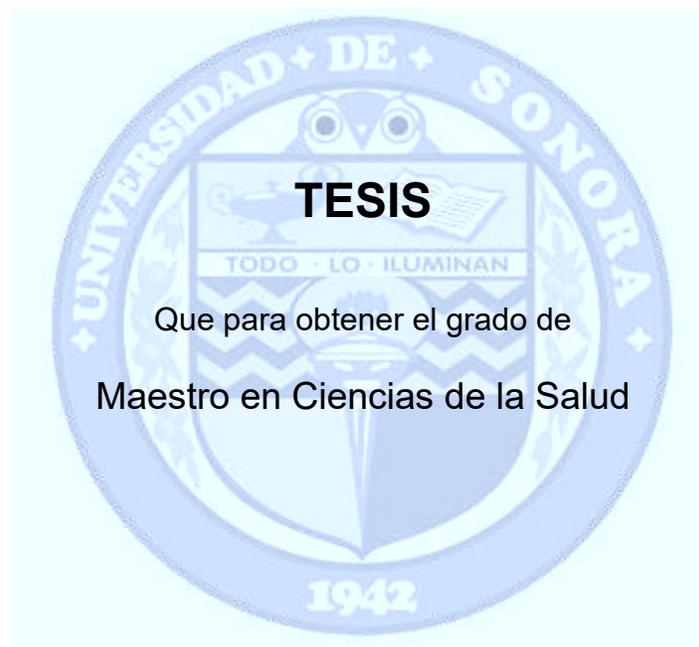


UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Evaluación y caracterización de materiales cerámicos como un soporte de crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv en una prueba de susceptibilidad a rifampicina



Presenta

Diego Moisés Monge Zazueta

Hermosillo, Sonora

Septiembre de 2012

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



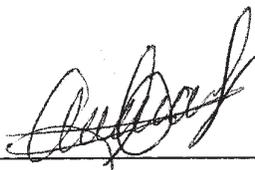
Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

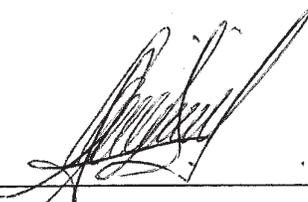
Los miembros del Jurado Calificador designado para revisar el Trabajo Tesis de **Diego Moisés Monge Zazueta**, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Salud.



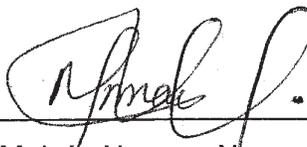
Dra. Adriana Garibay Escobar
Director Académico



Dra. Ana Lilia Leal Cruz
Secretario



Dr. Eduardo Ruíz Bustos
Vocal



M.C. Moisés Navarro Navarro
Suplente

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por darme la vida y la oportunidad de disfrutar todo lo que él creó, por acompañarme en todos los momentos de la vida, por rodearme de gente buena la cual me ayudó a superarme día con día.

A la **Universidad de Sonora** por haber sido escuela y casa durante mis estudios profesionales. Gracias a mi Alma Máter por ser testigo de esta etapa de mi vida.

A mis **Sinodales** (Dra. Adriana Garibay Escobar, Dra. Ana Lilia Leal Cruz, Dr. Eduardo Ruiz Bustos y M.C Moisés Navarro Navarro) por su gran apoyo durante la realización del trabajo. Gracias por la ayuda brindada desinteresadamente cuando necesitaba sus consejos.

Al Maestro Oscar Sánchez encargado del laboratorio de fisicoquímica, al Dr. Manuel Pérez Tello del departamento de ingeniería química y metalurgia, al Dr. Jesús Castillo Santos investigador del DIFUS y al ingeniero Roberto Mora Monroy de la Universidad de Sonora por sus aportaciones y su apoyo para la realización del trabajo.

Al **Laboratorio Estatal de Salud Pública** por todas las facilidades brindadas para la realización de este trabajo.

Al personal que labora en el laboratorio de Agentes Patógenos de Alta Peligrosidad, al personal del laboratorio de Microbiología Epidemiológica y al personal del laboratorio de preparación de medios de cultivo.

A la química Ángela Edith Lara encargada del laboratorio de microbiología epidemiológica, a la química Rosario Aguayo encargada del laboratorio de agentes patógenos de alta peligrosidad, al químico José Zepeda encargado del laboratorio de preparación de medios de cultivo y al químico Daniel Octavio Aguilar subdirector del Laboratorio Estatal de Salud Pública por su apoyo en las instalaciones del Laboratorio Estatal de Salud Pública.

Al **CINVESTAV**, unidad Saltillo por apoyarme en la estancia realizada para la culminación de mi trabajo.

Al Dr. Martín I. Pech Canul por apoyarme durante mi estancia en CINVESTAV Saltillo y permitirme realizar los estudios pertinentes para la culminación del trabajo.

Al **CONACYT** por apoyar el proyecto de investigación financieramente y por su comprensión en los momentos difíciles.

Al cuerpo académico de biología y bioquímica por compartir esta etapa tan especial de mi vida, por brindarme su amistad. Gracias por permitirme formar parte de este gran equipo.

Al M.C Enrique Wenceslao Coronado Aceves por su apoyo en la realización del trabajo y por su gran amistad otorgada. Gracias por estar siempre cuando se necesitaba un consejo, por escuchar y ayudarme en los momentos difíciles. Muchas gracias.

Agradecimiento a CONACyT

Agradecemos el apoyo económico para la realización de este trabajo de tesis al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del proyecto: Desarrollo de un método rápido de drogasusceptibilidad para *Mycobacterium tuberculosis* mediante el uso de materiales cerámicos (162175).

DEDICATORIAS

Son tantas las personas a las cuales les debo el hecho de lograr mi culminación académica que de todo corazón les escribo estas palabras.

Primeramente a Dios nuestro señor por darme la vida y salud para poder terminar esta etapa de mi vida que es y sigue siendo maravillosa, por dejarme conocer a personas que me han ayudado, tanto académicamente como humanamente, a crecer como persona.

A mi Madre, gracias de todo corazón, por brindarme todo su apoyo, amor, paciencia y por estar a mi lado todo este tiempo. Por demostrarme que se puede avanzar por más problemas que se presenten. Gracias te doy madre por educarme de la manera que lo hiciste, porque gracias a ti soy una mejor persona. Te agradezco por apoyarme en todas mis decisiones, por darme todos esos conocimientos que solo una madre puede dar. Por estar a mi lado, tanto física como moralmente. Muchas gracias MAMÁ TE AMO MUCHO.

A mi Padre y a mis hermanos por su apoyo desinteresado, les agradezco que siempre estuvieran a mi lado, por los consejos que me dieron cuando los necesite. Gracias le doy por creer siempre en mí. MUCHAS GRACIAS.

A mi Novia por apoyarme en las buenas y en las malas, por ser un pilar en toda mi vida, por apoyarme en mis decisiones y creer ciegamente en mí. Por apoyarme en la realización del trabajo, por estar siempre a mi lado. Gracias por apoyarme en mi decisión de superarme académicamente. MUCHAS GRACIAS Y TE AMO MUCHO DODY.

GRACIAS DE TODO CORAZÓN

DIEGO MOISES MONGE ZAZUETA

ÍNDICE

| | Página |
|---|---------------|
| LISTA DE FIGURAS | ix |
| LISTA DE TABLAS | xi |
| OBJETIVOS | xii |
| Objetivo general | xii |
| Objetivos específicos | xii |
| RESUMEN | xiii |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| ANTECEDENTES | 5 |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 6 |
| Diagnóstico de la tuberculosis | 7 |
| Antecedentes médicos | 7 |
| Examen físico | 8 |
| Pruebas para detectar la infección por tuberculosis | 8 |
| Radiografía de tórax | 8 |
| Microbiología diagnóstica | 9 |
| Resistencia a los medicamentos | 9 |
| Cultivo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 10 |
| Materiales cerámicos | 11 |
| Alúmina | 12 |
| Wollastonita | 13 |
| Hidroxiapatita | 14 |
| Biomateriales | 16 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 18 |
| Selección de materiales cerámicos | 18 |

| | |
|---|-----------|
| Preparación de los soportes cerámicos | 19 |
| Análisis térmico | 19 |
| Ensayo de alamar azul en microplaca (MABA) | 20 |
| Caracterización química | 21 |
| Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS) | 21 |
| Difracción de rayos X | 22 |
| Microscopía electrónica de barrido | 23 |
| Espectroscopia infrarroja | 23 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 24 |
| CONCLUSIONES | 53 |
| BIBLIOGRAFÍA | 54 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | | Página |
|--------|--|--------|
| 1 | Análisis térmico de la alúmina. | 26 |
| 2 | Análisis térmico de la wollastonita. | 28 |
| 3 | Análisis térmico de hidroxiapatita referida con 34 a 40% de calcio. | 30 |
| 4 | Análisis térmico de hidroxiapatita referida con el 96% de pureza. | 31 |
| 5 | Representación de la placa de trabajo. | 34 |
| 6 | Espectroscopia infrarroja de la hidroxiapatita con 34-40% de calcio sin sinterizar (en verde). | 37 |
| 7 | Espectroscopia infrarroja de la hidroxiapatita con 34-40% de calcio sinterizada a 1200°C por 1 hora. | 38 |
| 8 | Difracción de rayos X del soporte de hidroxiapatita con 34-40% de calcio sin sinterizar (en verde). | 40 |
| 9 | Difracción de rayos X del soporte de hidroxiapatita con 34-40% de calcio sinterizada a 1200°C por 1 hora. | 41 |
| 10 | Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X de hidroxiapatita. | 43 |
| 11 | XPS de hidroxiapatita con 34 – 40% de calcio sinterizada. | 44 |
| 12 | XPS de hidroxiapatita con el 34 – 40% calcio después de la sinterización y en contacto con medio y reactivo de azul de alamar. | 46 |
| 13 | Fotografías de soportes de hidroxiapatitas con 34-40% de calcio sin crecimiento bacteriano. | 49 |
| 14 | Fotografías de soportes de hidroxiapatitas con 34-40% de calcio, con islas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . | 50 |
| 15 | Fotografías de soportes de hidroxiapatitas con 34-40% de | 51 |

calcio a 10,000X de magnificación.

- 16 Comparación de los soportes de hidroxiapatita con 34-40% de calcio. 52

LISTA DE TABLAS

| Tabla | | Página |
|--------------|--|---------------|
| I | Concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) de los soportes utilizados en el ensayo de susceptibilidad a rifampicina. | 35 |
| II | Concentraciones atómicas de soportes de hidroxiapatita con 34-40% de calcio de diferentes pozos. | 47 |

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar y caracterizar materiales cerámicos como un soporte de crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv en una prueba de susceptibilidad a rifampicina.

Objetivos Específicos

- Seleccionar los materiales cerámicos para la inducción del crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.
- Establecer las condiciones de sinterización de los soportes cerámicos mediante un análisis térmico diferencial.
- Evaluar la capacidad de inducción de crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv por los soportes cerámicos en una prueba de susceptibilidad a rifampicina
- Caracterizar químicamente los soportes cerámicos capaces de promover el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

RESUMEN

La tuberculosis (TB) es un padecimiento ocasionado por el complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Según la Organización Mundial de Salud (OMS) en el 2010 hubo 8.8 millones de casos incidentes de TB y 1.2 millones de muertes por tuberculosis. *Mycobacterium tuberculosis* se desarrolla de forma adecuada en medios simples que contiene una fuente de carbono, una de nitrógeno e iones de metales esenciales entre ellos hierro y magnesio. Sin embargo, los bacilos tuberculosos tienen un crecimiento muy lento (período de replicación aproximadamente de 18 horas) incluso en condiciones óptimas y requiere de 15 a 20 días de incubación a 37°C para que sus colonias sean visibles, de tal manera que su aislamiento e identificación es sumamente tardado. Se han diseñado algunos métodos rápidos para el cultivo y aislamiento de *Mycobacterium tuberculosis*. Uno de los materiales con un futuro prometedor son los materiales cerámicos, siendo compuestos químicos o soluciones complejas que contienen elementos metálicos y no metálicos, generalmente unidos mediante enlaces covalentes. En este tipo de materiales existe una tendencia natural al desarrollo de biopelículas. Se ha reportado, para *Mycobacterium tuberculosis*, que existe la tendencia natural de formación de una biopelícula, la cual le confiere nutrientes a la bacteria para su crecimiento, así como una defensa contra el sistema inmune del hospedero. Para el presente trabajo se elaboraron soportes cerámicos con polvos de alúmina, wollastonita e hidroxiapatita por prensado uniaxial, para posteriormente realizar una caracterización térmica de las mismas. El análisis térmico diferencial muestra que la alúmina y la wollastonita presentan temperaturas de sinterización mayor a 1200°C y la hidroxiapatita se densifica entre 900 - 1200°C. Los ensayos microbiológicos revelan una concentración mínima inhibitoria (MIC) para la rifampicina sin soporte de 0.1171 µg/mL, al igual que en presencia de hidroxiapatita con el 96% de pureza. Sin embargo cuando se

realizó un ensayo con la presencia del soporte de hidroxiapatita con el 34-40% de calcio la MIC obtenida fue de 0.2342 $\mu\text{g/mL}$. Los resultados de difracción de rayos X, en la muestra de hidroxiapatita sin sinterizar (en verde), muestran que se encuentra presente únicamente la fase correspondiente a hidroxiapatita y en la muestra de hidroxiapatita sinterizada a 1200°C por una hora seguía presente la fase de hidroxiapatita, así como la aparición de la fase de óxido de calcio. Cuando se realizó la espectroscopia infrarroja al soporte de hidroxiapatita con 34-40% de calcio se observó la presencia de los grupos funcionales característicos de la hidroxiapatita. En cuanto a la espectroscopia fotoelectrónica de rayos X, observamos la presencia de los elementos presentes en la hidroxiapatita (calcio, oxígeno, carbono y fósforo), también muestra la concentración atómica de los elementos presentes, en los cuales se observa la disminución de oxígeno en aquellos pozos donde se va disminuyendo la concentración de rifampicina, así como el aumento de la cantidad de bacterias. En las fotografías tomadas por microscopía electrónica de barrido (MEB) se logró observar la presencia de islas de *Mycobacterium tuberculosis* sobre la superficie del soporte. Por los resultados obtenidos se concluye que la hidroxiapatita se puede densificar entre los 900 – 1200°C, además el soporte de hidroxiapatita referida con el 34-40% de calcio favoreció el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es un padecimiento ocasionado por el complejo *Mycobacterium tuberculosis*, el cual incluye a las especies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti* y *M. pinnipedii*, siendo *M. tuberculosis* el principal agente etiológico de la TB. La manifestación más frecuente es la pulmonar, que representa la forma infectante de la tuberculosis y por ende la de mayor importancia epidemiológica. A pesar de que la tuberculosis es una de las enfermedades más antiguamente estudiada sigue representando un problema de la salud pública a nivel mundial (Bernardelli y col., 2004; Castellanos y col., 2008; OMS, 2012).

Mycobacterium tuberculosis crece de forma adecuada en medios simples que contienen fuente de carbono, de nitrógeno e iones de metales esenciales entre ellos hierro y magnesio. Sin embargo, los bacilos tuberculosos tienen un crecimiento muy lento incluso en condiciones óptimas y requiere de 15 a 20 días de incubación a 37°C para que sus colonias sean visibles, de tal manera que su aislamiento e identificación es sumamente tardada. Además, las determinaciones indirectas de la viabilidad, y por lo tanto, de la actividad de drogas no son posibles en un tiempo menor a una semana mediante la medición de algunos aspectos del metabolismo (Alcaide y Antín., 2008; González, 2004; Sebhatu y col., 2007; Ray, 2004; Franzblau y col., 2004).

La aparición de cepas multidrogorresistentes y extremadamente drogorresistentes ha generado la imperiosa necesidad de buscar métodos rápidos de diagnóstico para poder iniciar un tratamiento personalizado, reduciendo así las posibilidades de fracaso y/o recaída, además de evitar la propagación de dichas cepas en la comunidad.

Se han diseñado algunos métodos rápidos para el cultivo y aislamiento de *M. tuberculosis*, así como para evaluar tempranamente su susceptibilidad a los

antibióticos, o bien utilizan marcadores moleculares predictivos. Sin embargo, el uso de estos métodos es limitado ya que no es posible cubrir todos los marcadores de manera confiable, y en muchos casos no es factible disponer de recursos físicos y/o humanos altamente especializado (Van Deun y col., 2010).

