



**SÍNTESIS DE HIDROXIAPATITA DOPADA CON PLATA CON POTENCIALES  
APLICACIONES EN LA ELIMINACIÓN DE PATOGENOS EN AGUAS:  
MÉTODOS VÍA MOLIENDA Y SOL-GEL**

**Pablo Javier Casanova Ozuna**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Máster en Ciencias de la Computación énfasis en Biomateriales**

Tutora: Prof. Dra. Magna M. Monteiro.

Co-Tutora: Prof. Dra. Roseli Marins Balestra.

Coordinador de la Maestría: Prof. Dr. Horacio Legal.

**SAN LORENZO- PARAGUAY**

**2021**



**Grupo de Investigación en Biomateriales**

**LABORATORIO DE BIO Y MATERIALES**

**Núcleo de Investigación y Desarrollo Tecnológico (NIDTEC)**

**Facultad Politécnica de la Universidad Nacional de Asunción  
(FP-UNA)**

**SAN LORENZO- PARAGUAY**

**2021**

Datos Internacionales de Catalogación en la Publicación (CIP)

DE BIBLIOTECA CENTRAL DE LA UNA

Casanova Ozuna, Pablo Javier.

Síntesis de hidroxiapatita dopada con plata con potenciales aplicaciones en la eliminación de patógenos en aguas: métodos vía molienda y sol-gel / Pablo Javier Casanova Ozuna - - San Lorenzo, 2021 170 p.: il.

Tesis (Máster en Ciencias de la Computación Énfasis en Biomateriales) - Facultad Politécnica, 2021

Bibliografía

1. Hidroxiapatita. 2. Plata. 3. Sol-Gel. 4. Morfología. 5. Aguas residuales. 6. Metales

CDD 546.393

## **AGRADECIMIENTOS**

- A la Facultad Politécnica de la Universidad Nacional de Asunción y a los coordinadores del Programa de Maestría en Ciencias de la Computación, por darme la oportunidad de poder continuar con mi formación profesional y con mi estudio de maestría.
- Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT) y al Programa de Vinculación de Científicos y Tecnólogos Convocatoria 2018 por la contribución económica que me brindaron durante mi estancia en la Universidad Federal de São João del Reí Campus Santo Antônio - Brasil, CSA, por permitirme viabilizar la interacción entre investigadores a nivel país e internacional.
- A la Dra. Magna Monteiro por permitirme ser uno de sus alumnos y por su asesoría en todo este tiempo, por brindarme su amistad y apoyo en todo momento.
- A la Dra. Roseli Marins Balestra del departamento de Ingeniería Mecánica – DEMEC por su colaboración y asesoría. A todos mis compañeros y amigos de la maestría, en especial a Sergio Mercado y Fabricio Mendoza que me brindan su apoyo y amistad.

A Dios a quien le debo todo en esta vida, a él que guía mis pasos y por darme la fuerza para superar las dificultades de la realización de este trabajo y me ha permitido llegar hasta este punto. A mi padre Gill Casanova que me guía desde el cielo en cada paso que avanzo. Y a mi madre Mercedes Ozuna por su apoyo y cariño que hace que todo sea posible. A todos mis hermanos y hermanas que depositan su confianza en mí. Y en especial a mi esposa Mercedes Ruiz Díaz por hacer posible mi sueño; también a mi hija, quien me motiva diariamente a luchar por mis sueños.

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue obtener un compuesto de hidroxiapatita (Hap) dopado con plata (Ag) con propiedades antibacterianas, donde se utilizó Hap obtenida a partir de hueso bovino calcinado. La preparación del compuesto (Hap/Ag) se obtuvo por dos metodologías: i) vía sol-gel de agar y ii) vía molienda, con molino de bolas. Las muestras (Hap/Ag) fueron preparadas con una relación de 97/3 en porcentaje de masa, secadas en estufa a 100°C durante 6 h y calcinadas a 900°C por 2 h, con velocidad de calentamiento de 5°C/min. Luego, fueron caracterizadas por difracción de rayos-X (XRD), espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia de energía dispersiva (EDS) y microscopía electrónica de barrido (MEB). De acuerdo con los resultados obtenidos, con ambos métodos vía sol-gel y molienda, se pudo obtener un compuesto (Hap/Ag) con la presencia de picos correspondientes a la formación de una segunda fase, que indica la incorporación del ion de Ag a la estructura de la Hap. La morfología de los compuestos (Hap/Ag) fue observada por MEB, cuyas partículas presentaron una forma semiesférica, con tamaño promedio de partícula de 0,517  $\mu\text{m}^2$  ( $D = 0,81 \mu\text{m}$ ) para vía molienda y 0,708  $\mu\text{m}^2$  ( $D = 0,95 \mu\text{m}$ ) para vía sol-gel. El proceso vía molienda arrojó mejores resultados, considerando que se obtuvo una distribución considerablemente más homogénea de Ag en la Hap, lo que podrá conferir al compuesto mayor reactividad con el medio contaminado. A pesar de que el método vía molienda haya arrojado mejores resultados, no necesariamente se debe despreciar los resultados obtenidos por el método vía sol-gel. Ambos métodos pueden ser considerados promisorios en la remediación medioambiental, para el tratamiento de aguas residuales contaminadas por metales pesados en presencia de microorganismos patógenos.

