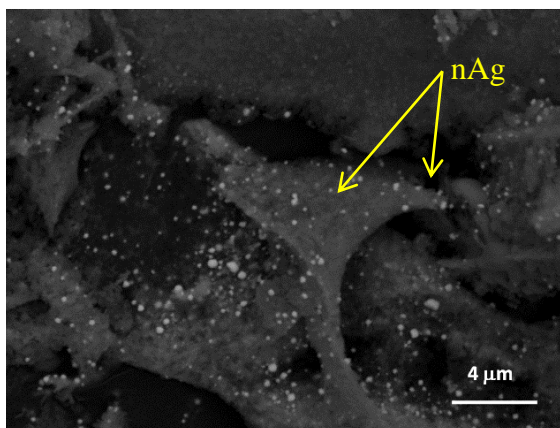


**Figura 4.** Metodología empleada en las pruebas electroquímicas

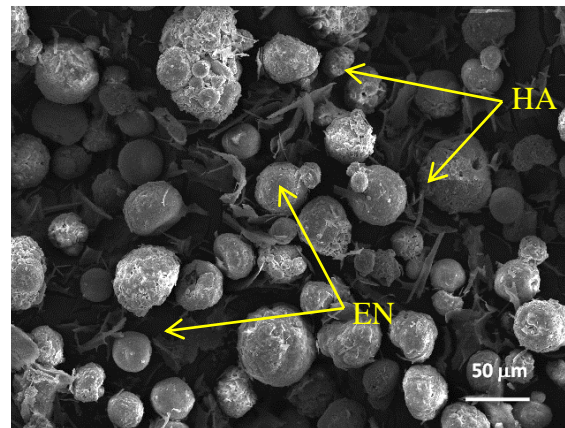
La prueba de liberación de iones de Ag fue realizada mediante la inmersión de piezas con los recubrimientos en estudio en 10 ml de una solución amortiguadora de fosfato pH 7 (PBS) a 37 °C. La liberación de iones de Ag se determinó mediante el análisis de la composición química de la solución transcurridas 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 72 y 168 horas de exposición. La determinación de la cantidad de iones de Ag liberados se realizó mediante análisis químico de cada una de las soluciones por Espectrometría de Masas con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS).

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

En la figura 5, se muestra mediante MEB la morfología superficial del extracto de nopal con nAg, presentando una distribución homogénea de dichas nAg (partículas blancas). El grado de homogenización del extracto de nopal en la mezcla de HA-0.5%nAgEN se muestra en la figura 6.

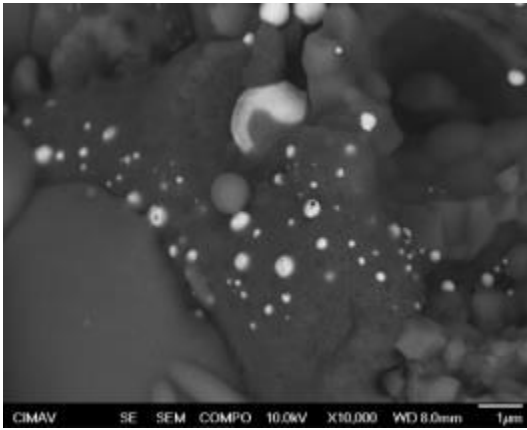


**Figura 5.** Morfología superficial del extracto de nopal, posterior a ser evaluados mediante TGA en una atmósfera de N<sub>2</sub>.

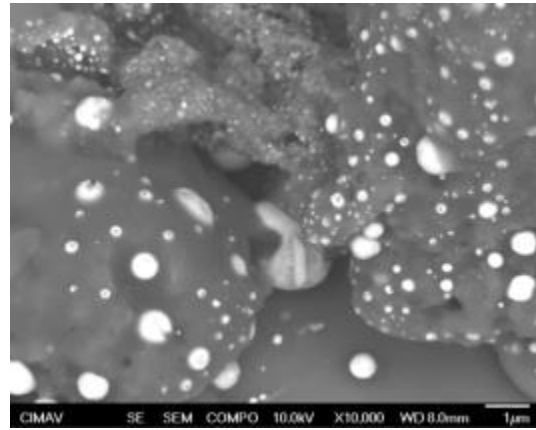


**Figura 6.** Grado de homogenización presente en la mezcla de HA con el extracto de nopal

Los polvos de HA-nAgEN fueron proyectados térmicamente, obteniendo los siguientes recubrimientos: a) HA-1%nAgEN, ver figura 7 y b) HA-3%nAgEN, ver figura 8.