Está descrito que, en la producción de biomasas los sistemas que inmovilizan células ofrecen muchas ventajas respecto a los sistemas de células libres, como lo es la generación de una alta densidad celular. Dentro de los métodos descritos para promover la inmovilización de células se encuentran las trampas de redes poliméricas, membranas y la microencapsulación, así como la unión o adsorción a un acarreador o sustrato preformado. En estos últimos se pueden mencionar a los sustratos cerámicos (Lacroix y col., 2005).

Los materiales cerámicos son compuestos químicos o soluciones complejas que contienen elementos metálicos y no metálicos, generalmente unidos mediante enlaces covalentes. Entre ellos se encuentran el carburo de silicio (SiC), el nitruro de silicio (Si₃N₄), la alúmina (Al₂O₃), la hidroxiapatita (Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂) y la wollastonita (CaSiO₃). El primero de ellos ha sido ampliamente utilizado en aplicaciones estructurales en las que se aprovechan sus propiedades mecánicas, mientras que los cuatro últimos, se han empleado exitosamente como biomateriales mismos que pueden ser sintéticos o naturales, sólidos o líquidos y son ampliamente utilizados en dispositivos con el propósito de interactuar con los sistemas biológicos.

En este tipo de materiales, ampliamente utilizados en trasplantes, existe una tendencia natural al desarrollo de biopelículas en etapas post-implante, las cuales son responsables de las infecciones y el rechazo de las piezas implantadas. Por ello, se ha investigado la formación de biopelículas sobre una variedad de biomateriales metálicos (titanio y acero inoxidable), polímeros (polietileno) y cerámico (hidroxiapatita, alúmina y cerámicos compuestos con wollastonita). Gran parte de los estudios que se han realizado en esta área se

enfocan al desarrollo de estrategias para el combate de las biopelículas o en la producción de materiales inhibidores. Así, se ha observado que los biomateriales más ampliamente usados tienen la capacidad de actuar como sustratos que promueven la colonización por bacterias, facilitando la formación de biopelículas (Carter y Norton, 2007; Cazander y col., 2009; James y col., 2006; Misson y Razali, 2007; Sarkar y col., 2003; Ortega y col., 2008; Ingham y col., 2008).

Una biopelícula es un ecosistema microbiano organizado, conformado por microorganismos pertenecientes a diferentes géneros y especies, asociados a una superficie viva o inerte, con características funcionales y estructurales complejas. En las biopelículas los microorganismos se adhieren a las superficies gracias a la secreción de un exopolímero que forma una matriz adhesiva protectora. Las biopelículas están compuestas por 15% de células y 85% de matriz extracelular que contiene polisacáridos; en ella se forman canales por donde circulan agua, enzimas, nutrientes y residuos. En el caso del ser humano, las biopelículas se asocian a un gran número de procesos infecciosos. Algunos investigadores señalan que *M. tuberculosis* es capaz de formar biopelículas con requerimientos específicos genéticos y ambientales, distintos de aquellos requeridos por los cultivos planctónicos, los cuales contienen una matriz extracelular rica en ácidos micólicos libres, y albergan una importante población tolerante a las drogas que persiste a pesar de estar expuestas a altos niveles de antibióticos (Allison, 2000; Dune, 2002; Lens y col., 2003; Marsollier y col., 2005; Ojha y col., 2008).

Por lo anterior, el enfoque de este trabajo está dirigido a la evaluación y caracterización de materiales cerámicos como soporte de crecimiento para *M. tuberculosis* mediante la selección de los materiales cerámicos, la elaboración de los soportes y su posterior caracterización por las técnicas de difracción de rayos X, microscopía electrónica de barrido acoplado a un espectrómetro de

dispersión de energía (MEB/EDS), espectroscopia infrarroja y espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS).

ANTECEDENTES

Según la Organización Mundial de la Salud, en su reporte del 2011, reportó que en 2010 hubo 8.8 millones de casos incidentes de tuberculosis y 1.4 millones de muertes ocasionados por esta enfermedad en el mundo. En 2010 la mayoría de los casos se registraron en Asia (59%) y África (26%); en las regiones del Mediterráneo Oriental, Europa y América las cifras fueron del 7%, 5% y 3%, respectivamente. Los cinco países con mayor número de casos en 2010 fueron India (2 - 2.5 millones), China (0.9 - 1.2 millones), Sudáfrica (0.40 – 0.59 millones), Indonesia (0.37 – 0.54 millones), Pakistán (0.33 - 0.48 millones). De los 8.8 millones de casos incidentes registrados en 2010, se calcula que 1 – 1.2 millones eran VIH-positivos, la proporción de casos de TB coinfectados con el VIH es más alta en los países de la región de África, en general, la región de África representó el 82% de los casos de tuberculosis entre las personas que viven con el VIH. Se calcula una prevalencia de 12 millones de casos (11 - 14 millones) de tuberculosis en 2010, lo que equivale a 178 casos por cada 100 000 habitantes (WHO, Global tuberculosis control, 2011).

En 2010, se estima que hubo 1.1 millones de muertes (0.9 – 1.2 millones) de tuberculosis entre las personas VIH-negativas, incluyendo 0.32 millones de muertes en mujeres, equivalente a 15 muertes por cada 100 000 habitantes. Además, hubo una incidencia de 0.35 millones de muertes por tuberculosis en personas VIH-positivo. Estas últimas son consideradas como muertes por VIH en la clasificación internacional de enfermedades (CIE-10).

En el 2010 las cifras estimadas de casos de TB y de muertes por TB en pacientes VIH-positivos se han duplicado en comparación con las publicadas por la OMS en años anteriores, pero eso no significa que el número real de dichos casos y muertes se haya duplicado entre 2006 y 2007 (WHO, Global tuberculosis control, 2011).

Se calcula que en 2010 hubo 12 millones de casos de TB multirresistente (TB-MR), el 85% de los cuales corresponden a 27 países (WHO, Global tuberculosis control, 2011).

Mycobacterium tuberculosis

Mycobacterium es el único género de la familia de las bacterias *Mycobacteriaceae*, por sus características únicas y por la importancia médica de las mismas. Las micobacterias son bacilos delgados, aeróbicos, inmóviles, ligeramente curvos o en forma de caña recta, que miden de 0.2-0.6 μm de diámetro por 1.0-10 μm de longitud. Las especies micobacterianas usualmente se han separado en dos grupos: las pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* y las llamadas micobacterias no tuberculosas (Coll, 2003).

Mycobacterium tuberculosis es una bacteria ácido-alcohol resistente frecuentemente incolora, aeróbica estricta. Su crecimiento está subordinado a la presencia de oxígeno y al valor del pH circundante. Es muy resistente al frío, la congelación y la desecación; por el contrario muy sensible al calor, la luz solar y la luz ultravioleta. Su multiplicación es muy lenta (se divide cada 16 a 20 horas) y ante circunstancias adversas puede entrar en estado latente, pudiendo retrasar su multiplicación desde algunos días hasta varios años. El reservorio natural del *M. tuberculosis* es el hombre (Borrero y col., 2011).

El principal agente causal de la tuberculosis es *Mycobacterium tuberculosis*, organismo del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, el cual también incluye a *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti* y *M. pinnipedii*. Cualquier especie del complejo *Mycobacterium tuberculosis* puede causar infección tuberculosa (Blythe y col., 2007).

Mycobacterium tuberculosis puede causar enfermedad en cualquier órgano del cuerpo, siendo lo más frecuente la infección en los pulmones, desde donde se disemina a otros órganos por vía sanguínea o linfática. Los síntomas aparecen cuando las lesiones son ya muy extensas, de forma que el

diagnóstico se establece cuando la enfermedad está muy avanzada. Los síntomas que la delatan son: fiebre, sudoración, adelgazamiento, expectoración purulenta y tos (WHO, Global tuberculosis control, 2011).

El medio de cultivo más utilizado en el aislamiento e identificación es el de Löwenstein Jensen. La bacteria requiere por lo menos de 15 días para presentar un desarrollo visible macroscópicamente sobre el medio de cultivo y necesita hasta 8 semanas debiéndose incubar un promedio de 30 días; sus colonias son de color blanco cremoso, son esféricas, secas, rugosas, opacas, polimorfas y de dimensiones variables. Los laboratorios especializados, realizan pruebas de susceptibilidad antibiótica (antibiograma) de las cepas aisladas y que ofrecen resistencia al tratamiento convencional (<http://www.cdc.gov/tb/>).

Diagnóstico de la Tuberculosis

Una evaluación médica completa para diagnosticar la enfermedad de la tuberculosis comprende:

Antecedentes Médicos

Los médicos deben preguntar al paciente si ha tenido antecedentes de exposición a la tuberculosis, ya sea la infección o la enfermedad. También es importante tener en cuenta los factores demográficos (p.ej., país de origen, edad, raza o grupo étnico, profesión) que pueden aumentar la probabilidad del riesgo de exposición del paciente a la tuberculosis o a la tuberculosis resistente a los medicamentos. Además, los médicos deben determinar si el paciente tiene afecciones o trastornos médicos, especialmente la infección por el VIH, ya que estas aumentan el riesgo de que la infección de tuberculosis latente genere la enfermedad conocida como tuberculosis (<http://www.cdc.gov/tb/>).

Examen Físico

El examen físico puede proporcionar información valiosa sobre el estado general del paciente y otros factores que podrán influir en el tratamiento contra la tuberculosis, como la infección por el VIH y otras enfermedades (<http://www.cdc.gov/tb/>).

Pruebas para Detectar la Infección por Tuberculosis

Para detectar la infección por *Mycobacterium tuberculosis* se puede utilizar la prueba cutánea de la tuberculina, también conocida como método de Mantoux (TST, por sus siglas en inglés), o la prueba de sangre para detectar la tuberculosis. Se necesitarán otras pruebas para confirmar que la persona está enferma de tuberculosis. La prueba cutánea de la tuberculina o de Mantoux se realiza inyectando en la parte inferior del brazo una pequeña cantidad de líquido llamado tuberculina. Entre 48 y 72 horas después, un miembro capacitado del personal de salud interpreta la prueba al buscar una reacción (induración) en el brazo (<http://www.cdc.gov/tb/>).

La prueba de sangre para detectar la tuberculosis mide las reacciones del sistema inmunitario del paciente contra *Mycobacterium tuberculosis* (<http://www.cdc.gov/tb/>).

Radiografía de Tórax

La radiografía de tórax anteroposterior se utiliza para detectar anomalías en el pecho. Las lesiones se pueden presentar en cualquier parte de los pulmones con tamaño, forma, densidad o cavitación variable. Estas anomalías pueden ser un indicio de tuberculosis, pero no son suficientes para hacer un diagnóstico definitivo de la enfermedad. Sin embargo, una radiografía de tórax puede servir para descartar la posibilidad de tuberculosis pulmonar en una persona que ha tenido una reacción positiva a la prueba cutánea de la tuberculina o a la prueba

de sangre para detectar la tuberculosis y que no tiene síntomas de la enfermedad (<http://www.cdc.gov/tb/>).

Microbiología Diagnóstica

La presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) en un cultivo de esputo o de otra muestra a menudo indica que la persona está enferma de tuberculosis. El análisis microscópico de bacilos ácido-alcohol resistentes es una técnica fácil y rápida, pero no confirma el diagnóstico de la tuberculosis porque algunos bacilos acidorresistentes no son *Mycobacterium tuberculosis*. Por lo tanto, para confirmar el diagnóstico se hace un cultivo de todas las muestras iniciales (sin embargo, no siempre es necesario obtener un resultado positivo en el cultivo para comenzar o continuar el tratamiento contra la tuberculosis). Un resultado positivo en el cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* confirma el diagnóstico de la enfermedad de la tuberculosis. Los análisis de todos los cultivos de las muestras se deben completar, independientemente de los resultados de los frotis de BAAR (<http://www.cdc.gov/tb/>).

Resistencia a los Medicamentos

En todos los casos, la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* aislada por primera vez debe analizarse para determinar su resistencia a los medicamentos. Es muy importante identificar esta resistencia a los medicamentos tan pronto como sea posible para garantizar un tratamiento eficaz. Deben repetirse los patrones de sensibilidad a los medicamentos en los pacientes que no respondan adecuadamente al tratamiento o que hayan tenido resultados positivos en sus cultivos pese a que han recibido tratamiento durante 3 meses (<http://www.cdc.gov/tb/>).

Cultivo de *Mycobacterium tuberculosis*

El descubrimiento del agente causal por el Dr. Robert Koch en Alemania en 1882, permitió avanzar en el diagnóstico microbiológico. La prueba de Ziehl Neelsen o tinción ácido-alcohol resistente fue descrita por dos investigadores alemanes: Franz Ziehl (1859-1929) microbiólogo y Friedrich Neelsen (1854-1894), patólogo. La tinción utiliza carbolfucsina, ácido alcohol y azul de metileno. Las micobacterias se tiñen de rojo, lo cual permite establecer la presunción diagnóstica. Tanto la baciloscopía como el cultivo de *M. tuberculosis* en medio Löwestein Jensen han sido y son el arma básica del diagnóstico. En países de alta prevalencia la enfermedad es confirmada con la clínica y la baciloscopía, siendo estrategia fundamental, encontrar sintomatología respiratoria (paciente con más de 15 días de tos con expectoración) a través de la búsqueda pasiva, a fin de lograr las metas de diagnosticar por este medio al menos el 70% de los pacientes con la enfermedad y curar más del 85% de los pacientes diagnosticados (Solórzano y Varela, 2006).

El cultivo de *M. tuberculosis* sigue siendo el método de referencia para el diagnóstico de la tuberculosis, ya que la recuperación del microorganismo a partir del cultivo es esencial para el establecimiento del diagnóstico definitivo de la enfermedad. La sensibilidad del cultivo no es total, ya que muchas micobacterias pueden no ser liberadas del material proteínico por el agente mucolítico y otras pueden morir debido a la acción del agente descontaminante, disminuyendo así la cantidad de inóculo. Sin embargo, se ha recomendado que todas las muestras clínicas sean cultivadas, ya que el cultivo es una técnica capaz de detectar 10 micobacterias/mL de material digerido y concentrado, además permite la posterior identificación de la bacteria así como pruebas de susceptibilidad a drogas (Sánchez, 2009).

Los medios de cultivo utilizados para el aislamiento de *M. tuberculosis* pueden ser sólidos o líquidos, incubados a 37°C durante seis a ocho semanas

con un 10% de CO₂. Entre los medios sólidos se encuentran Löwenstein Jensen, Middlebrook 7H10, 7H11 y agar selectivo 7H11. La desventaja principal de los medios sólidos es que requieren hasta 8 semanas de incubación para obtener un aislamiento, aunque la mayoría de aislamientos se obtienen entre las 3 y 6 semanas. El uso de medios líquidos ha logrado disminuir el tiempo necesario para el cultivo de los bacilos. Entre éstos se encuentran el caldo Middlebrook 7H9 y el caldo radiométrico BACTEC[®]12 (Schluger, 2001; Sepkowitz, 1995).

A partir del cultivo es posible realizar la identificación de *M. tuberculosis* evaluando la apariencia de las colonias y las pruebas bioquímicas, acumulación positiva de niacina, reducción de nitratos a nitritos, actividad débil de catalasa que se pierde al calentar a 68°C (Schluger, 2001).

Materiales Cerámicos

Son compuestos o soluciones inorgánicas de elementos metálicos y no metálicos. Debido a sus enlaces iónicos y covalentes son duros, frágiles, tiene baja conductividad eléctrica y térmica (Lopes y col., 1999).

Los cerámicos se definen como un grupo versátil de materiales, compuestos por elementos no metálicos tales como: silicatos, óxidos metálicos, carburos, sulfatos, aluminatos, entre otros, los cuales se encuentran en grandes cantidades en la naturaleza. Las propiedades comunes de los cerámicos son: alta estabilidad química, baja densidad, alta dureza, resistencia a la tracción baja y alta resistencia a la compresión (Lopes, 1999).