Palabras Clave: Hidroxiapatita, plata, sol-gel, molienda, morfología.

## ABSTRACT

The objective of this work was to obtain a hydroxyapatite compound (Hap) doped with silver (Ag) with antibacterial properties, where Hap was used Obtained from calcined bovine bone. The compound preparation (Hap / Ag) was obtained by two methodologies: i) sol-gel in agar media and ii) milling, with a mill of balls. The samples (Hap / Ag) were prepared with a 97/3 ratio in mass percentage, were oven-dried at 100°C for 6 h and calcined at 900°C for 2 h, with a heating rate of 5°C/min. Then, they were characterized by X-ray diffraction (XRD), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), microscopy scanning electronics (MEB) and energy dispersive spectroscopy (EDS). According to the results obtained, with both methods, sol-gel and milling, it was possible to observe the presence of peaks that corresponding to the formation of a second phase, which indicates the incorporation of the Ag ion into the Hap structure. The morphology of the compounds (Hap/Ag) observed by SEM showed a hemispherical shape, with particle size average of 0.517  $\mu\text{m}^2$  ( $D = 0.81 \mu\text{m}$ ) and 0.708  $\mu\text{m}^2$  ( $D = 0.95 \mu\text{m}$ ) by milling and sol-gel methods, respectively. The method by milling yielded better results, considering that the Ag distribution showed more homogeneous on Hap, which can suppose that compound will have greater reactivity with the contaminated medium. Although the method by milling has yielded better results, it should not necessarily be neglect the results obtained by the sol-gel method. Both methods can be promising in environmental remediation, for the treatment of wastewater contaminated by heavy metals in the presence of pathogenic microorganisms.

Key-words: Hydroxyapatite, Silver, Sol-gel, milling, Characterization

## INDICES

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	10
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	11
<b>ANEXOS</b> .....	12
<b>LISTA DE NOMENCLATURAS</b> .....	13
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	16
OBJETIVOS GENERALES .....	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	19
<b>HIPÓTESIS</b> .....	20
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	20
<b>CAPITULO I: MARCO TEÓRICO</b> .....	21
<b>1.1. CONTAMINACIÓN DEL AGUA POR METALES PESADOS “UN PROBLEMA SILENCIOSO”</b> .....	21
<b>1.2. MÉTODOS DE REMEDIACIÓN DE METALES PESADOS</b> .....	22
1.2.1. FILTRACIÓN POR MEMBRANA.....	22
a) MICROFILTRACIÓN (MF) .....	23
b) ULTRAFILTRACIÓN (UF).....	23
c) NANOFILTRACIÓN (NF).....	24
d) OSMOSIS INVERSA (OI).....	24
e) ELECTRODIÁLISIS .....	24
1.2.2. PRECIPITACIÓN QUÍMICA .....	25
1.2.3. INTERCAMBIO IÓNICO .....	26
<b>1.3. NORMAS DE REGULACIÓN DE METALES EN EL AGUA</b> .....	26
<b>1.4. HIDROXIAPATITA (Hap)</b> .....	27
1.4.1. CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES DE LA (Hap) .....	28
1.4.2. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA Hap .....	28
<b>1.5. PLATA (Ag)</b> .....	30
<b>1.6. HIDROXIAPATITA DOPADA CON PLATA (Hap/Ag)</b> .....	32
<b>CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	33
<b>2.1. PROCESAMIENTO DE POLVO DE HIDROXIAPATITA</b> .....	33
2.2.1 VÍA MOLIENDA (Hap/Ag_1).....	34
2.2.2 VÍA SOL-GEL (Hap/Ag_2).....	35



<b>2.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS</b> .....	37
2.3.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB/EDS) .....	37
2.3.2. IDENTIFICACIÓN DE TAMAÑO DE PARTÍCULAS POR PDI .....	38
2.3.3. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	39
2.3.4. DIFRACCIÓN DE RAYOS-X (DRX) .....	39
<b>CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSIONES</b> .....	41
<b>3.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB/EDS)</b> .....	41
<b>3.3. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)</b> .....	51
<b>3.4. DIFRACCIÓN DE RAYOS-X (DRX)</b> .....	55
<b>CAPITULO IV: CONCLUSIONES</b> .....	58
<b>REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA</b> .....	60
<b>ANEXOS</b> .....	67