**Figura 7.** Morfología superficial de recubrimientos de HA-1% nAgEN

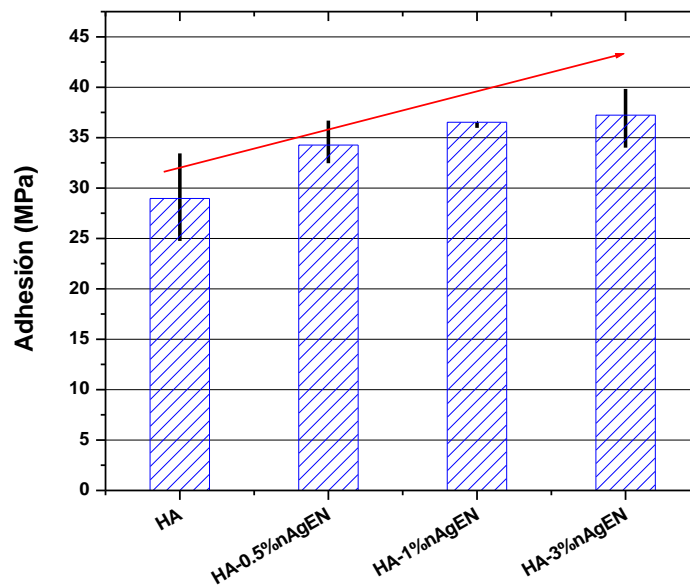


**Figura 8.** Morfología superficial de recubrimientos de HA-3% nAgEN

En dichos recubrimientos se puede observar que la plata, presenta una forma esférica con un tamaño en un rango menor a 500 nm. Se observa de manera aislada la presencia de aglomeración de partículas (partículas mayores a 1  $\mu\text{m}$ ), lo que indica que el hecho de que las nAg estén soportadas en una matriz de extracto de nopal, permite que dichas nAg mantengan predominantemente su tamaño original posterior a ser proyectadas térmicamente por plasma. También, se observa la presencia de microgrietas y cierto grado de porosidad, características típicas de un recubrimiento de HA.

**Caracterización de la adherencia de los recubrimientos de HA-nAg.**

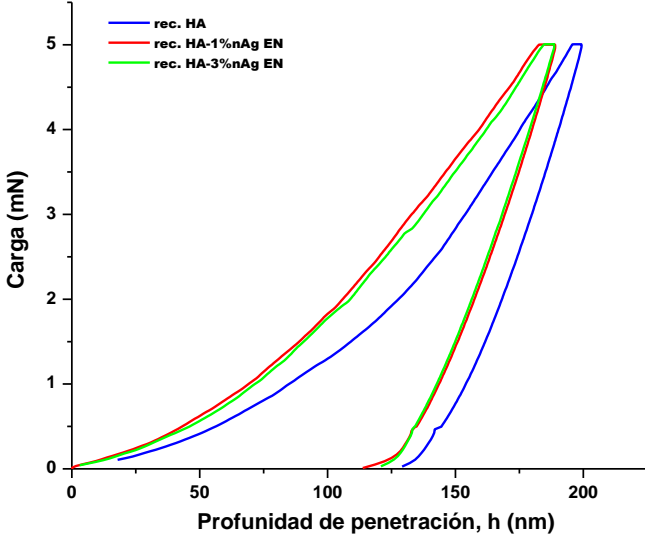
En la figura 9, se observa los valores de la adherencia de los recubrimientos HA y HA-nAgEN (0.5, 1 y 3%) alcanzando valores de 28.96, 34.26, 36.53 y 37.23 MPa respectivamente. Es de notar que conforme se aumenta el porcentaje de nAg hay un incremento de la adherencia.



**Figura 9.** Adherencia de los Rec. de HA y HA-nAgEN.

Mediante pruebas de nanoindentación se determinó las causas del incremento en la adherencia del recubrimiento de HA asociado con el contenido de nAgEN.

La figura 10 muestra la curva característica de nanoindentación carga-desplazamiento desarrollada por los recubrimientos de HA, HA-1%*n*AgEN y HA-3%*n*AgEN. En este caso la carga máxima fue de 5 mN provocando un desplazamiento máximo ( $h_{max}$ ) de 188, 189, and 199 nm respectivamente. Es importante observar el notable incremento en la dureza del recubrimiento de HA asociado con la integración de *n*Ag (HA-*n*AgEN).