Los cerámicos están formados por una combinación de fases cristalinas y/o vítreas. Se pueden presentar en función de la aplicación como sólido denso, polvo fino, película, fibra, etc. Los hay constituidos por una fase cristalina o una fase vítrea, denominándose monofásicos. Los constituidos por muchos cristales

de la misma fase cristalina se denominan policristalinos. Los monocristales se refieren a materiales constituidos por un solo cristal de una única fase (Saki y col., 2008; Kingery, 1963).

Las propiedades de los materiales cerámicos cubren un amplio intervalo de necesidades: mecánicas, térmicas, ópticas, eléctricas, magnéticas y químicas (Sakiy col., 2008).

Entre ellos se encuentran el carburo de silicio (SiC), el nitruro de silicio (Si₃N₄), la alúmina (Al₂O₃), la hidroxiapatita (Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂) y la wollastonita (CaSiO₃) (Cazander, 2009).

Alúmina

El óxido de aluminio (Al₂O₃) calcinado, llamado alúmina, tiene un papel muy importante en el campo de las cerámicas en base óxidos y los productos refractarios. Debido a sus principales características: alto punto de fusión, alta estabilidad química, alta dureza, baja conductividad eléctrica, buena reactividad con SiO₂, MgO y CaO, la alúmina es utilizada en segmentos donde sus especiales requerimientos no pueden ser alcanzados por otras materias primas convencionales (Arenas y Chamberlain, 1993).

La alúmina es un material cerámico muy versátil, sus propiedades la hacen especialmente apta para aplicaciones en donde la temperatura es un factor crítico, además de su relativa facilidad para adaptarse a diversos trabajos y usos. Su dureza ha permitido darle forma a la industria del abrasivo, que es de las más antiguas, y rentables (Arenas y Chamberlain, 1993).

La alúmina junto con la sílice, es el ingrediente más importante en la constitución de las arcillas y los barnices, impartiendoles resistencia y aumentando su temperatura de maduración. El óxido de aluminio existe en la naturaleza en forma de corindón y de esmeril. Ciertas piedras preciosas, como

el rubí, el zafiro, son formas de alúmina coloreadas por indicios de óxidos de metales pesados; se pueden fabricar piedras artificiales por fusión en la llama oxhídrica. La alúmina se encuentra también en forma de óxidos hidratados que son los componentes de la bauxita y la laterita, conformada principalmente de hidróxidos de aluminio y hierro, sílice y menores proporciones de otros óxidos. Sólo le superan en dureza al diamante y algunas sustancias sintéticas, concretamente el carborundo o carburo de silicio. Tanto el corindón natural impuro (esmeril), como el corindón artificial puro (alundo) se utilizan como abrasivos. A temperatura ordinaria, el óxido de aluminio es insoluble en todos los reactivos químicos comunes (Wangy col., 2007).

Wollastonita

La wollastonita es un mineral metamórfico de color blanco o incoloro, compuesto de silicato de calcio, forma masas fibrosas en los mármoles y se emplea mucho en la fabricación de porcelana (Ibañez y Sandoval, 1993).

El metasilicato cálcico se presenta normalmente con dos modificaciones de baja temperatura (α -CaSiO₃) y una de alta (β -CaSiO₃). La forma de alta temperatura es triclínica (pseudo-ortorrómbica), mientras que las de baja temperatura suelen presentarse como dos modificaciones muy próximas: la forma monoclinica, wollastonita-2M (que en la literatura aparece con el nombre de parawollastonita) y la forma triclínica, wollastonita-Tc. Ambas modificaciones son muy similares y se deben a diferencias en el apilamiento, distinguiéndose la forma triclínica por la ligera inclinación del plano óptico axial o por asimetría en el patrón obtenido por difracción de rayos-X para el monocristal (Ibañez y Sandoval, 1993).

La nomenclatura de α -CaSiO₃ para el polimorfo de alta temperatura y de β -CaSiO₃ para los de baja temperatura, y es acorde con la terminología aceptada para las fases mineralógicas de un compuesto. Sin embargo, los investigadores

en la química del cemento utilizan una terminología justamente contraria, llamando β -CaO·SiO₂ a los polimorfos de baja temperatura y α -CaO·SiO₂ al de alta temperatura (Ibañez y Sandoval, 1993).

Básicamente, la estructura de los polimorfos de baja temperatura se basa en cadenas infinitas de tetraedros (tres tetraedros por celda unidad en la dirección del eje Y) que comparten dos vértices, pudiéndose considerar que la unidad de repetición es el grupo (Si₂O₇) alternando con un tetraedro simple con una cara paralela a la dirección de la cadena (Calatayud y col., 2001).

La wollastonita de alta temperatura, pseudowollastonita, presenta una estructura triclinica, pero con planos de pseudosimetría perpendiculares a los tres ejes cristalográficos, por lo que su estructura se describe como pseudo hexagonal (Ibañez y Sandoval, 1993).

La temperatura de inversión de wollastonita en pseudowollastonita aumenta al incrementarse la velocidad de calentamiento. Así, a velocidades de calentamiento de 8.8°C/min, 3.6°C/min y 1.0°C/min, las temperaturas de inversión serían 1232°C, 1225°C y 1198°C, respectivamente (Ibañez y Sandoval, 1993).

Hidroxiapatita

La hidroxiapatita (HAP) es un biocristal, formado por átomos de calcio, fósforo e hidrógeno, de acuerdo con la fórmula Ca₁₀(PO₄)₆(HO)₂. La HAP está presente en dientes y huesos confiriéndoles su dureza característica, pertenece a la familia de las apatitas, presenta una estructura hexagonal. En la naturaleza las apatitas se pueden encontrar formando parte de las rocas sedimentarias y metamórficas. En los huesos está siempre acompañada de estructuras orgánicas como la colágena. Otras apatitas de importancia biológica son la fluoroapatita y la cloroapatita (Pal y col., 2005).

Los principales componentes químicos de la hidroxiapatita son el calcio y el fosfato. Sin embargo, la HAP natural contiene porcentajes mínimos de sodio, cloro, carbonatos y magnesio, los cuales juegan un papel preponderante en la función remodeladora del hueso. Por esta razón, no se le considera una apatita pura. Las hidroxiapatitas sintéticas, que se obtienen a partir de fosfatos dicálcicos y tricálcicos a través de un proceso de síntesis relativamente simple, presentan una pobre resistencia mecánica, además de disolverse, lo cual no es deseable para utilizarla como biomaterial de sustitución ósea. Si la hidroxiapatita biológica se combina con sustancias extraídas del mismo paciente, como el plasma rico en plaquetas, los resultados se optimizan sobre todo en la osteorregeneración (Jaworski y col., 2009).

La HAP es un biomaterial por excelencia. Las investigaciones acerca de la estequiometría y de la asociación con algunos elementos traza en las apatitas biológicas han sido de enorme relevancia para la investigación de biomateriales que se han utilizado en odontología y ortopedia (Jaworski y col., 2009).

La HAP es un cristal biocompatible que ha incursionado en la biomedicina como restaurador, se utiliza en ortopedia, odontología y en oftalmología. En ortopedia ha dado excelentes resultados la hidroxiapatita bovina, porcina y humana. Se han probado también precursores como los fosfatos y carbonatos de calcio sobre todo en la práctica odontológica. Los resultados no dan una forma óptima en el comportamiento de la reparación de los tejidos a pesar de ser compatibles, sin embargo, es necesaria la investigación pura para dilucidar cuáles son los mejores mecanismos de obtención y combinación con otros elementos. Además de conocer la forma de respuesta de los tejidos en una secuencia ordenada, es necesario obtener, con base en la ingeniería tisular, avances en la regeneración tisular guiada para que estos biomateriales con diseños adecuados sean útiles (Jaworski y col., 2009).

Bradshaw (2008), demostró que la hidroxiapatita tiene un potencial considerable en el estudio de los efectos de una variedad de factores en el desarrollo de biopelículas, así como en la comparación de la eficacia de los sistemas antimicrobianos contra las biopelículas.

Biomateriales

El término *biomaterial* acompaña a todos aquellos materiales utilizados para aplicaciones médicas principalmente, aunque también se encuentran bajo esta clasificación otros materiales de uso extracorporal.

Hoy en día existen diferentes concepciones de lo que realmente es un biomaterial, por una parte, tenemos que un biomaterial es “un material ideado para interactuar con los sistemas biológicos para evaluar, tratar, aumentar o substituir cualquier tejido, órgano o función del cuerpo” según la *Second Consensus Conference on definitions in Biomaterials* en 1991. Por otro lado, hay quienes definen a los biomateriales como “aquellos materiales de origen natural o sintético que se utilizan para dirigir, suplementar o reemplazar alguna función de un tejido vivo” o como “una sustancia sistemáticamente y farmacológicamente inerte diseñada para implantación dentro de un sistema vivo o su incorporación a éste” (Hench, 1998).

Entre las sustancias más importantes utilizadas como biomateriales para la regeneración ósea, se encuentran algunos metales y aleaciones, cerámicas, vidrios biológicos, polímeros naturales y sintéticos, los cuales se aplican entre otras, en las especialidades médicas (Hench, 1998).

Los cerámicos han sido utilizados en diferentes aplicaciones como las prótesis articulares en forma de piezas de cerámica densas. Es el caso de la alúmina y la zirconia, las cuales son inertes y muy resistentes al desgaste inclusive más que los metales. Otras aplicaciones de los cerámicos incluyen los

cementos óseos para el relleno de pequeños defectos, los materiales reabsorbibles para la estimulación de la regeneración ósea y los recubrimientos de implantes metálicos entre otras (Studart y col., 2006).

Los cerámicos basados en fosfatos de calcio, especialmente sales de calcio, son particularmente interesantes en el campo de los substitutos óseos. El comportamiento *in vivo* de los implantes constituidos por fosfatos de calcio depende de una variedad de factores, entre ellos están la relación Ca/P, la estructura cristalográfica y la porosidad (Studart y col., 2006).

Para *Mycobacterium tuberculosis* está descrito que, a través del uso de materiales cerámicos (Anopore[®]) fue posible generar un sistema rápido de drogasusceptibilidad a la rifampicina e isoniazida en aislados clínicos con un resultado exacto de sensibilidad a los antibióticos antes mencionados en tres días (Ingham y col., 2008). De ahí la importancia del objetivo del presente trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de Materiales Cerámicos

Para la selección de los materiales cerámicos se realizó una búsqueda en la bibliografía para conocer los sitios de infección, así como los requerimientos necesarios para el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*. Se encontró que esta bacteria afecta principalmente a los pulmones, así como huesos y otros sitios del cuerpo. Se sabe que esta bacteria es aerobia estricta, por lo tanto, necesita oxígeno para poder crecer adecuadamente. Se investigó a aquellos materiales que presentaran la mayor cantidad de oxígeno en su molécula. Otro criterio para seleccionar los materiales fue el hecho de que *M. tuberculosis* puede alojarse en el hueso, siendo el principal componente de los huesos la hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Otro punto a investigar, con la hidroxiapatita, es el hecho de observar si el calcio y fósforo presente en la molécula afecta el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* (García y col., 2003).

La alúmina (Al_2O_3) se seleccionó debido al hecho de que en estudios anteriores se observó que la micobacteria puede crecer sobre soportes de este material (Ingham y col., 2008), además del hecho de que en su composición tiene una proporción de oxígeno mayor a otros materiales cerámicos. Otro aspecto por el que se eligió la alúmina fue para observar si el aluminio tiene una influencia en el crecimiento de la micobacteria.

Para el caso de wollastonita (CaSiO_3), su selección se realizó en base a la presencia de oxígeno en su composición. También por el hecho de poder determinar si el calcio o el silicio presente en la molécula de wollastonita, tienen un efecto sobre el crecimiento de la micobacteria (Ibañez y col., 1993).

Preparación de los Soportes Cerámicos

Se pesó 0.041g de cada material cerámico seleccionado en una balanza Mettler Toledo modelo ML54/03 type Newclassic ML, una vez pesado el material se realizó un prensado uniaxial, lo cual le dio la forma de una pastilla. Para el prensado se utilizó una prensa manual Pellet Press, utilizando dados de acero inoxidable.

Análisis Térmico

Una vez obtenidos los soportes en forma de pastillas, se realizó un análisis térmico diferencial para conocer el comportamiento térmico del soporte, y obtener la temperatura a la cual adquiere una resistencia, así como una disminución de la porosidad. A este punto se le denomina temperatura de sinterización, la cual es el tratamiento térmico de un polvo o compactado metálico o cerámico a una temperatura inferior a la de fusión de la mezcla, para incrementar la fuerza y la resistencia de la pieza creando enlaces fuertes entre las partículas. Con esto se garantiza que el soporte resista el ambiente de trabajo al cual se va a someter; cabe mencionar que cada material cerámico tiene una temperatura de sinterización diferente. Este análisis se llevó a cabo mediante el equipo Thermal Advantage [TGA-DTA-2960 SDT (1) 1], utilizando un soporte de alúmina para colocar la muestra, un flujo de aire constante de 23 cm³/min y un aumento constante de temperatura de 10°C/min en una rampa de 0 a 1200°C. Una vez conocida la temperatura de sinterización de los diferentes soportes, se calentaron en una mufla Furnace 48 000 Thermolyne por una hora para asegurar su sinterización. Posteriormente, se dejaron enfriar dentro de la mufla por debajo de los 100°C, y se procedió a esterilizar en una autoclave por 15 minutos a 121°C.

Ensayo de Azul Alamar en Microplaca (MABA)

Con el fin de conocer el crecimiento de *M. tuberculosis* en presencia del soporte, se realizó primero un ensayo de susceptibilidad a rifampicina. Para esto se adicionaron 200 μL de agua destilada estéril a todo el perímetro de una placa de 96 pozos, con el propósito de minimizar la evaporación del medio en los pozos de pruebas durante la incubación. Se adicionaron 100 μL de medio Middlebrook 7H9 (MDB) suplementado con OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa) a los pocillos de las filas B a G en las columnas 3 a 11. Posteriormente se adicionaron 100 μL de rifampicina con una concentración inicial de 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ al pocillo número 2, se homogeneizó, y se realizaron diluciones seriadas 1:2. Del último pozo se descartaron 100 μL para que todos los pozos tuvieran el mismo volumen. Con el fin de comparar el efecto del soporte, se realizó un ensayo en una fila la cual contenía el medio de cultivo y las diferentes concentraciones de rifampicina (sin soporte). En la siguiente fila se realizó el mismo procedimiento pero se adicionó el cerámico.

Una vez realizadas las diferentes concentraciones de rifampicina y de agregar el soporte a los pozos indicados, se adicionaron 100 μL del inóculo 1:25 de *M. tuberculosis* a los pocillos a estudiar, empezando del pocillo número 2 hasta el último pozo. Como controles se utilizaron pozos que contenían Middlebrook 7H9 suplementado con OADC, otro pozo con Middlebrook 7H9 suplementado con OADC y rifampicina, Middlebrook 7H9 suplementado con OADC con soporte, Middlebrook 7H9 suplementado con OADC con rifampicina y soporte, Middlebrook 7H9 suplementado con OADC con el inóculo de TB 1:25.

Para la preparación del inóculo se utilizó *M. tuberculosis* cultivada en medio Löwenstein-Jensen. Se pasaron colonias de 12 días de crecimiento a un vial que contenía 5 perlas de vidrio con 8 mL de solución salina estéril isotónica. Este vial se llevó a agitación constante a una velocidad número 1 por 10

minutos en un Vortex Genie II, dejándose reposar por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se transfirió el sobrenadante a una celda de turbidímetro para ajustarla al número 1 de McFarland, del cual se realizó una dilución 1:25 en Middlebrook 7H9 suplementado al 10% de OADC-glicerol.

Una vez que se agregó el inóculo 1:25 de *Mycobacterium tuberculosis* a los pocillos correspondientes, la placa de 96 pozos se selló con parafilm y se dejó incubar por 5 días a 37°C. Transcurrido este tiempo se agregaron 50 µL del reactivo recién preparado de azul de alamar a los pocillos controles (Middlebrook 7H9 suplementado con OADC, Middlebrook 7H9 suplementado con OADC y rifampicina, Middlebrook 7H9 suplementado con OADC con soporte, Middlebrook 7H9 suplementado con OADC con rifampicina y soporte, Middlebrook 7H9 suplementado con OADC con el inóculo de TB 1:25), se reincubó la placa 24 horas a 37°C. Si el pocillo de TB 1:25 viró a un color rosa y el de medio de cultivo permaneció azul después de la incubación, se le agregó reactivo de azul alamar a los pocillos a evaluar. La placa se selló nuevamente con parafilm y se reincubó por 48 horas a 37°C. Se realizó la lectura de manera visual de los pocillos a las 24 y 48 horas. Aquellos pozos que presentaron un color azul se consideraron sin crecimiento, mientras que un color rosa o violeta se consideraba como crecimiento. El reactivo de azul de alamar es un indicador colorimétrico de viabilidad celular, el cual por la actividad metabólica de una célula viable se reduce cambiando de un color azul a un color rosa.