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Composición de hueso.....	28
<b>Figura 2:</b> Estructura cristalina de la Hap y alguna posible sustitución iónica más común que se produce en la celda unitaria (Regí, 2014). .....	29
<b>Figura 3:</b> Molino de bolas, jarros y bolas de alúmina utilizadas en la molienda. ....	35
<b>Figura 4:</b> Montaje del sistema de obtención de la Hap/Ag_2 vía sol-gel. ....	36
<b>Figura 5:</b> Micrografía observada con magnificación de (a) 5,0 Kx y (b) 10,0 Kx de la muestra Hap/Ag _1 vía molienda. ....	42
<b>Figura 6:</b> Micrografía observada con magnificación de (a) 5,0 Kx y (b) 10,0 Kx de la muestra Hap/Ag _2 vía sol-gel. ....	42
<b>Figura 7:</b> Espectros EDS de la muestra Hap/Ag_1 vía molienda. ....	43
<b>Figura 8:</b> Espectros EDS de la muestra Hap/Ag_2 vía sol-gel. ....	44
<b>Figura 9:</b> Mapeamiento de la distribución de elementos químicos en la muestra Hap/Ag_1 vía molienda, donde se observa en las imágenes los analitos presentes: Carbono (en turquesa), Oxígeno (en verde), Calcio (en rojo), Fósforo (en azul) y Plata (en amarillo). En el centro inferior, en gris, la imagen real obtenida por MEB/EDS. 46	
<b>Figura 10:</b> Mapeamiento de la distribución de elementos químicos en la muestra Hap/Ag_2 vía sol-gel, donde se observan en las imágenes los analitos presentes: Carbono (en turquesa), Oxígeno (en verde), Calcio (en rojo), Fósforo (en azul) y Plata (en amarillo). En el centro inferior, en gris, la imagen real obtenida por MEB/EDS. 47	
<b>Figura 11:</b> Mapeamiento obtenido con el SAI Fiji/ImageJ para determinación de tamaños de partículas de la muestra Hap/Ag_1. a) micrografías analizadas corresponden a una magnificación de 15,00 Kx y b) región mapeada.....	48
<b>Figura 12:</b> Mapeamiento obtenido con el SAI Fiji/ImageJ para determinación de tamaños de partículas de la muestra Hap/Ag_2. a) micrografías analizadas corresponden a una magnificación de 15,00 Kx y b) región mapeada.....	48
<b>Figura 13:</b> Mapeamiento obtenido con el SAI Fiji/ImageJ para determinación de tamaños de aglomerados de la muestra Hap/Ag_1 (a) micrografías analizadas corresponden a una magnificación de 15,00 Kx y b) región mapeada.....	49
<b>Figura 14:</b> Mapeamiento a obtenido con el SAI Fiji/ImageJ, de la muestra Hap/Ag_2 para determinación de tamaños de aglomerados a) micrografías analizadas corresponden a una magnificación de 15,00 Kx y b) región mapeada.....	49

<b>Figura 15:</b> Espectros FTIR de las muestras indicadas en la imagen.....	51
<b>Figura 16:</b> Difractogramas de rayos-X de las muestras Hap/Ag_1 vía molienda, Hap/Ag_2 vía sol-gel, Hap y Ag. ....	55

### LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Tipos de tecnologías de filtración sobre membrana.....	25
<b>Tabla 2:</b> Sustancias potencialmente perjudiciales (tenores máximos permisibles), según resolución 222/02-SEAM y según la Organización Mundial de la Salud (OMS). .....	27
<b>Tabla 3:</b> Diferentes ensayos de la Ag+ como agente bactericida. ....	31
<b>Tabla 4:</b> Porcentajes de los analitos presentes en la muestra Hap/Ag_1 vía molienda: (AN= Número atómico, <b>norm wt%</b> = Porcentaje de masa normal, <b>norm. at. %</b> = Porcentaje atómico normal).....	44
<b>Tabla 5:</b> Porcentajes de los analitos presentes en la muestra Hap/Ag_2 vía sol-gel: (AN= Número atómico, <b>norm wt%</b> = Porcentaje de masa normal, <b>norm. at. %</b> = Porcentaje atómico normal).....	44
<b>Tabla 6:</b> Relación molar Ca/P de las muestras Ha/Ag sintetizadas vía gel y molienda y calcinada a 900°C, obtenidas vía análisis de EDS. ....	45
<b>Tabla 7:</b> Resultados de cuantificación automática de tamaños de partículas y de circularidad, obtenidos por el SAI Fiji/ImageJ de las muestras de Hap/Ag_1 vía molienda y Hap/Ag_2 vía sol-gel.....	50
<b>Tabla 8:</b> Diferentes bandas originadas por grupos funcionales, analizadas por distintos autores. ....	53
<b>Tabla 9:</b> Identificación y Cuantificación de fase. ....	57