**Figura 10.** Curva profundidad de penetración – carga de los recubrimientos HA, HA-1%*n*AgEN y HA-3%*n*AgEN.

Las propiedades mecánicas tales como rigidez, módulo de elasticidad y dureza de los recubrimientos de HA, HA-1%*n*AgEN y HA-3%*n*AgEN obtenidos mediante nanoindentación son mostrados en la tabla 1. Es claramente observado que los recubrimientos con mejores propiedades mecánicas fueron los que tenían en su contenido *n*Ag, es decir los rec. HA-1%*n*AgEN y HA-3%*n*AgEN, con valores de rigidez (S) de  $103,184 \pm 30$  y  $110,300 \pm 20$  GPa, módulo de elasticidad (E) de  $130 \pm 1.0$  y  $132 \pm 0.5$  GPa y, dureza (H) de  $8.51 \pm 0.2$  y  $8.81 \pm 10.3$  GPa, respectivamente.

**Tabla 1.** Resultados de rigidez, módulo de elasticidad y dureza de los recubrimientos de HA, HA-1%*n*AgEN e HA-3%*n*AgEN.

Recubrimiento	Rigidez, S (N/m)	Módulo de Elasticidad, E (GPa)	Dureza, H (GPa)
HA	$100,060 \pm 50$	$129 \pm 0.6$	$7.10 \pm 0.5$
HA-1% <i>n</i> AgEN	$103,184 \pm 30$	$130 \pm 1.0$	$8.51 \pm 0.2$
HA-3% <i>n</i> AgEN	$110,300 \pm 20$	$132 \pm 0.5$	$8.81 \pm 0.3$

Los resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana para la cepa de *Escherichia coli* ATCC-25922 se muestra en la tabla 2 y figura 11. En el caso de la muestra identificada como HA correspondiente al material sin agente antimicrobiano, el recuento total bacteriano al inicio de la prueba fue de 48,378 ufc/mL y después de un periodo de exposición de 24 horas la población bacteriana se incrementó significativamente hasta un valor de 41,411,111 ufc/mL. Para el caso de los rec. HA-0.5%*n*AgEN, no se registró una reducción significativa de la población microbiana (35,389,935 ufc/mL), lo cual indica que el porcentaje del agente antimicrobiano presente en dichos recubrimientos (0.5% *n*AgEN), no presentan un efecto inhibitor hacia el crecimiento de la cepa de *Escherichia coli*. de acuerdo a la norma aplicada. En el caso de los rec. HA-1%*n*AgEN y HA-3%*n*AgEN registraron valores de actividad antimicrobiana (R) de 7.61 y 7.89, respectivamente, siendo estos valores mayores al valor mínimo (2.0) especificado como mínimo aprobatorio para un material con adecuada actividad antimicrobiana. De acuerdo al análisis de % de inhibición obtenido en los materiales evaluados, el agente



antimicrobiano adicionado a los rec. HA-nAgEN (1 y 3%) confiere una excelente capacidad inhibitoria hacia la cepa de la bacteria de *Escherichia coli* evaluada, mayor al 99.9%

La actividad antimicrobiana de las diferentes muestras sometidas a la exposición con la bacteria *Pseudomonas aureoginosa* se muestran en la Tabla 3, y *Staphylococcus aureus* se muestran en la Tabla 4. Como se puede observar, el comportamiento registrado para la exposición con las bacterias *Pseudomonas aureoginosa* y *Staphylococcus aureus* es muy similar al registrado para la cepa de E. coli. En el caso de las piezas con rec. de HA-0.5%nAgEN, no se observó un control de la población microbiana, mientras que para el caso de las piezas con rec. de HA-1%nAgEN y HA-3%nAgEN, el valor de actividad antimicrobiana así como el % de reducción de la población microbiana, cumplen con los requisitos establecidos en la norma para un material con buenas propiedades antimicrobianas, superior a 2.0 y 99.9% respectivamente.

**Tabla 2.** Valor de actividad antimicrobiana (R) y % de inhibición de las muestras de recubrimiento expuestas a la bacteria *Escherichia coli*.