Caracterización Química

Espectroscopia Fotoelectrónica de Rayos X (XPS)

Los espectros de fotoelectrones fueron registrados con un espectrómetro de fotoelectrones PHI 5700 con radiación monocromática de Ka de magnesio (300 W, 15 kV, 1253.6 eV). Los espectros de alta resolución fueron registrados con un ángulo de 45° usando un analizador hemisférico que trabaja en el modo

constante de energía de 29.35 eV, usando un área del análisis de 720 mm de diámetro. La escala de energía del espectrómetro se calibró usando las líneas fotoelectrónicas de Cu 2p_{3/2}, Ag 3d_{5/2} y de Au 4f_{7/2} a 932.7, 368.3 y 84.0 eV respectivamente. Como referencia se tomó la energía de enlace del pico C 1s a 284.8, puesto que el carbono se presenta en todas las muestras como impureza. Las muestras se montaron en un portamuestras sin tapa y guardadas en la cámara de preparación, al alto vacío, durante la noche antes de que fueran trasladados a la cámara de análisis del espectrómetro. Cada región fue explorada usando varios barridos hasta obtener una señal con una buena relación señal/ruido. Los espectros de referencia en el rango de 0 a 1200 eV fueron registrados con una energía de 187.85 eV. La presión de la cámara de análisis fue mantenida por debajo de $5 \cdot 10^{-6}$ Pa (Predoi y col., 2007).

La técnica de ESCA mide la energía cinética de los electrones que son emitidos por un material como consecuencia de haber sido bombardeado por una radiación ionizante o por partículas de alta energía.

Difracción de Rayos X

Para este estudio se requirió mínimo 1 gramo de la muestra, si la muestra se encontraba en forma sólida, se procedía a pulverizar en un mortero. Si la muestra era polvo se colocaba directamente en el portamuestra del equipo para ser analizada.

Cuando el haz de rayos X incide sobre una muestra, provoca que los átomos que conforman a éste dispersen a la onda incidente tal que cada uno de ellos produce un fenómeno de interferencia que para determinadas direcciones de incidencia será destructivo y para otras constructivo surgiendo así el fenómeno de difracción. La información que proporciona el patrón de difracción de rayos X, se puede ver como dos aspectos diferentes pero complementarios: por un lado, la geometría de las direcciones de difracción (condicionadas por el tamaño

y forma de la celdilla elemental del cristal) ofrecen información sobre el sistema cristalino. Y por otro lado la intensidad de los rayos difractados, están íntimamente relacionados con la naturaleza de los átomos y las posiciones que ocupan en la red, tal que su medida constituye la información tridimensional necesaria para conocer la estructura interna de la muestra analizada (Pal y col., 2005).

Microscopía Electrónica de Barrido

Para el análisis de las muestras por este método (Predoi y col., 2007), los soportes se introdujeron en formaldehído al 10% durante 1 hora, con el fin de inhibir el crecimiento de la bacteria, así como fijarla. Pasado este tiempo se dejaron secar, y los soportes se colocaron sobre una cinta de carbono, posteriormente se realizó un recubrimiento con grafito, y se llevó al microscopio electrónico de barrido para su análisis.

Espectroscopia Infrarroja

La muestra sólida se mezcla con bromuro de potasio (KBr) puro y seco en un mortero de ágata hasta obtener un polvo fino (Predoi y col., 2007).

Se sugiere comenzar en valores intermedios como una relación en peso 1:100 muestra/KBr.

Una pequeña porción del polvo obtenido, se colocó en un portador de muestra para preparar pastillas empleando para ello una prensa. La pastilla, que debe ser homogénea y finísima, se colocó en una placa para muestras. Es importante evitar la contaminación de la muestra y seguir las indicaciones sobre el uso de la prensa para hacer la pastilla.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se eligieron 3 materiales cerámicos para evaluarlos en el ensayo en microplaca de susceptibilidad de *M. tuberculosis* a la rifampicina utilizando como indicador el azul alamar. Dichos cerámicos fueron alúmina (Al_2O_3), wollastonita (CaSiO_3) e hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$); cabe mencionar que en lo referente a la hidroxiapatita se trabajó con dos formulaciones; una que refería un 96% de pureza y la otra hidroxiapatita que refería un 34-40% de calcio, con el propósito de observar si existía una diferencia entre ellos. Los criterios de los materiales antes mencionados fueron los requerimientos de crecimiento, así como en los sitios anatómicos de infección de la bacteria.

Se sabe que el sitio de infección principal de *M. tuberculosis* es el pulmón y que el principal componente presente es el oxígeno. Con esto en mente se buscaron materiales que presentaran una mayor cantidad de oxígeno, como es el caso de la hidroxiapatita, sin embargo también se basó en el hecho de que la micobacteria puede infectar a los huesos y el principal constituyente del hueso es la hidroxiapatita. Otro parámetro a analizar es el hecho de que presenta calcio y fósforo en su molécula, por lo cual se evaluó si estos elementos influyeron sobre el crecimiento de la micobacteria. Otro punto a considerar fue el hecho de que en los materiales cerámicos existe la tendencia natural al desarrollo de biopelículas en etapas post-implante, las cuales son responsables de las infecciones y el rechazo de las piezas implantadas (Ortega y col., 2008), siendo la biopelícula un ecosistema microbiano organizado, conformado por microorganismos pertenecientes a diferentes géneros y especies, asociados a una superficie viva o inerte, con características funcionales y estructurales complejas. En las biopelículas los microorganismos se adhieren a las superficies gracias a la secreción de un exopolímero que forma una matriz adhesiva protectora (Allison, 2000; Dune, 2002). Algunos investigadores señalan que *M. tuberculosis* es capaz de formar biopelículas con requerimientos

específicos genéticos y ambientales, distintos a aquellos requeridos por los cultivos planctónicos, los cuales contienen una matriz extracelular rica en ácidos micólicos libres, y albergan una importante población tolerante a las drogas que persisten a pesar de estar expuestas a altos niveles de antibióticos (Ojha y col., 2008).

Existen publicaciones, en las cuales mencionan que *M. tuberculosis* puede adherirse a una superficie de alúmina, además de formar una biopelícula (Ingham y col., 2008). Al presentar aluminio en su molécula se puede evaluar si este elemento puede verse involucrado en el favorecimiento del crecimiento micobacteriano.

Una vez seleccionados los materiales, se procedió a pesar 0.042 gramos de cada uno, posteriormente se formó un soporte con la ayuda de una prensa manual por prensado uniaxial y utilizando dados de acero inoxidable. Los materiales de alúmina, wollastonita e hidroxiapatita presentaron un color blanco y midieron 3 mm de altura y de diámetro, presentaron una consistencia rígida.

Para cada soporte se realizó un análisis térmico diferencial utilizándose las siguientes condiciones: flujo de aire constante de 23 cm³/min, un soporte de alúmina, una rampa de aumento de temperatura de 10°C/min, empezando a temperatura ambiente y llegando hasta los 1200°C.

En la figura 1 se puede observar el comportamiento térmico de la alúmina, en ella es posible ver una línea de color negra que representa el análisis térmico diferencial y una línea negra delgada referente a un análisis termogravimétrico. Estos análisis muestran el comportamiento y la pérdida de peso del material, cuando se va aumentando la temperatura. Referente al análisis térmico de la alúmina se puede observar dos eventos endotérmicos: uno entre 160-170°C (línea roja) y en este mismo evento endotérmico se ve la pérdida de peso por parte del material indicando una pérdida en el material (línea negra), esta pérdida de peso del material corresponde a la pérdida de material orgánico

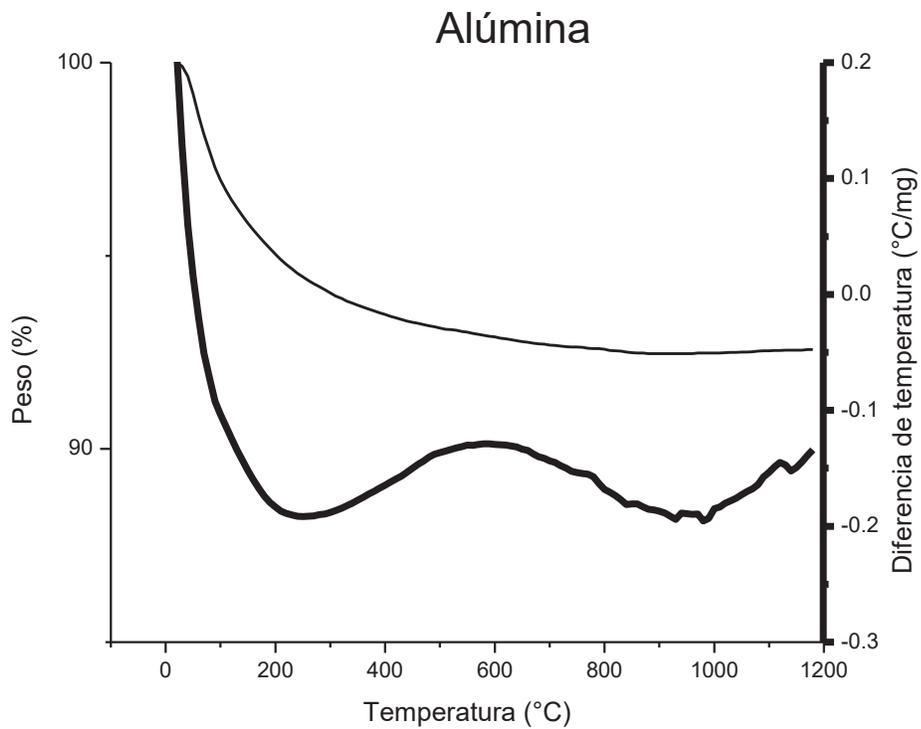


Figura 1. Análisis térmico de la alúmina. La línea negra representa el comportamiento térmico del material con respecto a la temperatura y la línea negra delgada representa la pérdida de peso al aumentar la temperatura.

presente en el material, así como agua absorbida del soporte. El otro evento es aproximadamente a los 700°C y no hay pérdida de peso en el material cuando ocurre este evento. Cuando existe un evento endotérmico sin pérdida de peso significa que el material solo está cambiando su conformación. Este comportamiento de la alúmina se debe al cambio de alúmina a γ -alúmina, sin embargo este cambio no afecta la consistencia del soporte. En las condiciones utilizadas para este proyecto no se encontró la temperatura de sinterización para la alúmina. En un reporte de Arenas (1993), menciona que la temperatura de sinterización de la alúmina empezaba a darse a partir de los 1400°C, siendo alrededor de los 1500°C su temperatura de sinterización ideal.

En las condiciones utilizadas en este proyecto, no se obtuvo la temperatura de sinterización debido a que solamente se llegó a los 1200°C, por el hecho de que los equipos no fueron capaces de calentar muestras por encima de los 1200°C. Además se requiere encontrar nuevos materiales que aceleren el crecimiento de *M. tuberculosis* que sean económicos y fáciles de generar.

Para analizar la temperatura de sinterización de wollastonita se realizó en las mismas condiciones utilizadas para la alúmina. En la figura 2 se observa el comportamiento térmico de la wollastonita; en ésta es posible observar una línea de negra que representa el análisis térmico diferencial y una línea negra delgada muestra un análisis termogravimétrico. En la figura 2 se observan 3 eventos endotérmicos: el primero aparece entre los 160-170°C y con una pérdida de peso mínima (alrededor de 3%), correspondiente a la pérdida de todo aquel material orgánico y la deshidratación del soporte, el otro evento aparece a los 600°C con una pérdida del 28% en peso correspondiente a impurezas del soporte y, el último evento que aparece a los 800°C y sin una pérdida de peso del material, corresponde a un cambio en la estructura de la wollastonita, pasando de wollastonita a β -wollastonita, sin embargo este cambio no afecta en la resistencia ni en la densificación del soporte. En un artículo

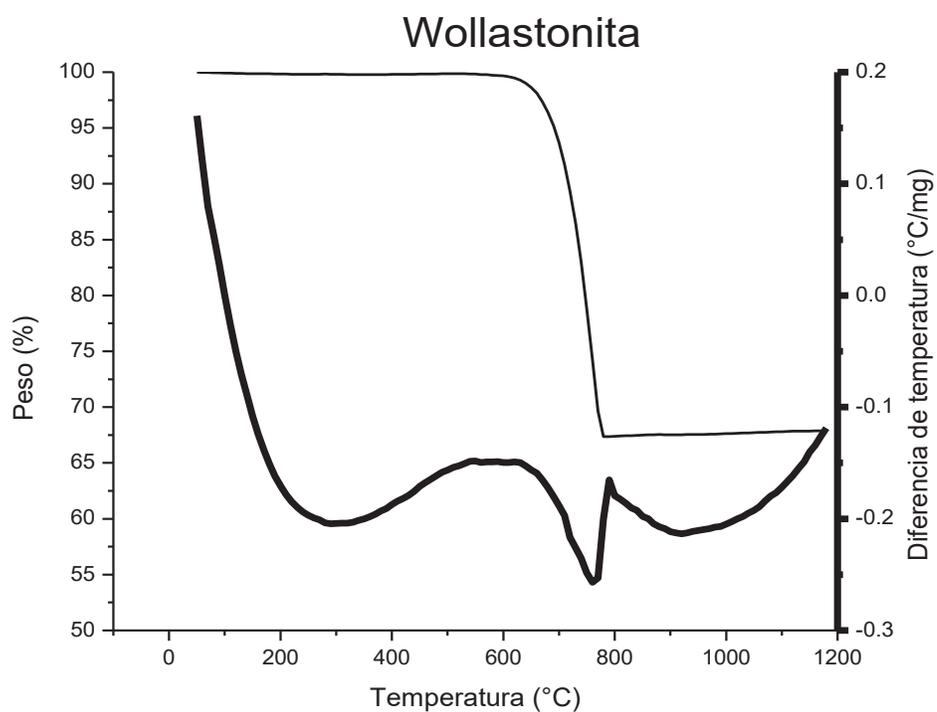


Figura 2. Análisis térmico de la wollastonita. La línea negra representa el comportamiento térmico del material con respecto a la temperatura y la línea negra delgada representa la pérdida de peso al aumentar la temperatura.

publicado por Boccaccini en el 2006, se reportó que la temperatura de sinterización para wollastonita comienza a los 1500°C, siendo los 1800°C la temperatura de sinterización para este tipo de materiales. Al igual que ocurrió con la alúmina, en este caso no se llegó a la temperatura de sinterización de la wollastonita debido a que solo se llevó hasta los 1200°C, por la misma limitante planteada para el soporte de la alúmina.

El último material utilizado consistió de dos muestras diferentes de hidroxiapatita, uno referenciado con una concentración de calcio de 34 a 40%, y otro con un 96% de pureza. Ambos materiales se sometieron a un análisis térmico (en las mismas condiciones utilizadas para los materiales antes mencionados) para conocer si existían diferencias para este análisis.

En la figura 3 se observa el comportamiento térmico de la hidroxiapatita referida con un 34-40% de calcio, una línea de color negra representa el análisis térmico diferencial y una línea negra delgada el análisis termogravimétrico. En la hidroxiapatita analizada se pueden observar tres eventos endotérmicos: el primero entre los 160-170°C con una pérdida de peso, el cual corresponde a la pérdida de material orgánico y a la deshidratación del soporte; el segundo evento endotérmico se presenta a los 700°C existiendo una pérdida de peso en el material, este evento corresponde a la pérdida de agua ligada por parte del material, el otro evento endotérmico comienza a partir de los 900°C y continúa hasta los 1200°C, en este evento no existe una pérdida de peso por parte del material. Este evento térmico nos indica que el material está sufriendo cambios en cuanto a su estado, pasando de sólido a líquido. Una vez que el material se encuentra en estado líquido, se empieza a disminuir los espacios intermoleculares, haciendo al material más resistente y menos poroso.