## ANEXOS

<b>Anexo 1:</b> Información de los picos correspondientes a la (Ag), extraída de base de datos de materiales inorgánicos AtomWork (Inorganic Material Database AtomWork). .....	67
<b>Anexo 2:</b> Información de los picos correspondientes a la Ag extraída de base de datos de materiales inorgánicos Atomwork (Inorganic Material Database AtomWork). .....	67
<b>Anexo 3:</b> Información de los picos correspondientes a la Hap, extraída de centro internacional de datos de difracción (ICDD) (International Centre for Diffraction Data). .....	68
<b>Anexo 4:</b> Proceso de producción de la Hap a partir de hueso bobino. ....	69
<b>Anexo 5:</b> Proceso de síntesis de la Hap/Ag.....	69
<b>Anexo 6:</b> Microscopía electrónica de barrido (MEB).....	70
<b>Anexo 7:</b> Área amorfa o jorobada de la plata. ....	70
<b>Anexo 8:</b> Área cristalina de la plata. ....	71
<b>Anexo 9:</b> Área amorfa o jorobada de la Hidroxiapatita. ....	71
<b>Anexo 10:</b> Área cristalina de la hidroxiapatita.....	72
<b>Anexo 11:</b> Resultado obtenido de la muestra Hap/Ag_1 con SAI Fiji/ImageJ: .....	72
<b>Anexo 12:</b> Resultado obtenido de la muestra Hap/Ag_2 con SAI Fiji/ImageJ. ....	73
<b>Anexo 13:</b> Cuantificación de tamaños de las partículas aglomeradas con el SAI Fiji/ImageJ, de la muestra Hap/Ag_1. ....	73
<b>Anexo 14:</b> Cuantificación de tamaños de las partículas aglomeradas con el SAI Fiji/ImageJ, de la muestra Hap/Ag_2. ....	74

## LISTA DE NOMENCLATURAS

Ag: Plata

Ag<sup>+</sup>: Ion plata

Cd<sup>2+</sup>: Ion cadmio

Zn<sup>2+</sup>: Ion zinc

Ni<sup>2+</sup>: Ion níquel

Mg<sup>2+</sup>: Ion magnesio

Ba<sup>2+</sup>: Ion bario

Pb<sup>2+</sup>: Ion plomo

Mn<sup>2+</sup>: Ion manganeso

Co<sup>2+</sup>: Ion cobalto

Cu<sup>2+</sup>: Ion cobre

Ca<sup>2+</sup>: Ion calcio

Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>: Fórmula de la Hidroxiapatita

Pb: Plomo

PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>: Ion fosfato

Sn: Estaño

Au: Oro

Hg: Mercurio

Ti: Titanio

Pb: Plomo

Al: Aluminio

OH<sup>-</sup>: Hidroxilo

CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>: Ion carbonato

AgNO<sub>3</sub>: Nitrato de plata

NO<sub>3</sub><sup>-</sup>: Ion nitrato

KBr: Bromuro de potasio

Ag<sub>2</sub>O: Óxido de plata

Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>: Fosfato de plata

°C: Unidad de temperatura, grados Celsius

°C/min: Grados Celsius por minuto

µm: Unidad de longitud, micrómetros

%: Porcentaje  
g/mol: Gramos por mol  
nm: Unidad de longitud, nanómetros  
bar: Unidad de medida de presión  
mg/L: Miligramos por Litros  
g/L: Gramos por litros  
Kcps= Tasa de conteo de señal o conteo por s  
rpm: Revoluciones por minuto  
Å: Angstroms  
UFC/ml: Unidades formadoras de colonias por mililitro  
µl: Unidad de volumen, microlitros  
µg: Unidad de masa, microgramos  
ml: Unidad de volumen, mililitros  
MPa: Unidad de presión, megapascal  
mm: Unidad de longitud, milímetros  
g: Unidad de masa, gramos  
h: Unidad de tiempo, hora  
s: Unidad de tiempo, segundos  
PA: Grado de pureza analítica de reactivos  
ADN: Ácido desoxirribonucleico  
AgNPs: Nanopartículas de plata  
Ca/P: Relación Calcio/Plata  
Hap: Hidroxiapatita  
Hap/Ag: Hidroxiapatita dopada con plata  
Hap/Ag\_1: Hidroxiapatita dopada con plata vía sol-gel  
Hap/Ag\_2: Hidroxiapatita dopada con plata vía molienda  
D: Diámetro  
RI: Radio iónico  
*E. coli: Escherichia coli*  
*S. aureus: Staphylococcus aureus*  
MF: Microfiltración  
UF: Ultrafiltración