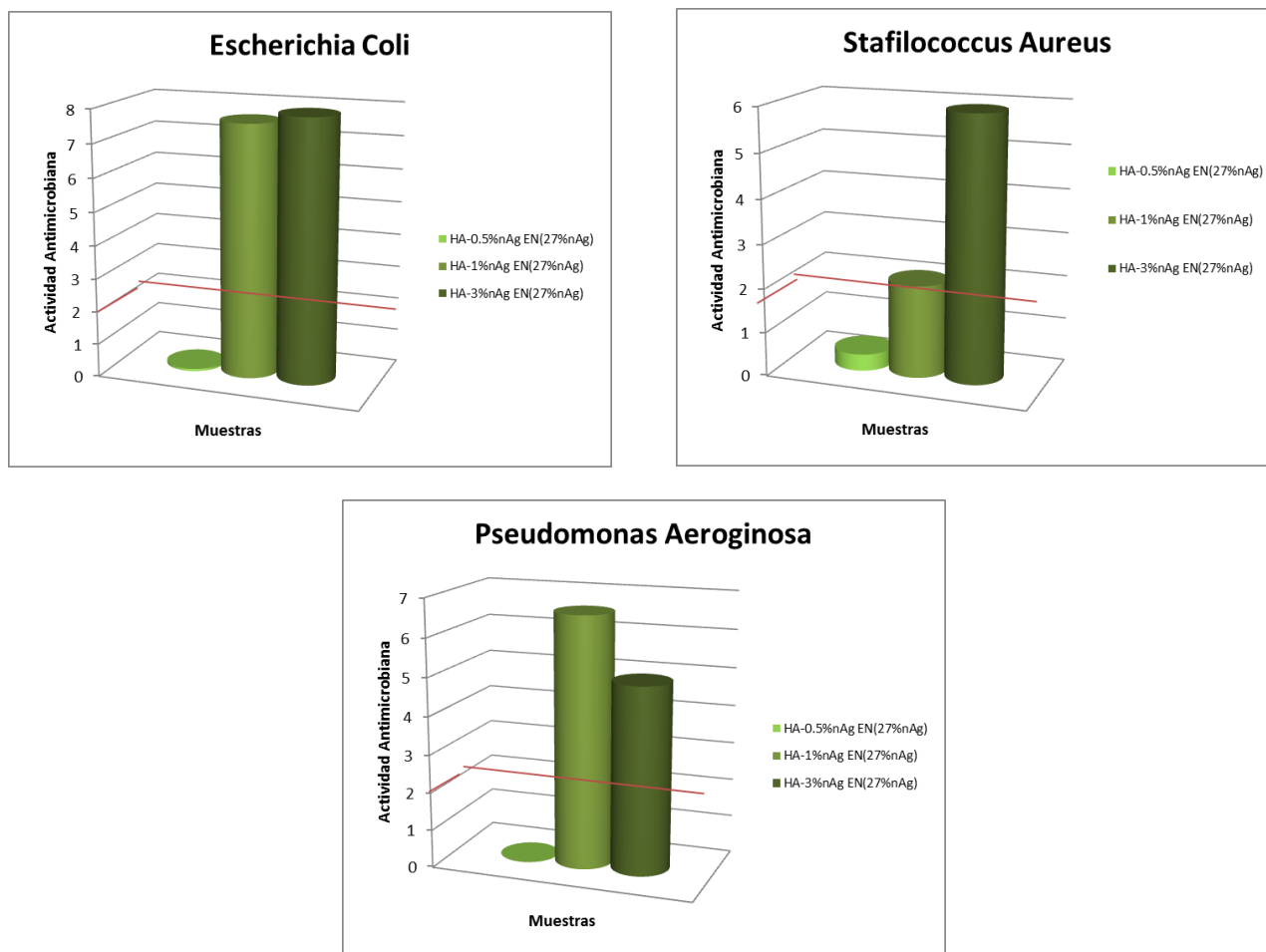
<i>ESCHERICHIA COLI</i> ATCC-25922				
Muestra	Recuento total Bacteriano (T0)	Recuento total bacteriano (T24)	Actividad Antimicrobiana	%Inhibición
HA	48,378	41,411,111	0	0
HA-0.5%nAgEN		35,389,935	0.07	14.54
HA-1%nAgEN		1	7.61	100
HA-3%nAgEN		1	7.89	100

**Tabla 3.** Valor de actividad antimicrobiana (R) y % de inhibición de las muestras de recubrimiento expuestas a la bacteria *Pseudomonas aureoginosa*.

<i>PSEUDOMONAS AUREOGINOSA</i> ATCC-27853				
Muestra	Recuento total Bacteriano (T0)	Recuento total bacteriano (T24)	Actividad Antimicrobiana	%Inhibición
HA	51,000	3,904,445	0	0
HA-0.5%nAgEN		5,454,119	-0.15	-39.69
HA-1%nAgEN		1	6.59	100
HA-3%nAgEN		390	4.93	99.99

**Tabla 4.** Valor de actividad antimicrobiana (R) y % de inhibición de las muestras de recubrimiento expuestas a la bacteria *Staphylococcus aureus*.