En la figura 4 se observa el comportamiento térmico de la hidroxiapatita referida con un 96% de pureza, una línea de color negra representa el análisis térmico diferencial y una línea negra indica un análisis termogravimétrico. Los

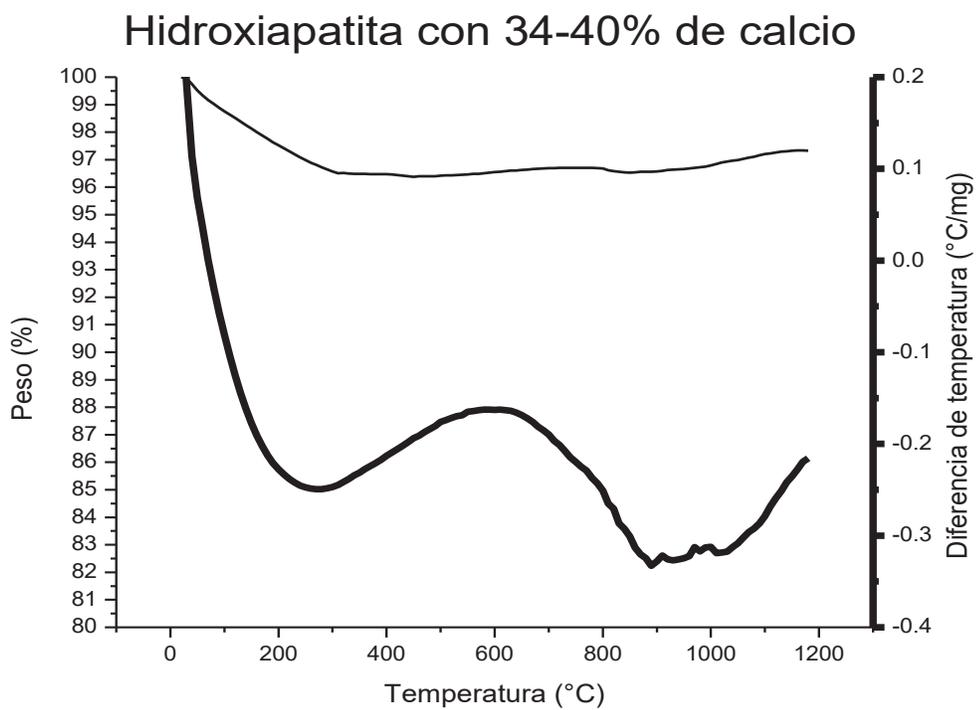


Figura 3. Análisis térmico de hidroxiapatita referida con 34 a 40% de calcio. La línea negra representa el comportamiento térmico del material con respecto a la temperatura y la línea negra delgada representa la pérdida de peso al aumentar la temperatura.

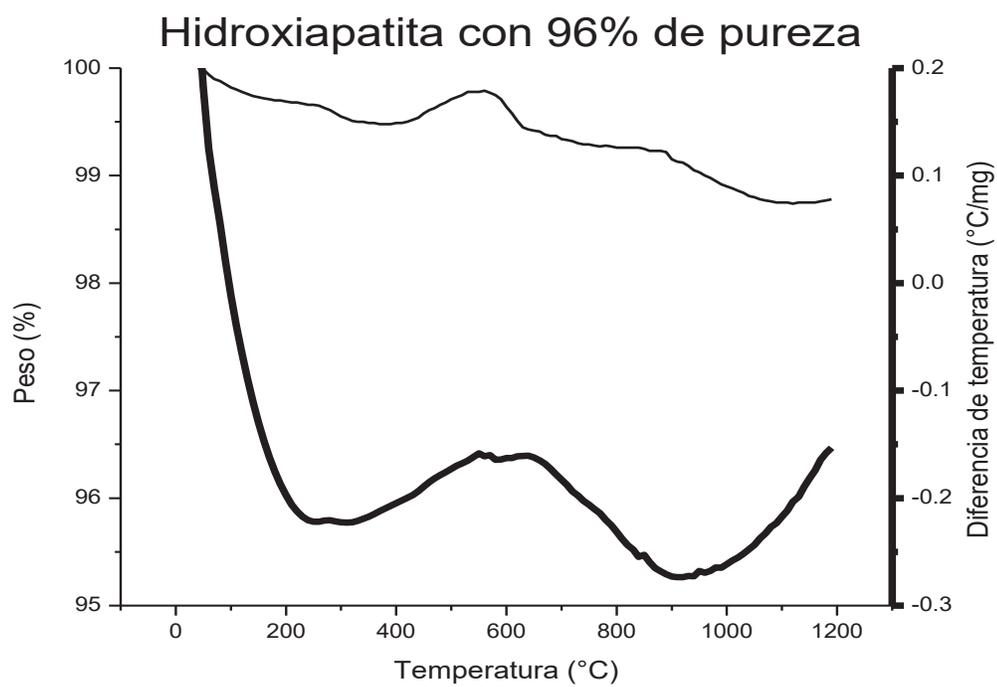


Figura 4. Análisis térmico de hidroxiapatita referida con el 96% de pureza. La línea negra representa el comportamiento térmico del material con respecto a la temperatura y la línea negra delgada representa la pérdida de peso al aumentar la temperatura.

mismos eventos endotérmicos ocurrieron para la hidroxiapatita referida con un 96% de pureza.

En las dos hidroxiapatitas analizadas ocurrieron los mismos eventos endotérmicos, sin embargo al llegar al momento de la temperatura de sinterización en la hidroxiapatita con el 34-40% de calcio, se ven marcados los eventos endotérmicos y exotérmico, lo cual indica una mejor densificación y una disminución mayor de la porosidad en comparación con la hidroxiapatita referida con el 96% de pureza.

En cuanto a las temperaturas de sinterización de ambas hidroxiapatitas, no se encontraron cambios en su valor, ambas hidroxiapatitas presentaron una temperatura de sinterización a partir de los 900°C. Un estudio realizado por Adolfsson en el 2000, reportó que la hidroxiapatita presentó una temperatura de sinterización que empieza a los 900°C, siendo la temperatura óptima para su sinterización a los 1200°C, por arriba de esta temperatura la hidroxiapatita perdía todas sus moléculas de oxidrilo convirtiéndose en apatita.

Dado que la hidroxiapatita presentó temperaturas de sinterización y gravimétricos óptimos, se decidió continuar el trabajo con este material cerámico. Estas dos hidroxiapatitas se probaron a diferentes temperaturas sinterizadas: a los 900, 1000, 1100 y 1200°C. Se calentaron los soportes de hidroxiapatitas por una hora a diferentes temperaturas (900, 1000, 1100 y 1200°C), posterior a este calentamiento se dejaron enfriar por 12 horas dentro de la mufla, después se esterilizaron para ser utilizadas en el ensayo de azul alamar en microplaca (MABA). Los soportes, después de su sinterización, redujeron su volumen, sin embargo le confirieron una gran resistencia la cual hace que el soporte pueda resistir el ambiente de trabajo.

Para el ensayo de azul de alamar en microplaca (MABA) se utilizó rifampicina como control, se realizó una fila con medio, inóculo y diferentes concentraciones de rifampicina con y sin pastilla. El motivo de poner diferentes

filas, una sin soporte y otra con soporte, fue para evaluar la influencia que tienen los soportes en el crecimiento de la micobacteria. Se realizó el análisis de los soportes de hidroxiapatita a diferentes temperaturas de sinterización, observándose que el soporte sinterizado por una hora a 1200°C fue el que presentó mejores resultados (figura 5). La concentración mínima inhibitoria (MIC) de la rifampicina sin la presencia de hidroxiapatita fue de 0.1171 µg/mL, al igual que la hidroxiapatita referida con el 96% de pureza, mientras que la hidroxiapatita sinterizada a 900, 1000 ó 1100°C presentó la misma MIC que rifampicina sola, indicando que estos soportes no tienen ninguna influencia sobre el crecimiento de la micobacteria. La hidroxiapatita con 34-40% de calcio presentó una MIC de 0.2342 µg/mL lo cual indica una influencia en el crecimiento de la micobacteria en el método utilizado (tabla I).

En el ensayo de azul de alamar en microplaca se utiliza el reactivo de azul de alamar recién preparado, este reactivo tiene la peculiaridad de ser de color azul (resazurin) cuando se encuentra oxidado, sin embargo cuando el reactivo está en presencia de una actividad metabólica celular éste es reducido a resorufin, que presenta un color rosa.

El color azul indica una actividad metabólica nula (no hay crecimiento bacteriano) y un color rosa indica la presencia de actividad metabólica (crecimiento bacteriano), es decir, la bacteria está viable. Según Franzblau, en un artículo publicado en 1998, menciona que si hay la aparición de color violeta y se hace una resiembra, indudablemente este pozo virará a un color rosa, por lo tanto todo color violeta se interpreta como crecimiento de la bacteria. La hidroxiapatita con 34-40% de calcio sinterizada a 1200°C por una hora, se observó que el color violeta (crecimiento bacteriano) se recorrió un pozo hacia la izquierda, pasando del pozo número 9 al pozo número 8, lo cual indica que se requirió una mayor concentración de rifampicina para inhibir el crecimiento de la micobacteria.

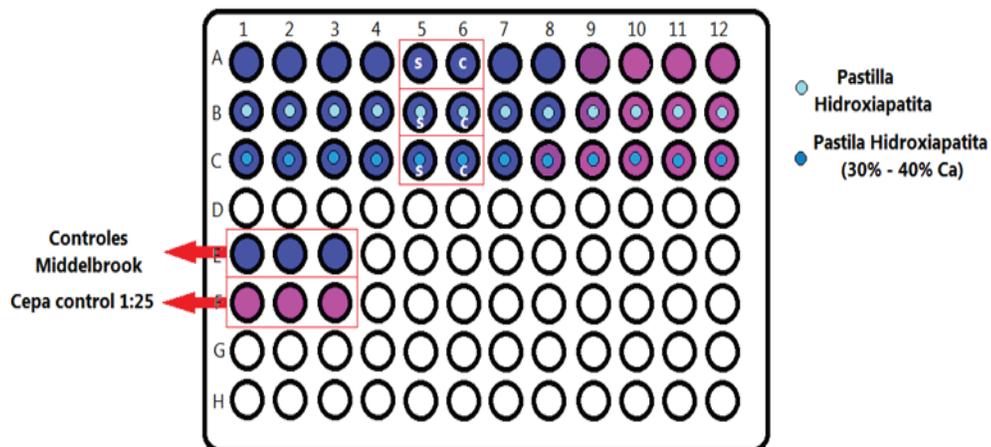


Figura 5. Representación de la placa de trabajo. Línea A: Rifampicina con medio e inóculo de micobacteria; línea B: hidroxiapatita con 96% de pureza; línea C: hidroxiapatita con 34-40% de calcio; E1, E2 y E3: control de medio; F1, F2, y F3: control de cepa, (concentración de rifampicina A1= 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$, diluciones seriadas 1:2).

Tabla I. Concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) de los soportes utilizados en el ensayo de susceptibilidad a rifampicina.

| | Concentración mínima inhibitoria (MIC) $\mu\text{g/mL}$ |
|--|---|
| Rifampicina | 0.1171 |
| Rifampicina con hidroxiapatita (96% de pureza) | 0.1171 |
| Rifampicina con hidroxiapatita (34-40% calcio) | 0.2342 |

En el ensayo de viabilidad, con azul de alamar, se obtuvo una MIC de 0.2342 $\mu\text{g/mL}$ en presencia del soporte de hidroxiapatita con el 34-40% de calcio sinterizada a 1200°C, a diferencia de la rifampicina sin soporte y estando presente el soporte de hidroxiapatita con el 96% de pureza sinterizada a 1200°C, en las cuales se obtuvo una MIC de 0.1171 $\mu\text{g/mL}$, indicando que cuando está presente el soporte de hidroxiapatita de 34-40% de calcio sinterizada a 1200°C, se requiere del doble de rifampicina para inhibir el crecimiento bacteriano, lo que nos indica que el soporte utilizado para este ensayo está favoreciendo el crecimiento de la micobacteria.

Para caracterizar los soportes que aceleraron el crecimiento de la bacteria se realizó una espectroscopia infrarroja. En la figura 6 se puede observar el espectro de infrarrojo para la hidroxiapatita sin sinterizar (en verde), en el cual se observaron los picos para este material correspondientes a: **OH⁻** : 3573 cm^{-1} , 631 cm^{-1} y 342 cm^{-1} ; **PO₄⁻³** :1090 cm^{-1} , 962 cm^{-1} , 601 cm^{-1} , 472 cm^{-1} , 2200 cm^{-1} y 1950 cm^{-1} . **CO₃⁻²** :1410 cm^{-1} y 1450 cm^{-1} .

La figura 7 representa la espectroscopia infrarroja para el soporte de hidroxiapatita sinterizada a 1200°C por una hora, en el cual se observa los mismos picos observados en la hidroxiapatita en verde, pero con la diferencia en el pico del grupo oxidrilo que se encuentra más definido y se observa una reducción a los 3000 cm^{-1} correspondiente a la pérdida de agua cuando se sinteriza el material, lo cual es congruente con lo observado en el análisis térmico. Otro aspecto es que en el grupo fosfato (2000 cm^{-1}) es que se aumenta la intensidad del pico cuando el material es sinterizado debido a la formación de fosfatos, en cuanto al grupo carbonato y los demás picos de los fosfatos no presentó cambio alguno. Estos resultados son similares a los resultados obtenidos por Hui en el 2010, Rehman y Bonfield en 1997 y otros autores, pero con la diferencia que en los resultados aquí presentados el pico a los 2000 cm^{-1}

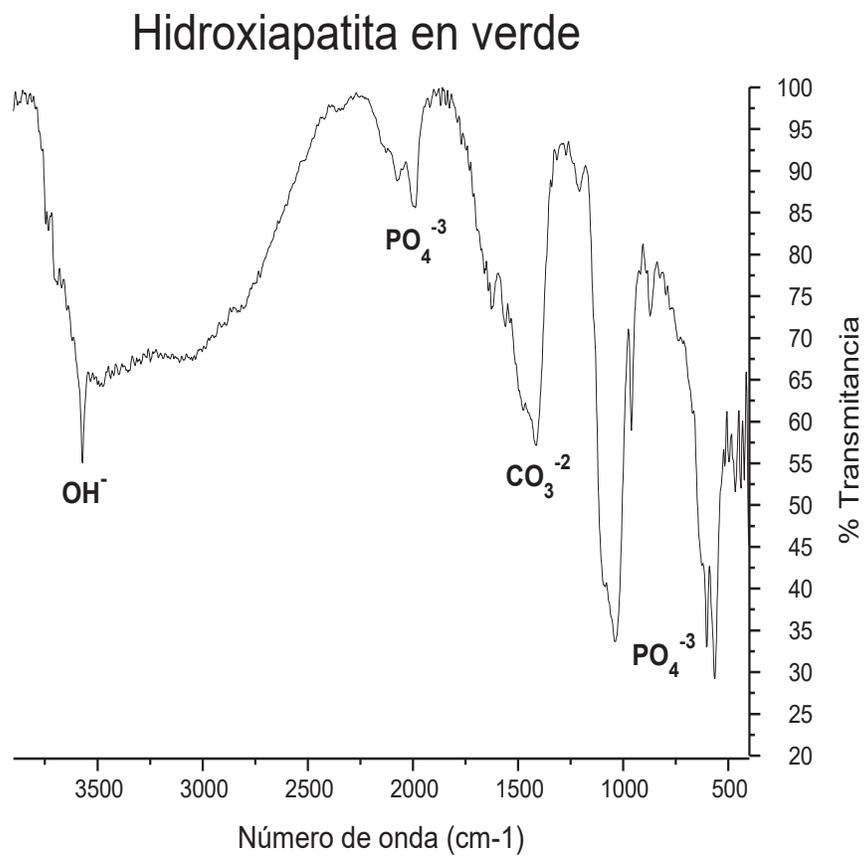


Figura 6. Espectroscopia infrarroja de la hidroxiapatita con 34-40% de calcio sin sinterizar (en verde). La figura muestra las bandas características de la hidroxiapatita.