MEUF: Ultrafiltración mejorada micelar  
PEUF: Ultrafiltración mejorada con polímeros  
NF: Nanofiltración  
OI: Osmosis inversa  
IGC: Condensación de gas inerte (Inert gas consensation)  
COC0N: Cocondensación (Co-condensation)  
AN= Número atómico  
norm wt% = Porcentaje de masa normal  
norm. at. % = Porcentaje atómico normal  
DRX: Difractómetros de rayos-X  
FTIR: Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier  
EDS: Espectroscopia de energía dispersiva  
MEB: Microscopía electrónica de barrido  
ASTM: American Society for Testing and Materials (Sociedad Americana de Pruebas y Materiales)  
PDI: Procesamiento Digital de Imágenes  
SEAM: Secretaría del Medio Ambiente  
MADES: Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible  
OMS: Organización Mundial de la Salud  
DEMEP: Departamento de Ingeniería Mecánica y Producción  
UFSJ: Universidad Federal de São João del-Rei  
ICDD: Centro Internacional de Datos de Difracción (Internacional Center for Diffraction Data)

## INTRODUCCIÓN

La hidroxiapatita pura (Hap), con fórmula molecular  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , es un biomaterial ampliamente estudiado y de gran importancia en diversas áreas de la ciencia, es el componente principal de los huesos (*Vahabzadeh et al., 2015; Rad et al., 2014*), constituye aproximadamente el 70% en peso del hueso humano (*Nazeer et al., 2017*). Ha sido usada en diferentes ámbitos como regenerador o injerto óseo (*Bohner et al., 2010; Kasuga et al., 2003*), en aplicaciones odontológicas (*Bosco et al., 2015; Mohseni et al., 2014*) y como agente remediador de medios contaminados por metales pesados (*Coreño et al., 2010*); esto debido a que, la Hap posee ciertas propiedades, como bioactividad y estabilidad química, biocompatibilidad y osteoconductividad (*Bosco et al., 2015; Mohseni et al., 2014*) y capacidad de intercambio iónica, con diferentes especies químicas, principalmente, las especies bivalentes, siendo un potencial removedor de metales pesados (*Coreño et al., 2010*).

A lo largo de la historia se han desarrollado numerosas investigaciones para la remoción de metales pesados del agua, proponiendo la utilización de diferentes sustratos o sistemas (*Taipe et al., 2020; Caballero et al., 2019; Suzuki et al., 1982 y 1984*).

En sus investigaciones realizadas sobre las propiedades superficiales de la Hap. *Suzuki et al. (1981)* comprobaron que los iones  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Ba}^{2+}$  en solución acuosa son fuertemente adsorbidos por su superficie y que este comportamiento no sería simplemente un efecto de adsorción, sino un tipo de intercambio iónico entre los iones disueltos en solución y los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  de la Hap; reportando que la efectividad de remoción de estos iones obedece la siguiente secuencia de afinidad:  $\text{Cd}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$ . Siguiendo con su investigación, *Suzuki et al. (1982 y 1984)* colocaron polvo de Hap en una solución que contenía iones metálicos, como  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ . La eficiencia de remoción siguió este orden:  $\text{Pb}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Cu}^{2+}$ . El interés se centró en la rápida remoción del ion  $\text{Pb}^{2+}$ , un elemento altamente tóxico, debido a que el proceso fue considerado muy rápido y eficiente y que el mecanismo principal se dio a través del intercambio iónico entre iones de  $\text{Pb}^{2+}$  e iones de  $\text{Ca}^{2+}$ .



La selectividad de la Hap por cationes metálicos fue explicada considerando el radio iónico y la electronegatividad. Cationes que se encuentran dentro del rango de los radios (0,9-1,3 Å) y con mayores valores de electronegatividad, reemplazarían con más facilidad a los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  de la Hap, que aquellos con menor radio iónico (*Suzuki et al., 1982*), sin embargo estos autores proporcionaron pocas evidencias para sostener esta teoría y fueron refutadas por *Xu et al. (1994)*, argumentando que el mecanismo de intercambio iónico sería más favorable para cationes con radios iónicos similares al del  $\text{Ca}^{+2}$ , según estos autores sería complicado el intercambio entre los iones de  $\text{Pb}^{+2}$  por iones de  $\text{Ca}^{2+}$ , ya que el  $\text{RI}_{\text{Pb}^{2+}}$  (1,26 Å) es mayor al de  $\text{RI}_{\text{Ca}^{2+}}$  (0,99 Å). A pesar de esto, se ha reportado el uso de la Hap como medio adsorbente efectivo para la remoción de ion Pb (II) de aguas contaminadas, 89 mg  $\text{Pb}^{2+}$ / g Hap (*Caballero et al., 2019*). Los mecanismos por lo que esto sucede son complejos y comprenden: intercambio iónico entre iones de Ca (II) e iones de Pb (II) y reacción de complejación superficial entre Pb (II) y los grupos  $\text{PO}_4^{-3}$  (*Barberá et al., 2014; Caballero et al., 2019*). Además, existen evidencias del uso de la Hap en la reducción de arsénico y flúor (*Taipe et al., 2020; Coreño et al., 2010*).