<i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> ATCC-29213				
Muestra	Recuento total Bacteriano (T0)	Recuento total bacteriano (T24)	Actividad Antimicrobiana	%Inhibición
HA	47,683	69,522,222	0	0
HA-0.5%nAgEN		29,303,616	0.38	57.85
HA-1%nAgEN		470,333	2.1	99.32
HA-3%nAgEN		6,952	5.94	99.99

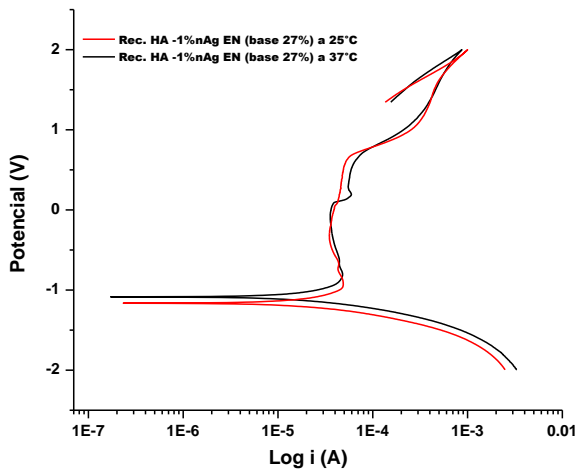


**Figura 11.** Actividad antimicrobiana de los recubrimientos evaluados con *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

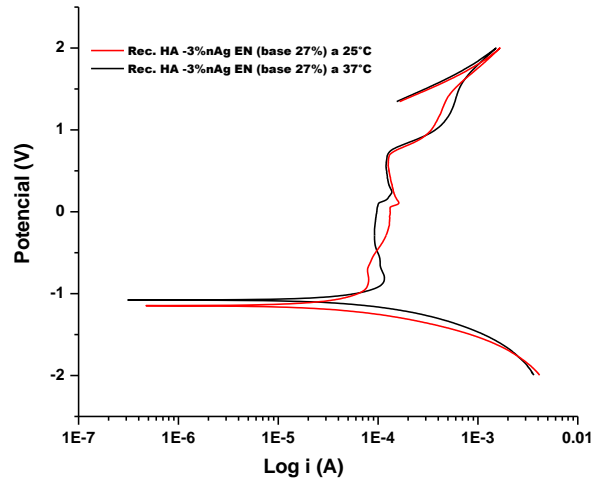
**Determinación de la Cinética de Oxidación y Análisis mediante MEB posterior a la Evaluación Electroquímica.**

En las figura 12 y 13, se puede observar el efecto de la temperatura (25 y 37°C) en el comportamiento de las curvas de polarización cíclica desarrolladas por los recubrimientos de HA-nAgEN evaluados en una solución SBF, observándose en la rama anódica un proceso de pasivación, seguido de un proceso de transpasivación; así mismo se puede apreciar que en todos los casos el mecanismo de corrosión es del tipo generalizado.

También se puede observar, que no se presenta un efecto significativo de la temperatura en la cinética de oxidación asociado con la presencia de nAgEN, ya que ambas curvas tienen un comportamiento muy similar en prácticamente todos los arreglos experimentales.



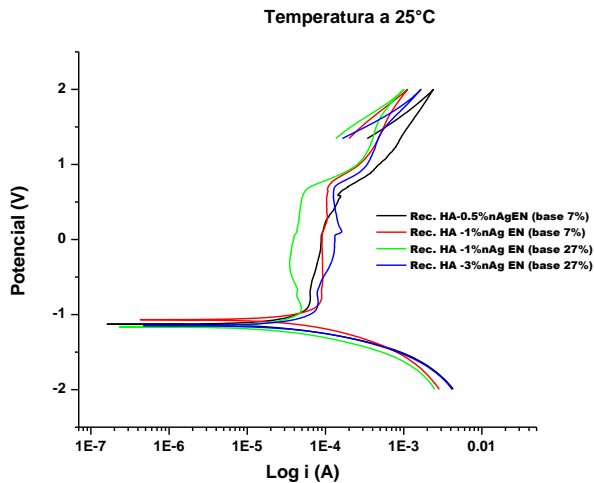
**Figura 12.** Curvas de polarización cíclica de recubrimiento HA-1%AgEN evaluado en ambas temperaturas.



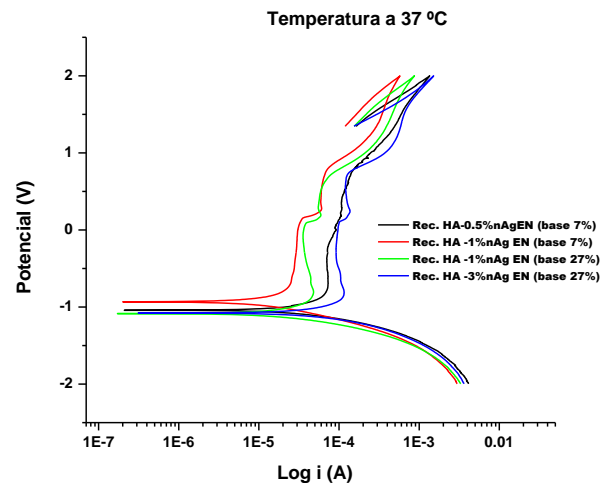
**Figura 13.** Curvas de polarización cíclica de recubrimiento HA-3%AgEN evaluado en ambas temperaturas.