Hidroxiapatita sinterizada a 1200°C por 1 hr

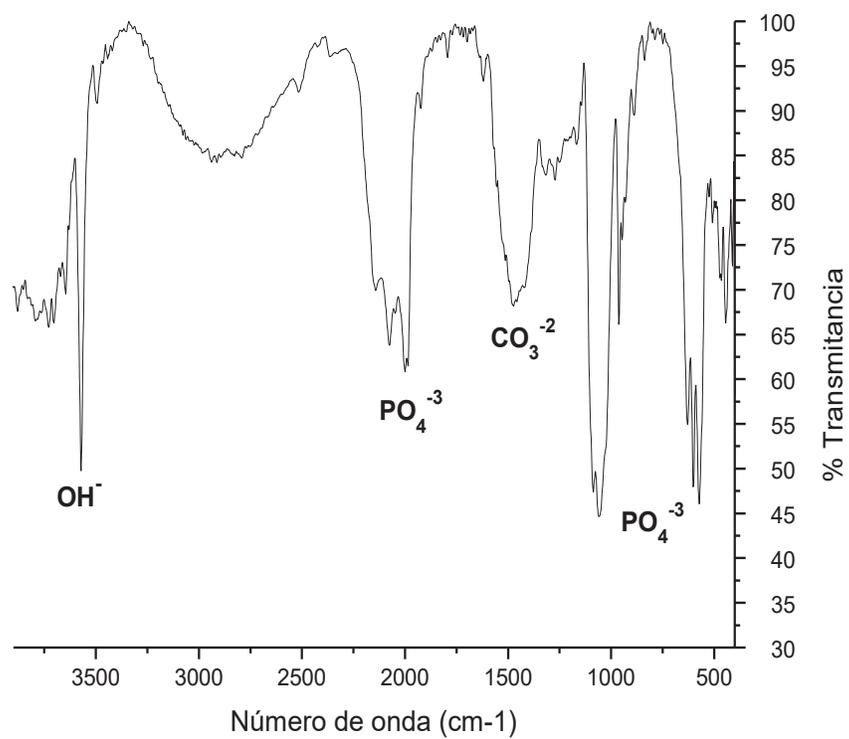


Figura 7. Espectroscopia infrarroja de la hidroxiapatita con 34-40% de calcio sinterizada a 1200°C por 1 hora. Bandas características de la hidroxiapatita correspondientes al número de onda.

se define mucho más; con respecto a los demás picos no hay diferencia con los reportados en la literatura.

Se realizó una difracción de rayos X para conocer las fases presentes en las muestras tanto con hidroxiapatita sin sinterizar como sinterizada a 1200°C por una hora, por el hecho de que la hidroxiapatita se descompone a apatita perdiendo todos sus grupos hidroxilos. La figura 8 representa la difracción de rayos X para la hidroxiapatita sin sinterizar, en la cual se observa solamente la fase de la hidroxiapatita.

En la figura 9 se puede observar la difracción de rayos X para el soporte de hidroxiapatita con 34-40% de calcio, en la cual se observa la fase de hidroxiapatita, pero aparece otra fase la cual corresponde al óxido de calcio. Con estos resultados se reconoce que con el proceso de sinterización, al que se sometieron los soportes, el calcio sufre una oxidación lo cual le confiere una ganancia de oxígeno.

Se procedió a realizar una espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS) a las pastillas sin sinterizar (en verde) de hidroxiapatita con 96% de pureza como también a la hidroxiapatita con 34-40% de calcio, para observar si existe alguna diferencia en cuanto a la composición de ambos soportes analizados. Al analizar ambos soportes sin sinterizar, se observó que las dos hidroxiapatitas contienen la misma composición: fósforo (P2p) con la presencia de un pico a los 133.8 eV, carbono (C1s) con un pico a los 285 eV, calcio (Ca2p3) con un pico observado a los 347eV y oxígeno (O1s) con un pico en 531eV (figura 6). Estos mismos valores de eV (energía de enlace) han sido reportados por Nagakane y col. (2006), Xia y col. (2010), así como también por otros autores.

Hidroxiapatita 34-40% de calcio en verde

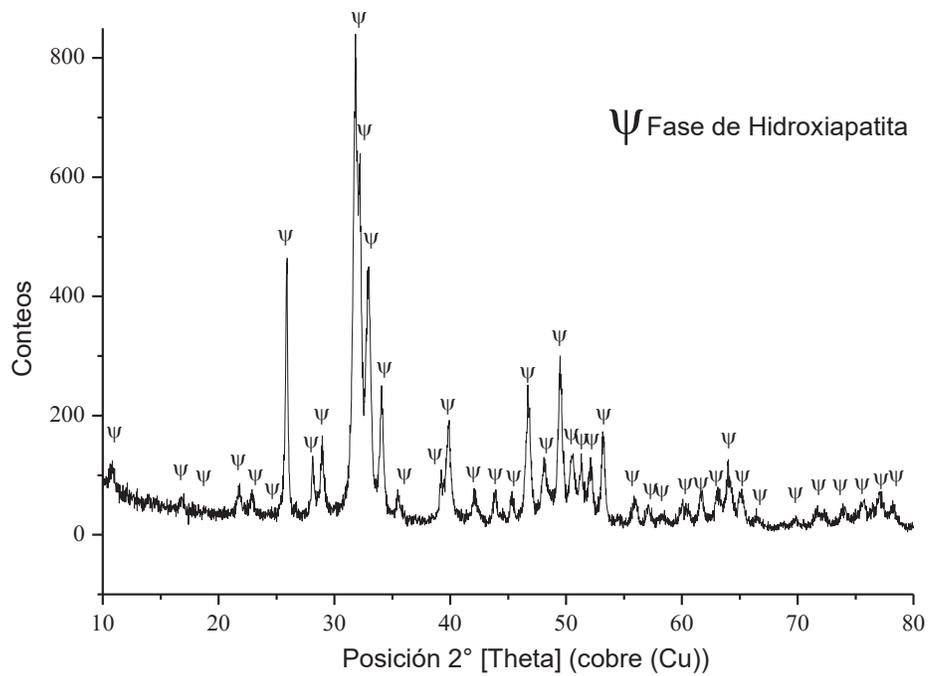


Figura 8. Difracción de rayos X del soporte de hidroxiapatita con 34-40% de calcio sin sinterizar. La figura muestra las intensidades de los picos presentes en la muestra, así como las fases presentes.

Hidroxiapatita 34-40% de Calcio sinterizada a 1200°C por una hora

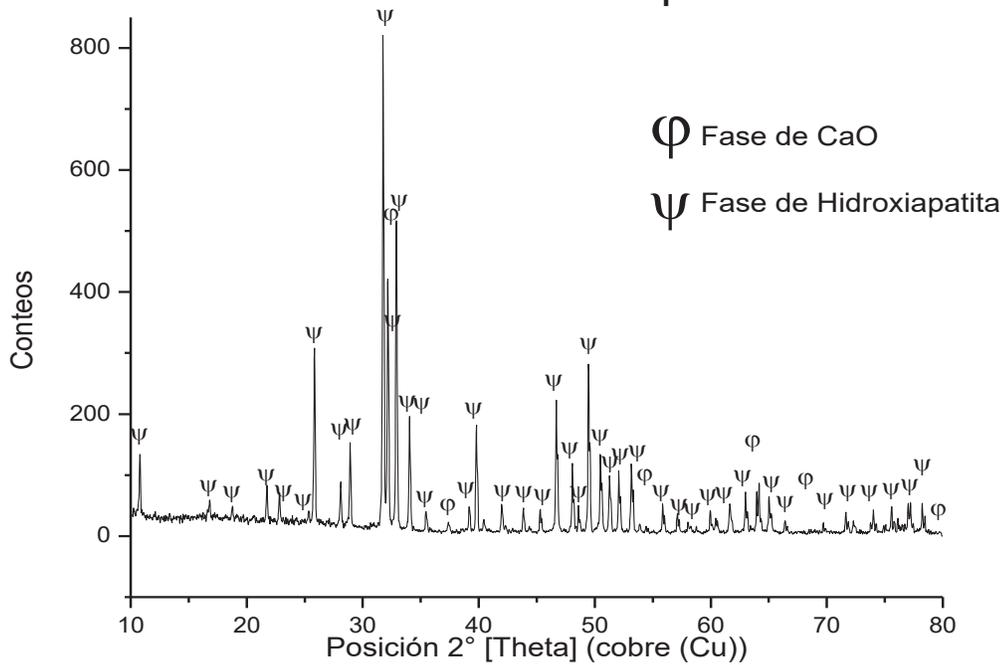


Figura 9. Difracción de rayos X del soporte de hidroxiapatita con 34-40% de calcio sinterizada a 1200°C por 1 hora. La figura muestra las intensidades de los picos presentes en la muestra, así como las fases presentes.

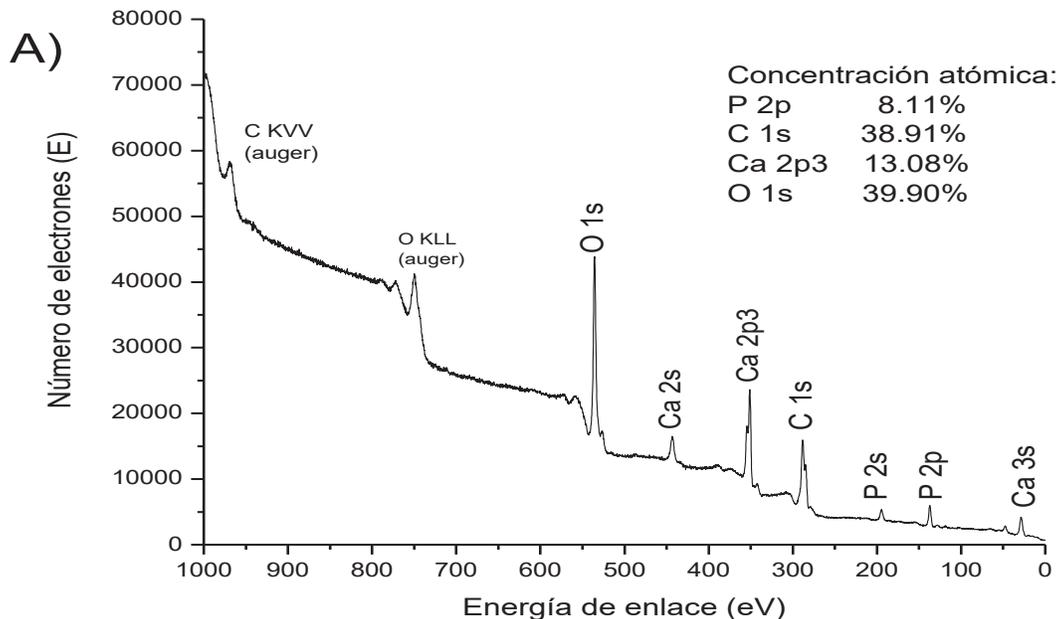
En la figura 10 pueden observarse las diferencias en la concentración atómica de las dos hidroxiapatitas analizadas. La hidroxiapatita con 34-40% de calcio tuvo concentraciones atómicas de fósforo mayor, con un 10.26% contra un 8.11% de la hidroxiapatita con 96% pureza. En cuanto a la concentración atómica de carbono, la hidroxiapatita con 96% de pureza tuvo una concentración de 38.91% contra una concentración de 28.31% en la hidroxiapatita con 34-40% de calcio. En lo referente a la concentración de calcio y oxígeno, la hidroxiapatita con 34-40% presentó una concentración de calcio del 15.20% y de oxígeno de 46.23%, mientras que la hidroxiapatita de 96% de pureza fue de 13.08% para calcio y de 39.90% para oxígeno.

Claramente se observaron diferencias en las concentraciones de calcio, oxígeno y fósforo de la hidroxiapatita de 34-40% de calcio, que correspondió a la hidroxiapatita que favoreció el crecimiento de la micobacteria; posiblemente estos elementos son los que estuvieron involucrados en el crecimiento de la micobacteria.

Una vez observadas estas diferencias entre las hidroxiapatitas sin sinterizar, se procedió a analizar los soportes sinterizados a 1200°C con el fin de observar si este proceso afectaba la composición del soporte. En la figura 11 se observa que la cantidad de fósforo disminuyó un 0.32%, el calcio aumentó 0.2%, el oxígeno aumentó 1.74% y la concentración de carbono disminuyó 1.62%, cuando se sinterizó la hidroxiapatita de 34-40% de calcio a 1200°C por una hora. La disminución en la concentración de carbono se debe al proceso de descarbonatación que ocurre en el proceso de sinterización. En lo referente al aumento de la concentración de oxígeno en el soporte de hidroxiapatita, fue debido a la oxidación del calcio al momento de sinterizarlo.

Una vez que se observó que la hidroxiapatita con 34-40% de calcio favoreció el crecimiento de la micobacteria, se decidió analizar un soporte que estuvo en contacto con el medio y el reactivo de azul de alamar, con el fin de descartar

Hidroxiapatita con 96% de pureza en verde



Hidroxiapatita con 34-40% de calcio en verde

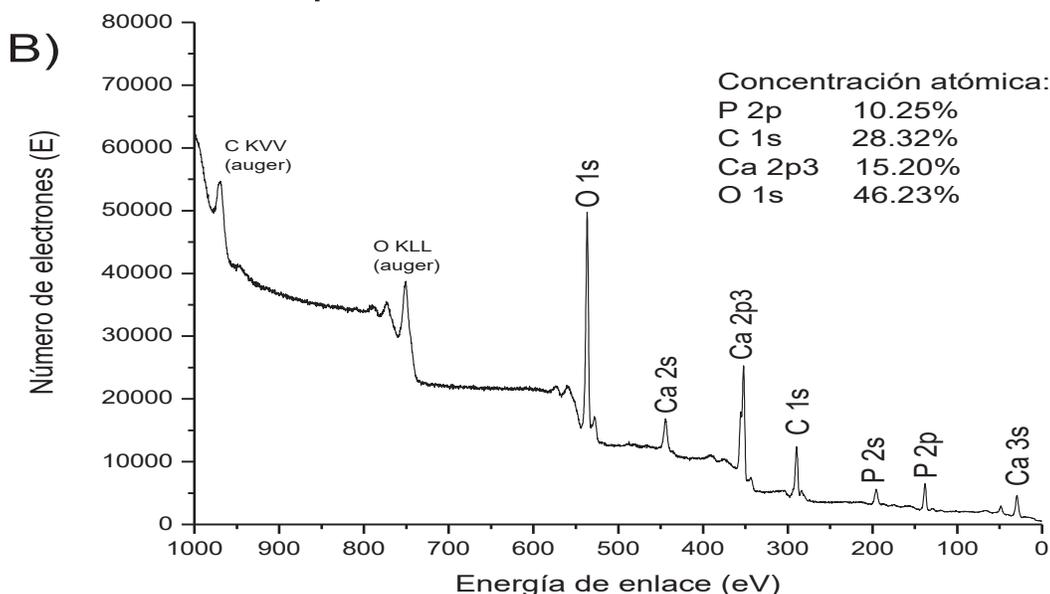


Figura 10. Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X de hidroxiapatita. A): hidroxiapatita con 96% de pureza (en verde); B): hidroxiapatita con 34-40% de calcio (en verde). Elementos presentes en la muestra analizada midiendo el número de electrones respecto a la energía de enlace.