Con base en estos reportes, se considera que el comportamiento de la interacción entre los iones metálicos con la Hap depende en gran medida de las características de cada metal individualmente (*Xu et al., 1994*) y de varios parámetros operativos como el tiempo de contacto, la dosis de Hap y el pH (*Taipe et al., 2020; Caballero et al., 2019*).

Por otro lado, el agua contaminada con metales pesados, en algunos casos está acompañada por la presencia de microorganismos patógenos, que incluyen: bacterias, virus, hongos. etc. Estos metales pesados y microorganismos pueden llegar al organismo a través del agua que se consume, causando diversas intoxicaciones y transmisión de enfermedades. Una de las alternativas para mitigar o contrarrestar esta problemática, es incorporar elementos que actúen como agentes bactericidas como la plata (Ag) (*Rai et al., 2012; Baker et al., 2005; Morones et al., 2005*), el cobre (Cu) (*Arias et al., 2020*), entre otros, en los procesos de potabilización y purificación del agua, dotándolos de propiedades bactericidas.

Existe una gran variedad de virus, hongos y bacterias, que pueden afectar de manera nociva la salud humana, por lo que, es imprescindible desarrollar materiales con altas propiedades antibacterianas.

Los estudios han demostrado que los iones plata son capaces de penetrar la pared celular bacteriana, causando un desequilibrio homeostático y daños estructurales en la membrana bacteriana, siendo así, considerado un fuerte inhibidor del crecimiento de colonias bacterianas (*Riaz et al., 2018*). Específicamente, se une al ADN y ARN de las bacterias evitando su reproducción. Además, la Ag inhibe la cadena de transporte de electrones de las células bacterianas, lo que también resulta en la destrucción de las mismas (*Jones et al., 2010; Dibrov et al., 2002*).

Asociar materiales con capacidad de capturar metales pesados con elementos capaces de eliminar patógenos en agua es un desafío que demanda esfuerzos. Implica el dopaje de un material adsorbente con un elemento antibacteriano. La Hap es uno de estos materiales que, debido a su facilidad de intercambiarse iónicamente con diferentes elementos químicos, como por ejemplo la plata (Ag), es ideal para dicho uso. Además, la propia Hap posee una baja o limitada propiedad antibacteriana, esta capacidad conduce a investigaciones centrada en modificar la estructura molecular de la Hap dopándola con dicho metal (*Yuan et al., 2018; Wang et al., 2018; Riaz et al., 2018; Siek et al., 2017*).

Con relación a la síntesis de Hap dopada con Ag, Nath et al., 2010 han reportado que sembraron una línea celular bacteriana de *Escherichia coli* (*E. coli*), con densidad celular de  $10^6$ /ml en un compuesto de Hap/Ag que contiene 10 % de Ag, después de 4 h de inoculación, el compuesto Hap/Ag mata todas las bacterias de *E. coli*. Por otro lado, *Siek et al., 2017* reportaron que con 1% de Ag en un compuesto de Hap/Ag ya fue posible obtener actividad bactericida. En una placa inocularon  $3 \times 10^4$  UFC/ml de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) y *E. coli*, dejaron crecer a 37 °C durante 24 h, el compuesto de Hap/Ag mostró actividad antibacteriana: 100% para *E. coli* y de 85% para *S. aureus*.

La obtención de nuevos materiales capaces de remover metales pesados y al mismo tiempo eliminar patógenos del agua, es de gran importancia tecnológica y de mucho interés para la comunidad científica. Por esta razón, el presente trabajo de

investigación se centra en dopar con nanopartículas de Ag la estructura molecular de la Hap obtenida a partir del hueso bovino, mediante dos procesos: i) vía sol-gel y ii) molienda, luego caracterizar y describir el comportamiento de este nuevo compuesto (Hap/Ag), de forma que se establezcan las condiciones necesarias para un posible uso en aplicaciones relacionadas a la potabilización del agua.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVOS GENERALES**