En las figura 14 y 15, se muestra el efecto de las nAgEN en la reacción electroquímica generada sobre el sustrato de Ti6Al4V en ambas temperaturas (24 y 37°C) respectivamente. Los recubrimientos de HA-nAgEN al 1%(base 27%) y 3%(base 27%) muestran el efecto en la reacción electroquímica desarrollada a partir del par galvánico entre las nAg (reacción anódica) y el sustrato de Ti6Al4V (reacción catódica), donde se puede observar que el efecto de la concentración del 1% de nAg presentan un comportamiento y una densidad de corriente muy similar, sin embargo, al incrementar la concentración de las nAg a 3% se presenta un incremento en la densidad de corriente, lo cual indica que las nAg favorecen la reacción de óxido-reducción en la superficie de la doble capa electroquímica.

En cuanto al efecto de la temperatura, prácticamente la densidad de corriente se mantiene constante al incrementar la temperatura de 25 a 37°C, siendo del orden de  $\sim 3e-5$  para el recubrimiento con 1%Ag y  $\sim 1e-4$  A para los recubrimientos con 3%Ag.



**Figura 14.** Curvas de polarización cíclica de recubrimientos de HA-1%AgEN y HA-3%AgEN evaluados a 25°C.



**Figura 15.** Curvas de polarización cíclica de recubrimientos de HA-1%AgEN y HA-3%AgEN evaluados a 37°C.

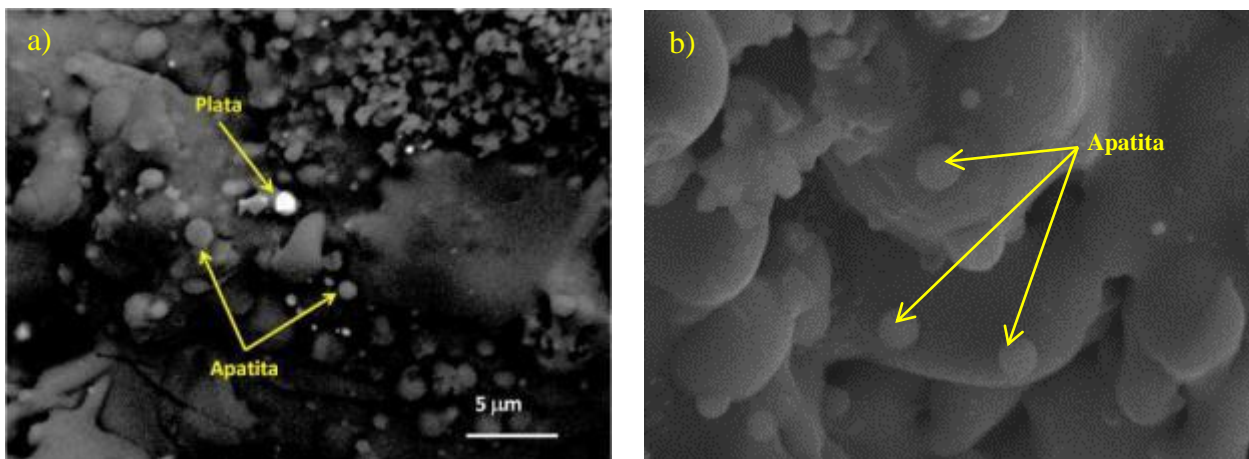
En la tabla 5, se muestra los resultados del análisis de las gráficas 14 y 15, donde se observa que no existe un incremento significativo al incrementar el porcentaje de nAg en el recubrimiento de HA-nAg EN a una

temperatura de 25°C. Sin embargo a 37°C, si se observa un ligero incremento en la densidad de corriente con el incremento en el contenido de nAg.

**Tabla 5.** Análisis electroquímico de las curvas de polarización.

Muestra	Temperatura °C	ba (V/dec)	bc (V/dec)	Ecorr (V)	icorr (A)
Rec. HA-1% nAg EN	37	0.12116	0.088823	-1.0889	6.07E-06
	25	0.10317	0.14924	-1.1675	7.62E-06
Rec. HA-3% nAg EN	37	0.13324	0.10253	-1.0791	1.67E-05