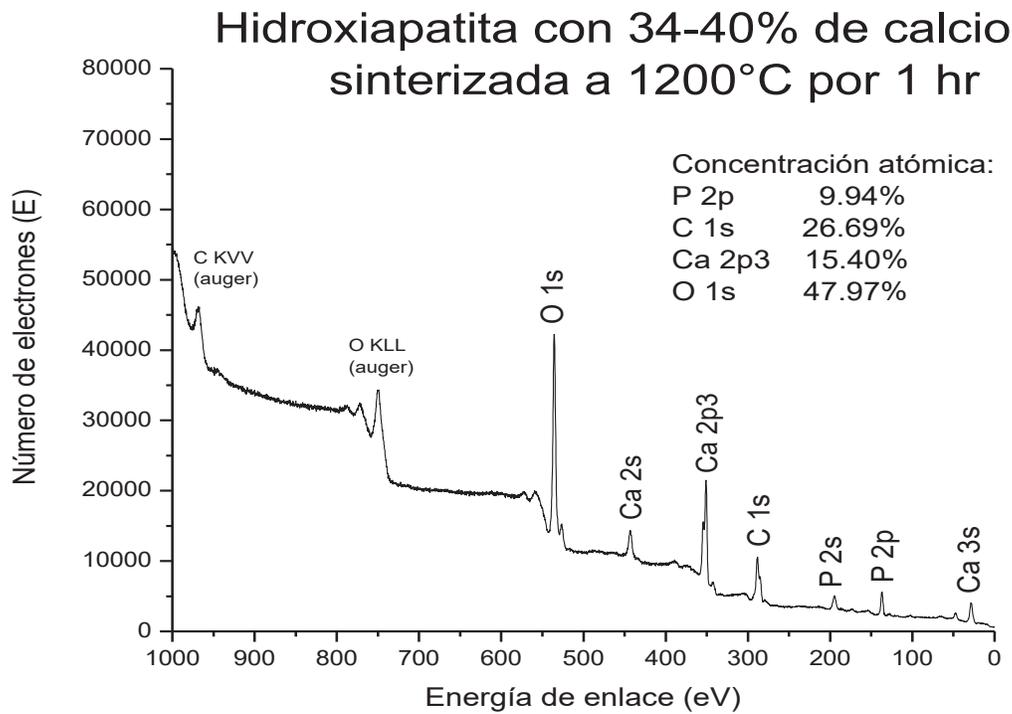


Figura 11. XPS de hidroxiapatita con 34 - 40% de calcio sinterizada. Elementos presentes en la muestra analizada midiendo el número de electrones respecto a la energía de enlace.

que el contenido de los soportes no se veía afectado por el ambiente de trabajo. Como se puede observar en la figura 12 no hubo cambio en la concentración atómica del soporte, además no hubo contaminantes en el soporte, ya que no se observaron nuevos picos en el espectrograma del XPS.

Debido a que no hubo cambios en la estructura del soporte en presencia de medio ni de reactivo, es posible deducir que el favorecimiento en el crecimiento de la micobacteria se debió a la presencia de hidroxiapatita.

Una vez que se observó que el soporte de hidroxiapatita no se veía afectado por el ambiente de trabajo, se analizaron aquellos soportes donde existió crecimiento, así como soportes sin crecimiento bacteriano. En la tabla II se muestra un resumen de las concentraciones atómicas de diferentes soportes analizados, se observa que para el pozo número 7 (MABA = azul, concentración de rifampicina 0.2343 $\mu\text{g/mL}$), en la cual hubo una disminución de calcio y oxígeno (1.39% y 4.55%, respectivamente); y un aumento de carbono y de fósforo (0.1% y 5.84%, respectivamente) respecto a la pastilla sinterizada. Aun cuando el resultado del MABA muestra un color azul (no crecimiento bacteriano) se observó una disminución en la cantidad de oxígeno y calcio. Dicha disminución se debió a que la bacteria los consumió antes de que el antibiótico ejerciera su acción. En los siguientes pozos analizados se vieron fluctuaciones en cuanto a la cantidad de fósforo, calcio y carbono. Para el caso del oxígeno, se observó una disminución constante conforme disminuyó la concentración de rifampicina. Conforme la concentración de rifampicina fue disminuyendo, la cantidad de bacteria va aumentando, esto debido a que la concentración de rifampicina no fue capaz de matar a la bacteria presente. Por otro lado, como la cantidad de bacteria va aumentando, ésta necesita más oxígeno y es por ello que la concentración del mismo va disminuyendo.

La última caracterización de los soportes de hidroxiapatita con 34-40% de calcio fue con microscopia electrónica de barrido (MEB) en la cual se observó la

Hidroxiapatita con 34-40% de calcio
sinterizada a 1200°C por 1 hr, contacto
con Middlebrook y Azul de Alamar

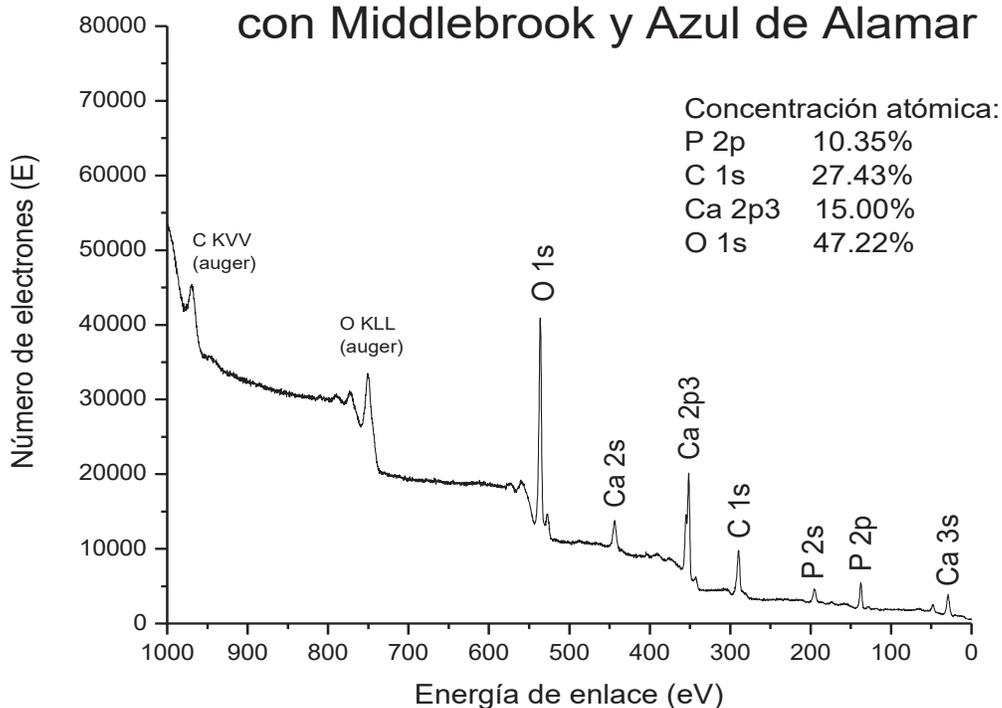


Figura 12. XPS de hidroxiapatita con el 34 - 40% calcio después de la sinterización y en contacto con medio y reactivo de azul de alamar. Elementos presentes en la muestra analizada midiendo el número de electrones respecto a la energía de enlace.

Tabla II. Concentraciones atómicas de soportes de hidroxiapatita con 34-40% de calcio de diferentes pozos.

| | Concentración atómica | | | |
|---|------------------------------|--------|--------|--------|
| | P 2p | C 1s | Ca 2p3 | O1s |
| Hidroxiapatita (36 – 40% Ca) sinterizada | 9.94% | 26.69% | 15.40% | 47.97% |
| Soporte de hidroxiapatita (pozo 7, MABA = azul y rif. 0.2343 µg/mL) | 10.04% | 32.53% | 10.85% | 46.58% |
| Soporte de hidroxiapatita (pozo 8, MABA = violeta/azul y rif. 0.1171 µg/mL) | 10.66% | 34.49% | 9.69% | 45.16% |
| Soporte de hidroxiapatita (pozo 9, MABA = violeta y rif. 0.0585 µg/mL) | 10.83% | 33.97% | 10.89% | 44.31% |
| Soporte de hidroxiapatita (pozo 10, MABA = rosa y rif. 0.0292 µg/mL) | 11.28% | 33.31% | 11.59% | 43.82% |
| Soporte de hidroxiapatita (pozo 11, MABA = rosa y rif. 0.0146 µg/mL) | 8.56% | 40.62% | 9.04% | 41.78% |
| Soporte de hidroxiapatita (pozo 12, MABA = rosa y rif. 0.0073 µg/mL) | 9.54% | 39.14% | 10.04% | 41.28% |

Rif = Rifampicina

superficie de los soportes, además del crecimiento bacteriano sobre el soporte. Se realizó MEB a soportes que no estuvieron en contacto con la bacteria, así como soportes con crecimiento bacteriano con y sin antibiótico. En la figura 13 se observan fotografías de soportes que no estuvieron en contacto con la bacteria en la cual solo se observa la superficie del soporte sinterizado a diferentes magnificaciones; en las mayores magnificaciones se logra observar la hidroxiapatita en forma de gránulos. En la figura 14 se observan islas de crecimiento bacteriano sobre el soporte de hidroxiapatita, las cuales se pueden observar de un color gris sobre la superficie del soporte (como si fueran unas nubes grises), en la figura 15 se observan varias fotografías con magnificaciones a 10,000X. En la figura 16 se muestra un comparativo en donde hubo crecimiento: a) soporte en contacto con el medio de cultivo y el azul de alamar (no tiene inóculo bacteriano, control negativo); b) pozo 8 donde comenzó el crecimiento bacteriano (MABA: azul/violeta), concentración de rifampicina de 0.1171 $\mu\text{g/mL}$; c) pozo 9 (MABA: violeta), concentración de rifampicina de 0.0585 $\mu\text{g/mL}$; d) pozo 10, concentración de rifampicina de 0.0292 $\mu\text{g/mL}$ y crecimiento bacteriano mayor (MABA: rosa); e) y f) tiene concentración menor de rifampicina (0.0146 $\mu\text{g/mL}$) y en donde el crecimiento bacteriano fue mayor (MABA: rosa); g) control positivo, a este soporte se agregó bacteria pero no rifampicina(control positivo).

En la figura 16 vemos el aumento de tamaño y un aumento en el número de islas bacterianas cuando la concentración de rifampicina disminuyó a 0.0146 $\mu\text{g/mL}$. La interpretación realizada con el MABA se confirmó por la microscopia electrónica de barrido (MEB). Cuando la interpretación del MABA era azul, en el MEB no se observaba crecimiento sobre la superficie de la hidroxiapatita; cuando la interpretación del MABA era violeta o rosa, en el MEB se observaba la aparición de islas bacterianas sobre el soporte de hidroxiapatita.

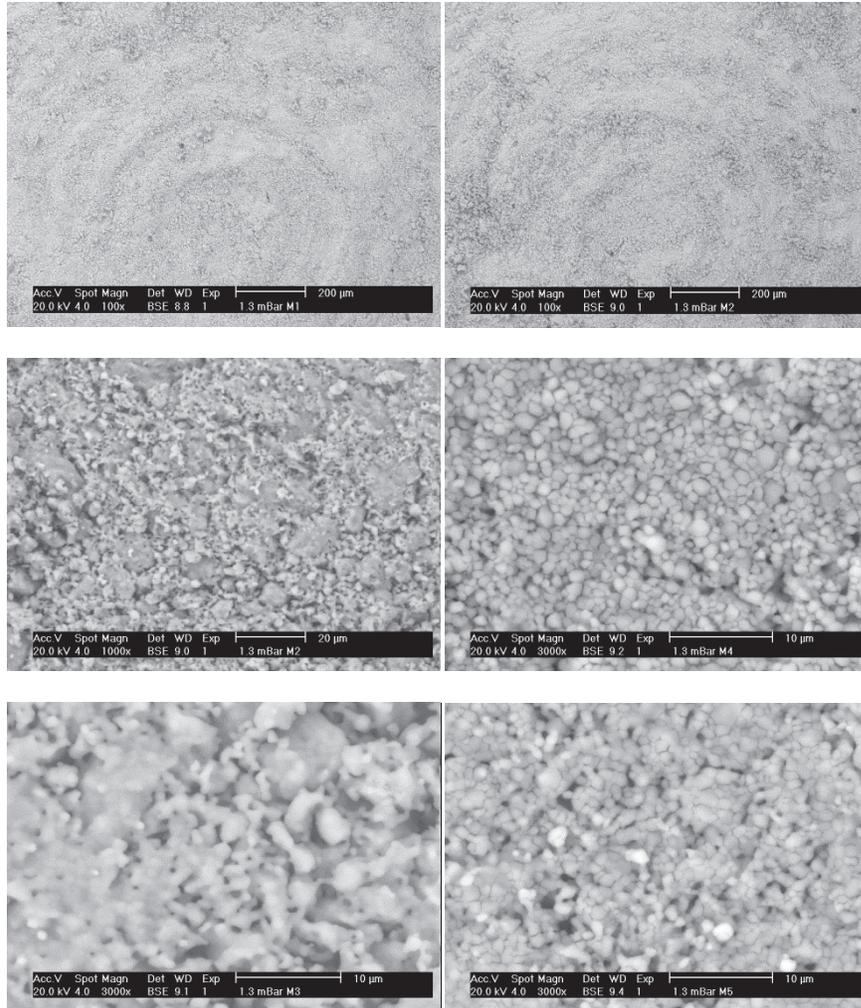


Figura 13. Fotografías de soportes de hidroxiapatitas con 34-40% de calcio sin crecimiento bacteriano. Fotos de soportes, a diferentes magnificaciones, que no estuvieron en contacto con la bacteria.

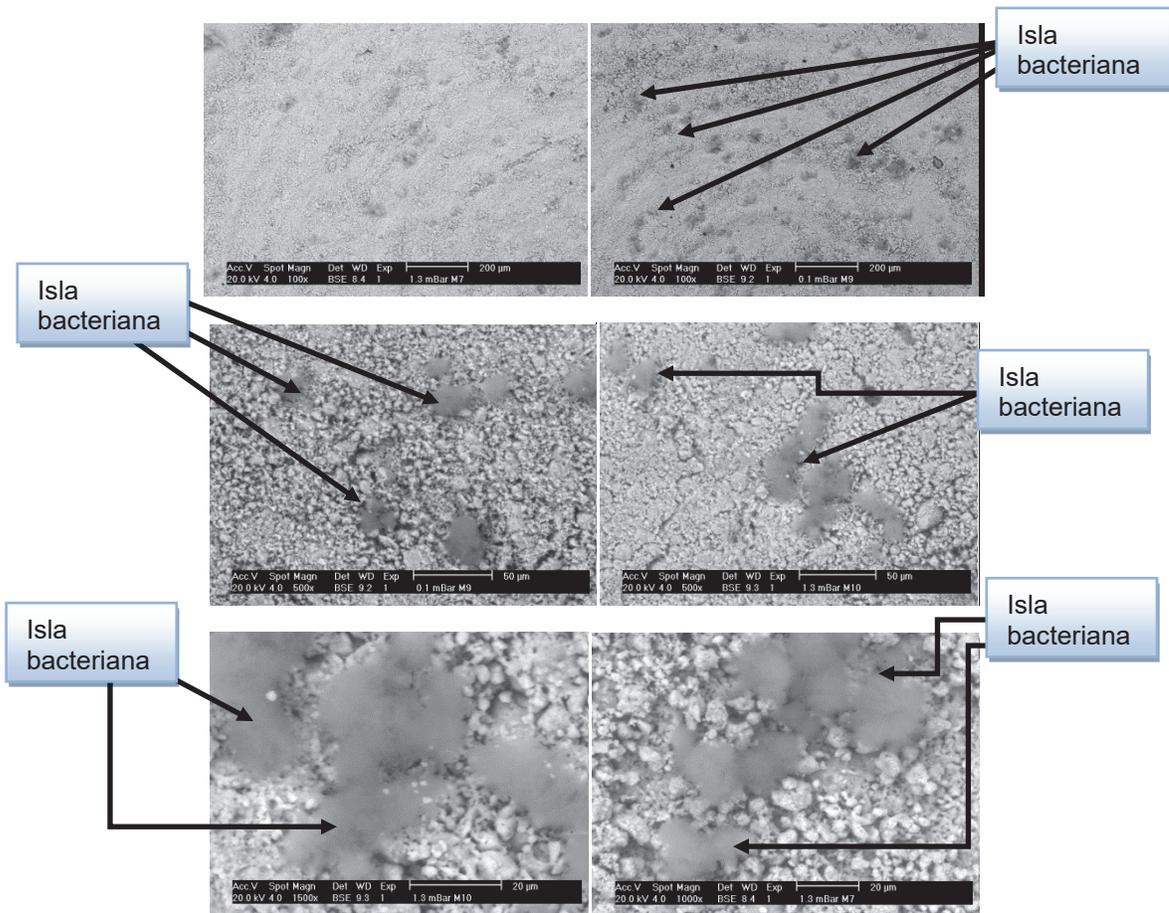


Figura 14. Fotografías de soportes de hidroxiapatitas con 34-40% de calcio, con islas de *Mycobacterium tuberculosis*. Fotos de soportes de islas bacterianas (gris) tomadas a diferentes magnificaciones.