- Sintetizar Hidroxiapatita dopada con plata (Hap/Ag), a través del proceso de calcinación de materiales naturales (hueso bovino) y la obtención del complejo Hap/Ag por dos vías (sol-gel y molienda), de forma a conferirle propiedades bactericidas.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Procesar Hap natural a partir del hueso bovino por calcinación, de acuerdo a los procedimientos ya establecidos en el Labioymat.
- Obtener un compuesto Hap/Ag, utilizando dos vías: sol-gel y molienda.
- Clasificar las partículas por granulometría, utilizando estándares ASTM.
- Caracterizar morfología de superficie, composición y distribución química elemental superficial de las muestras (Hap/Ag), por microscopio electrónico de barrido y espectroscopía de energía dispersiva (MEB/EDS).
- Determinar el tamaño de partícula por procesamiento digital de imagen utilizando el software Fiji/ImageJ.
- Caracterizar el compuesto por cristalografía, para determinar las fases presentes y las relaciones de fase, grado de cristalinidad y el tamaño de cristalito por difracción de rayos-X.
- Determinar la formación de grupos funcionales presentes, utilizando espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier.

## **HIPÓTESIS**

Considerando las propiedades del ion  $\text{Ag}^+$  como agente bactericida y fungicida de amplio espectro y también la importancia de la Hap para la remediación medioambiental, como captador de metales pesados en aguas residuales; sería factible incorporar micropartículas de Ag en la estructura molecular de la Hap, para lograr un nuevo compuesto de Hap/Ag, que provea simultáneamente una eficaz remoción de metales pesados asociado a una posible actividad antibacteriana.

## **JUSTIFICACIÓN**

El agua de los ríos, lagos y mares durante muchos años han sido contaminados con toda clase de desechos, efluentes industriales, domésticos y en algunos casos con metales pesados, especialmente los considerados tóxicos. Entre ellos se encuentran los siguientes: Cd, Cr, Sn, Au, Hg, Ti, Pb y Al, sobrepasando en muchos casos los valores máximos de concentración permisibles, impuestos por las legislaciones nacionales e internacionales.

En la actualidad, existe una gran preocupación a nivel mundial, por el incremento de estos contaminantes, que tienden a permanecer indefinidamente en el medio ambiente, algunos se acumulan en la médula espinal y generan toxicidad/alteraciones graves al organismo, como su efecto es silencioso, cuando nos damos cuenta del daño producido, ya suele ser tarde y sobre todo peligroso para la salud.

Las posibles soluciones, que permitan mitigar los daños en el medio ambiente, apuntan a la necesidad de seguir investigando, a fin de encontrar nuevas estrategias y tecnologías para la remoción de metales tóxicos del agua y del medio ambiente.

Con la finalidad de proponer una alternativa a este problema, se procedió a la producción de hidroxiapatita natural, obtenida a partir del hueso bovino, dopada con plata, como una estrategia para la eliminación de metales pesados y la incorporación el efecto antibacteriano de la plata, lo que debería conducir al desarrollo de un material (Hap/Ag) químicamente estable; una alternativa más económica comparando con la hidroxiapatita sintética dopada con plata y con el potencial de ser utilizado en el tratamiento de descontaminación de aguas.

## CAPITULO I: MARCO TEÓRICO

### 1.1. CONTAMINACIÓN DEL AGUA POR METALES PESADOS “UN PROBLEMA SILENCIOSO”

El término metal pesado se refiere a elementos químicos con alta densidad (mayor a 4 g/cm<sup>3</sup>), masa y peso atómico por encima de 20 g/mol, tóxicos en concentraciones bajas. Algunos de estos elementos son: aluminio (Al), bario (Ba), berilio (Be), cobalto (Co), cobre (Cu), estaño (Sn), hierro (Fe), manganeso (Mn), cadmio (Cd), mercurio (Hg), plomo (Pb), arsénico (As), cromo (Cr), molibdeno (Mo), níquel (Ni), selenio (Se), talio (Tl), vanadio (Va), oro (Au) y zinc (Zn) (*Concon et al., 2009*).

Estos metales están clasificados de acuerdo a sus funciones y efectos biológicos, siendo así, tenemos los metales:

**1) Esenciales**, con funciones biológicas conocidas y que son requeridos en cantidades traza, como nutrientes para la vida de los organismos; estos elementos son: sodio (Na), potasio (K), magnesio (Mg), calcio (Ca), vanadio (V), manganeso (Mn), hierro (Fe), cobalto (Co), níquel (Ni), cobre (Cu), zinc (Zn), molibdeno (Mo) y wolframio (W), se requieren en unos miligramos o microgramos por día y cuando pasan cierto umbral de concentración se vuelven tóxicos.