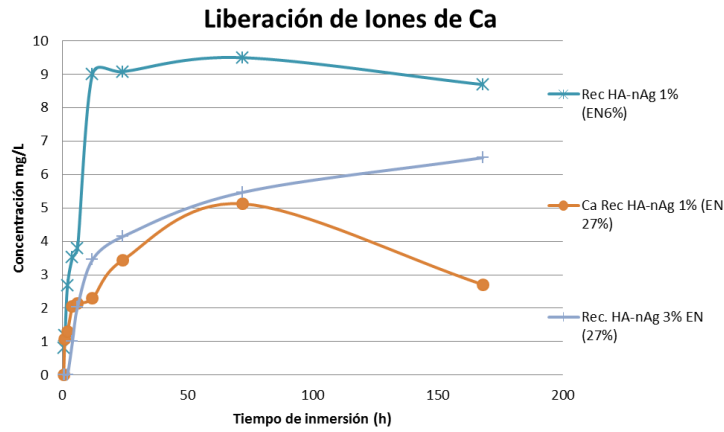
Posterior a la evaluación electroquímica de los recubrimientos de HA-nAgEN, dichos recubrimientos fueron evaluados mediante MEB. En la figura 16, se observa la generación de Apatita superficialmente en el recubrimiento HA-0.5% nAg EN, lo cual, indica que los recubrimientos de HA-nAgEN desarrollados en la presente tesis, son bioactivos debido a que genera las condiciones para la precipitación de apatita superficialmente.



**Figura 16.** Morfología superficial del rec. de HA-0.5% nAgEN, expuesto en una solución SBF. a) Modo electrones retrodispersados (3000X) y b) Modo electrones secundario (10,000X).

#### **Determinación de Liberación de Iones de Ca y Ag.**

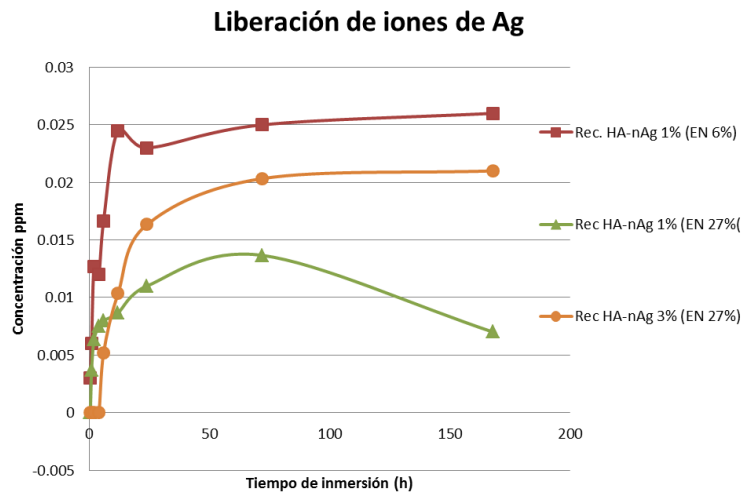
De acuerdo a los resultados obtenidos, los recubrimiento de HA-1% nAgEN e HA-3% nAgEN presentan una cantidad significativa de  $\text{Ca}^+$  liberados durante las primeras 25 horas de evaluación (ver figura 17), alcanzado un rango entre 3.5 y 9 mg/L; posteriormente se estabiliza dicha liberación de iones, manteniéndose constante para el caso del rec. de HA-1% nAgEN (base 7), alrededor de 9 mg/L, en el caso de los recubrimientos 1% nAgEN (base 27) e HA-3% nAgEN (base 27), la liberaciones de iones es ligeramente menor, del orden de 2.5 y 6.5 mg/L, presentando un comportamiento variable en función del tiempo.



**Figura 17.** Concentración de iones calcio presente en la solución PBS vs tiempo de inmersión.

En la figura 18, se puede observar la liberación  $Ag^+$  que presentan los rec. de HA-1%nAgEN (base 7), HA-1%nAgEN (base 27) e HA-3%nAgEN (base 27) posterior a ser sumergidos en una solución PBS. Al igual que el comportamiento observado en la liberación de  $Ca^{2+}$ , durante las primeras 25 horas de inmersión se presenta la mayor liberación de  $Ag^+$ ; para el caso del rec. de HA-1%nAgEN (base 7), alcanza una concentración de 25 ppb, permaneciendo constante en dicha concentración hasta cumplir las 200 horas de inmersión.

Para los recubrimientos de HA-1%nAgEN (base 27) e HA-3%nAgEN (base 27), se detectó una liberación de  $Ag^+$  máxima del orden de 13 y 20 ppb respectivamente.