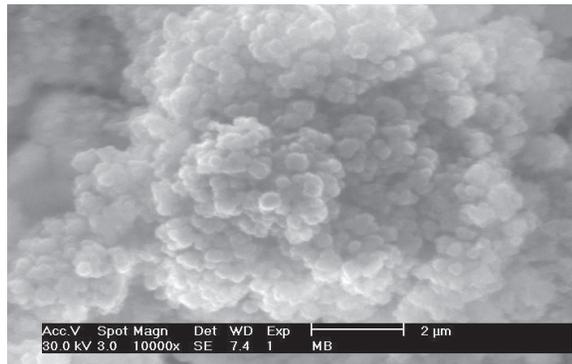
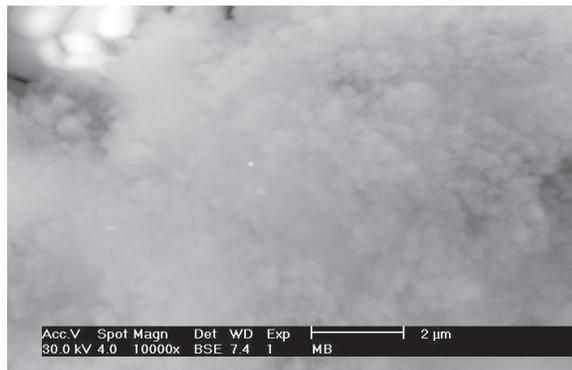
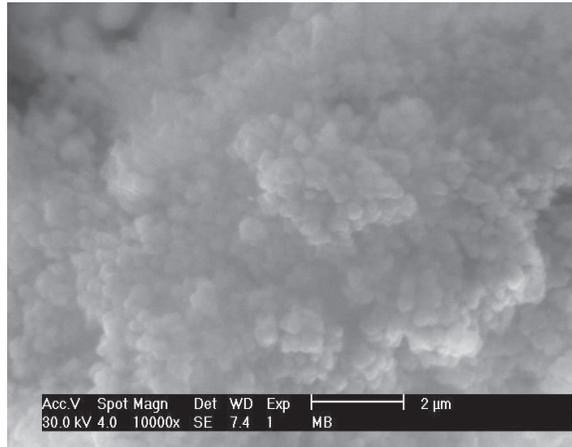


Figura 15. Fotografías de soportes de hidroxapatitas con 34-40% de calcio a 10,000X de magnificación. Magnificaciones a 10,000X de las islas bacterianas observadas en la figura 14.

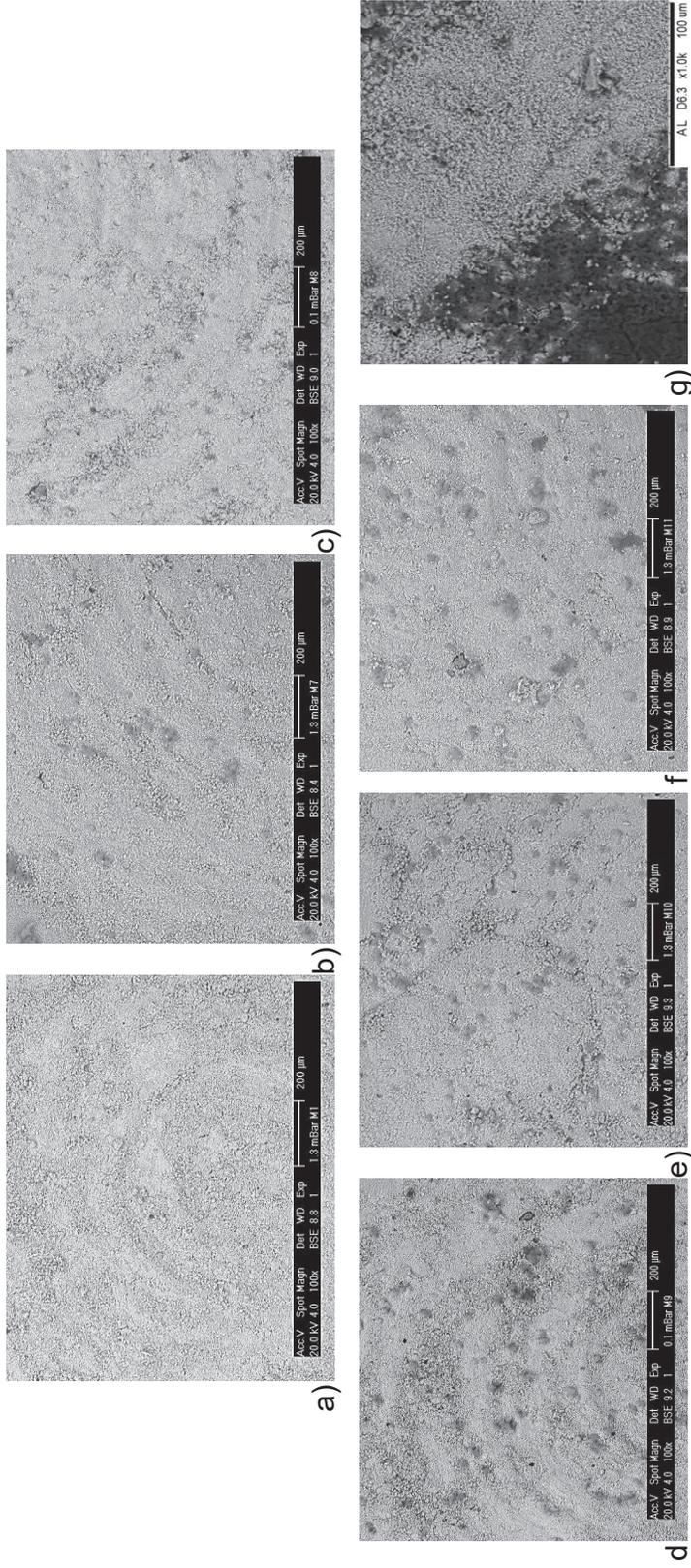


Figura 16. Comparación de los soportes de hidroxiapatita con 34-40% de calcio. A) control negativo, b-f) crecimiento bacteriano a diferentes concentraciones de rifampicina; g) control de crecimiento (no se agregó rifampicina).

CONCLUSIONES

- Los soportes de hidroxiapatita de 96% de pureza y con 34-40% de calcio presentaron una temperatura de sinterización en un intervalo de 900 a 1200°C.
- La presencia de calcio en la hidroxiapatita generó un aumento en el contenido de oxígeno debido a la oxidación que se presentó durante el proceso de sinterización.
- Los soportes de hidroxiapatita con 34-40% de calcio favorecieron el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv.
- El crecimiento de la bacteria se atribuye a la presencia de oxígeno en la hidroxiapatita y se favorece aún más con el óxido de calcio.

BIBLIOGRAFÍA

- Adolfsson, E., Hermansson, L. 2000. Phase stability aspects of various apatite-aluminium oxide composites. *J Mater Sci.* 35:5719-5723.
- Alcaide, F. Santín, M. 2008. Multidrug-resistant tuberculosis. *Enf Infecc Microbiol Clin.* 26:54-60.
- Allison, D. 2000. Community structure and co-operation in biofilms. Presented at fifty-ninth symposium of the Society for General Microbiology. University of Exeter. September 2000.
- Arenas, F., Chamberlain, J. 1993. Sinterización de alúmina gamma y efectos de adiciones de TiO₂ y ZrO₂. *Rev LatinAm Metal Mater.* 12:92-94.
- Bernardelli, A., Morcillo, N., Lourerio, J., Quse, V., Davenport, S. 2004. In vitro susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains isolated from seals to antituberculosis drugs. *Biomédica.* 24:85-91.
- Blythe, M., Zhang, Q., Vaughan, K., Romulo de Castro, J., Salimi, N., Bui, H., Lewinsohn, D., Ernst, J., Peters, B., Sette, A. 2007. An analysis of the epitope knowledge related to Mycobacteria. *Immunome Research.* 3-10.
- Boccaccini, A., Rawlings, R., Wu, J. 2006. Glass-ceramics: their production from wastes- a review. *J Mater Sci.* 41:733-761.
- Borrero, R., Álvarez, N., Reyes, F., Sarmiento, M., Acosta, A. 2011. *Mycobacterium tuberculosis*: factores de virulencia. *VacciMonitor.* 20:34-38.
- Bradshaw, D., Marsh, P., Schilling, K., Cummins, D. 2008. A modified chemostat system to study the ecology of oral biofilms. *J Applied Microbiol.* 80:124-130.
- Calatayud, S., Santamaría, S., Pérez, F. 2001. Influencia de la paragénesis mineral, porosidad y defectos estructurales en al alterabilidad de los ladrillos macizos antiguos. *Geogaceta.* 30:31-34.
- Carter, B., Norton, G. 2007. Ceramic materials: science and engineering. Ch. 3 in Materials. Springer (Ed), p. 635-648. North Carolina, USA.

- Castellanos, M., García, M., Téllez H. 2008. Tuberculosis en México. *SINAVE*. 25:10-22.
- Cazander, G., Kiril, E., Bouwman, L., Bernards, A., Jukema, G. 2009. The influence of maggot excretions on PAO1 biofilm formation on different biomaterials. *Clin Orthop Relat Res*. 467:536-545.
- Coll, P. 2003. Fármacos con actividad contra *Mycobacterium tuberculosis*. *Enf Infecc Microbiol Clin*. 21:299-308.
- Dune, M. 2002. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?. *Rev Clin Microbiol*. 15:155-166.
- Franzblau, S., Witzing, S., McLaughlin, C., Torres, P., Madico, G., Hernández, A., Degnan, M., Cook, M., Quenzer, V., Feguson, R., Guillam, R. 2004. Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate alamar blue assay. *J Clin Microbiol*. 36:362-366.
- García, R., Lado, F., Túnez, V., Pérez, M., Cabarcos, A. 2003. Tratamiento actual de la tuberculosis. *An Med Interna*. 20: 91-100.
- González, P. 2004. Optimización del diagnóstico microbiológico en infecciones por micobacterias. *Rev Chil Enf Respir*. 20:102-105.
- Hench, L. 1998. Biomaterials: a forecast for the future. *Biomaterials*. 19: 1419–1423.
- <http://www.cdc.gov/tb/>. 2010.
- Hui, S., Gurbhinder, R., Agarawal, S. 2010. Synthesis of Hydroxyapatite Bio-Ceramic Powder by Hydrothermal Method. *J Min Mater Charact Engine*. 9:683-692.
- Ibañez, A., Sandoval, F. 1993. La Wollastonita: propiedades, síntesis y aplicaciones cerámicas. *Bol Soc Esp Ceram*. 32:349-361.
- Ingham, C., Ayad, A., Nolsen, K., Mulder, B. 2008. Rapid drug susceptibility testing of micobacteria by culture on a highly porous ceramic support. *Int J Tuberc Lung Dis*. 12:645-650.

- James, D., Bryers, J., Ratner, B. 2006. Biomaterial approaches to combating oral biofilms and dental diseases. *BMC Oral Health*. 6:S15.
- Jaworski, R., Pawlowski, L., Pierlot, C. 2009. Suspension Plasma Sprayed Titanium Oxide and Hydroxyapatite Coatings. Thermal Spray 2009: *Proc Int Ther Spray Conf*. 156-161.
- Kingery, W. 1963. Introduction to Ceramics. John Wiley & Sons. Inc., Second Edition, p. 22-23.
- Lacroix, C., Grattepanche, F., Doleyres, Y., Bergmaier, D. 2005. Immobilised cell technologies for the dairy industry. Ch. 1 In Tissue engineering. Applications of Cell Immobilisation Biotechnology. Springer (Ed). p. 295-319. Dordrecht, the Netherlands.
- Lens, P., Stoodley, P., Mahon, T. 2003. Biofilms in medicine, industry and environmental biotechnology. IWA publishing.
- Lopes, M., Monteiro, F., Santos, J. 1999. Glass-Reinforced Hydroxyapatite Composites: Secondary Phase Proportions and Densification Effects on Biaxial Bending Strength. *J Biomed Mater Res*. 48:734-40.
- Marsollier, L., Aubry, J., Coutanceau, E., Saint André, J., Small, P., Millon, G., Legras, P., Guadagnini, S., Carbonnelle, B., Cole, S. 2005. Colonization of the salivary glands of *Naucoris cimicoides* by *Mycobacterium ulcerans* requires host plasmacytes and a macrolide toxin, mycolactone. *Cell Microbiol*. 7:935-943.
- Misson, M., Razali, F. 2007. Immobilization of phenol degrader *Pseudomonas sp* in repeated batch culture using bioceramic and sponge as support materials. *J Teknol*. 46:51-59.
- Nagakane, K., Yoshida, Y., Hirata, I., Fukuda, R., Nakayama, Y., Shirai, K., Ogawa, T., Suzuki, K., Vanmeerbeek, B., Okazaki, M. 2006. Analysis of Chemical Interaction of 4-MET with Hydroxyapatite Using XPS. *Dient Mater J*. 25(4):645-649.

- Ojha, A., Baughn, A., Sambandan, D., Hsu, T., Trivelli, X., Guerardel, Y., Alahari, A., Kremer, L., Jacobs, W., Hatfull, G. 2008. Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria. *Mol Microbiol.* 69:164-174.
- Ortega, W., Cortés, A., Best, S., Brooks, R., Bretado, L., Rentería, D. 2008. *In vitro* bioactivity of wollastonite-titanio material obtained by sol-gel method or solid state reaction. *J Sol Gel Sci Technol.* 48:362-368.
- Pal, S., Roy, S., Bag, S. 2005. Hydroxyapatite Coating over Alumina - Ultra High Molecular Weight Polyethylene Composite Biomaterials. *Trends Biomater Artif Organs.* 18: 106-109.
- Predoi, D., Ghita, R., Ungureanu, F., Negri, C., Vatasescu-Balcan, R., Costache, M. 2007. Characteristics of thin films. *J Optoelectron Adv M.* 9: 3827-3831.
- Ray, G. 2004. Microbiología médica. 4^a ed. McGraw Hill. México.
- Rehman, I., Bonfield, W. 1997. Characterization of hydroxyapatite and carbonated apatite by photo acoustic FTIR spectroscopy. *J Mater sci – Mater Med.* 8:1-4.
- Saki, M., Kazemzadeh, M., Samadikuchaksaraei, A., Ghafouri, H., Gorjipour, F. 2008. Biocompatibility Study of a Hydroxyapatite-Alumina and Silicon Carbide Composite Scaffold for Bone Tissue Engineering. *Yakhteh Med J.* 11:(1) 55-60.
- Sánchez, K. 2009. Escenario de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa como prueba diagnóstica en tuberculosis. *Gac Méd Caracas.* 117:220-225.
- Sarkar, A., kumar, K., Dutta, N., Chakraborty, P., Dastidar, S. 2003. Evaluation of *in vitro* and *in vivo* antibacterial activity of dobutamine hydrochloride. *Indian J Med Microbiol.* 21:172-178.
- Schluger, N. 2001. Changing Approaches to the Diagnosis of Tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 164:2020-2024.

- Sebhatu, M., Kiflom, B., Seyoum, M. 2007. Determining the burden of tuberculosis in Eritrea: a new approach. *Bulletin WHO*. 85(8):593-599.
- Sepkowitz, K. 1995. Tuberculosis in the AIDS Era. *Clin Microbiol Rev*. 5:180-199.
- Solórzano, R., Varela, C. 2006. Métodos Diagnósticos en Tuberculosis: lo convencional y lo nuevo. *Rev Med Hondur*. 74:93-101.
- Stuart, A., Gonzenbach, U., Tervoort, E., Gauckler, L. 2006. Processing Routes to Macroporous Ceramics: A Review. *J Am Ceram Soc*. 89(6): 1771-1789.
- Van Deun, A., Martin, A., Palomino, J. 2010. Diagnosis of drug-resistant tuberculosis: reliability and rapidity of detection. *Int J Tuberc Lung Dis*. 14:131-140.
- Wang, Y., Chen, X., Hu, Y., Lan, Y. 2007. Influences of phosphates on dispersion of fine alumin-silicate minerals. *J Cent South Univ T*. 2:101-110.
- World Health Organization. Global tuberculosis control. 2011.
- Xia, W., Lindahl, C., Persson, C., Thomsen, P., Lausmaa, J., Engqvist, H. 2010. Changes of Surface Composition and Morphology after Incorporation of Ions into Biomimetic Apatite Coatings. *J Biomater Nanobiotech*. 1:7-16.