**Figura 1.** Concentración de iones de plata presente en la solución PBS vs tiempo de inmersión.

## CONCLUSIONES

- Se desarrolló un recubrimiento de HA mezclado con nAg (1 y 3%) soportadas en extracto de nopal mediante proyección térmica por plasma, observando que conforme se aumenta el porcentaje de nAg, hay un incremento lineal de la adherencia, alcanzado una adherencia el rec. HA/5%nAg de 38 MPa, lo cual, se asocia a un proceso de endurecimiento de la matriz de la HA por efecto de la combinación con las nAg.
- A partir de un contenido de 1% de nAg se observó una actividad antibacteriana superior a 2 y por lo tanto una eficiencia antibacteriana superior al 99% sobre las bacterias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aureoginosa* y *Staphylococcus aureus*.

- El mecanismo de acción de las nAg adicionadas al recubrimiento de HA proyectado térmicamente, es debido a la acción combinada de la liberación de iones de Ag asociados al proceso de reducción de la nAg, desarrollando un proceso de oxidación de la membrana celular y por lo tanto, favoreciendo el ingreso de los iones de Ag hacia el interior de las bacterias.
- El otro mecanismo de acción antibacterial desarrollado por la nAg, se asocia al par galvánico generado entre las nAg y el sustrato (Ti6Al4V), lo cual, origina el consumo iones H y por lo tanto, afecta el proceso ATP de las bacterias

## REFERENCIAS

1. S.R. Paital, N.B. Dahotre, *Biomedical Materials* 2 (2007) 274–281.
2. B. LeO' n, J.A. Jansen, *Thin Calcium Phosphate Coatings for Medical Implants*, 2<sup>nd</sup> ed., Springer, New York, USA, (2009).
3. NNIS System, *Am. J. Infect. Control* 32 (2004) 470.
4. H.J. Klasen, *Burns* 26 (2000) 117.
5. J. Pratten, S.N. Nazhat, J.J. Blaker, A.R. Boccaccini, *J. Biomater. Appl.* 19 (2004) 47.
6. Ming, T. "Regenerative Medicine, Artificial Cells and Nanomedicine" . *World Scientific*. 2007, Vol. 1, 15.
7. Chen, H., Yang, W., Zhang, Q., Wang, Y. "Controlled release of dual drugs from emulsion electrospun nanofibrous mats". 2009, Vol. 73, p. 75.
8. Khaydarov, R., Gapurova, O., Estrin, Y. "Antimicrobial effects of silver nanoparticles synthesized by an electrochemical method". *Nanostructured materials for Advanced Technological Applications, Springer Science*. 2009, pp. 215-216.
9. Geethalakshmi R., Sarada D.V.L.. Characterization and antimicrobial activity of gold and silvernanoparticles synthesized using saponin isolated from *Trianthemadecandra L.* *Industrial Crops and Products* 51 (2013) 107– 115
10. Chandran, S.P., Chaudhary, M., Pasricha, R., Ahmad, A., Sastry, M. "Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using Aloe vera plant extract". *Biotechnology Progress*. 2006, Vol. 22, 2, pp. 577-583.
11. Gary A. Fielding, Mangal Roy, Amit Bandyopadhyay, Susmita Bose. Antibacterial and biological characteristics of silver containing and strontium doped plasma sprayed hydroxyapatite coatings *Acta Biomaterialia* 8 (2012) 3144–3152.
12. Yikai Chen, Xuebin Zheng, Youtao Xie, Chuanxian Ding, Hongjiang Ruan y Cunyi Fan . Anti-bacterial and cytotoxic properties of plasma sprayed silver-containing HA coatings *J Mater Sci: Mater Med* (2008) 19:3603–3609
13. Kai Li, Youtao Xie, Haiyong Ao, Liping Huang, Heng Ji, Xuebin Zheng. The enhanced bactericidal effect of plasma sprayed zinc-modified calcium silicate coating by the addition of silver. *Ceramics International* 39 (2013) 7895–7902
14. M. Jelínek, M. Weiserová, T. Kocourek, M. Zezulová, y J. Strnad. Biomedical Properties of Laser Prepared Silver-Doped Hydroxyapatite. *Laser Physics*, 2011, Vol. 21, No. 7, pp. 1265–1269.
15. Baoe Li, Xuanyong Liu, Cong Cao, Yuqi Dong, Chuanxian Ding. Biological and Antibacterial Properties of Plasma Sprayed Wollastonite/Silver Coatings. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2009
16. Iwao Noda, Fumiaki Miyaji, Yoshiki Ando, Hiroshi Miyamoto, Takafumi Shimazaki, Yutaka Yonekura, Masaki Miyazaki, Masaaki Mawatari, Takao Hotokebuchi. Development of Novel Thermal Sprayed Antibacterial Coating and Evaluation of Release Properties of Silver Ions. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2008.
17. Sen Yang, H.C. Man, Wen Xing, Xuebin Zheng. *Surface & Coatings Technology*, 203 (2009) 3116–3122