**2) Tóxicos**, pueden ejercer un efecto nocivo aún en bajas concentraciones, los cuales son: cadmio (Cd), cromo (Cr), estaño (Sn), oro (Au), mercurio (Hg), titanio (Ti), plomo (Pb) y aluminio (Al) y los metaloides que son: germanio (Ge), arsénico (As), antimonio (Sb) y selenio (Se).

**3) No esenciales**, que no son tóxicos y sus efectos biológicos son desconocidos; estos elementos son: rubidio (Rb), cesio (Cs) y estroncio (Sr) (*Constantino et al., 2005*).

Los metales pesados en el agua son causantes de graves problemas para la salud de las personas, de forma directa por el consumo de estas aguas y de forma indirecta por el consumo de alimentos contaminados, que pueden desencadenar en diversas intoxicaciones causando daño irreparable a la salud (*Franco et al., 2016; Pineda et al 2015; Méndez et al., 2009*).

Debido a su propiedad altamente tóxica, asociada al carácter acumulativo y bioacumulativo, no pueden ser eliminados por el cuerpo, así como no-

biodegradable, pueden ocasionar una variedad de patologías en el ser humano e incluso generar diversos tipos de cáncer (*Pineda et al 2015; Méndez et al., 2009*).

Por otro lado, es uno de los problemas ambientales más preocupantes a nivel mundial. El abuso de las actividades de las industrias de minería y fundición de metales sin control adecuado, así como el desecho de aguas residuales sin tratamiento, en donde las aguas naturales son los receptores de dichos contaminantes, tienden a incrementar la concentración de metales pesados en el agua que en muchos casos son consideradas irreversibles o mismo reversibles, pero a un alto costo monetario (*Chacon, 2010; Nemerow 1998*).

## **1.2. MÉTODOS DE REMEDIACIÓN DE METALES PESADOS**

La remediación consiste en una serie de acciones orientadas a eliminar o disminuir significativamente la presencia de metales pesados en el agua. El problema de la contaminación del agua por metales pesados trasciende diversas fronteras, tanto en lo social como en la salud y medio ambiente, por tal razón, atrae la atención de la comunidad científica y autoridades ambientales que han detectado el problema y en busca de mitigarlo han desarrollado un importante número de métodos o técnicas, tales como: la filtración por membrana entre las cuales podemos citar la microfiltración, nanofiltración y osmosis inversa; precipitación química, coagulación-floculación, intercambio iónico para la remoción parcial o total de estos metales del agua. A continuación, se describen los métodos más utilizados en la actualidad, lo que se conoce como métodos convencionales, refiriéndose a las técnicas que habitualmente se emplean y las no convencionales que emplean técnicas innovadoras para eliminar metales pesados del agua, además de las citadas, las más comúnmente aplicadas son:

### **1.2.1. FILTRACIÓN POR MEMBRANA**

Es un proceso de separación física, aprovecha la diferencia de presión hidrostática como fuerza impulsora. El agua pasa a través de una membrana, donde los iones son retenidos por la membrana y el disolvente la atraviesa y quedan separados entre sí en dos fases (*Chacon et al., 2010*).

Es una tecnología altamente innovadora empleada a nivel industrial como alternativa frente a los métodos convencionales de separación, tales como la destilación, centrifugación, extracción y la filtración, por sus enormes ventajas, entre ellas, alta selectividad, separación sin la necesidad de materiales auxiliares o condiciones de operación extremas (como alta temperaturas), costos de procesamiento relativamente bajos. Se emplea en proceso para el tratamiento de agua potable, aguas residuales industriales y en menor medida para aguas residuales domésticas (*Chacon, 2010*).

En la Tabla 1 se encuentran los diferentes tipos de procesos de filtración sobre membranas, los cuales son clasificados de acuerdo a la fuerza impulsora aplicada para lograr la separación, a la magnitud de esta fuerza, tamaño de los compuestos a separar y materiales de las membranas (sintéticos o poliméricos) (*Chacon, 2010; Nemerow 1998*).

#### **a) MICROFILTRACIÓN (MF)**

Tiene lugar por un efecto de tamiz, la separación se basa en la relación existente entre diámetro de partículas y el de los poros, se usa cuando partículas de diámetros 0,1 a 10  $\mu\text{m}$  se separan de un disolvente y otros componentes de bajo peso molecular (*Hernández, 1990*).

#### **b) ULTRAFILTRACIÓN (UF)**

Es una técnica de separación de membrana que funciona a bajas presiones para la eliminación de material disuelto y coloidal, difiere principalmente de la osmosis inversa y nanofiltración en términos de presión aplicada y proporciona un mayor flujo con menos consumo de energía. Dado que el tamaño de los poros de las membranas de UF son más grandes que los iones metálicos disueltos en forma de iones hidratados o como complejos de bajo peso molecular, estos iones pasarían fácilmente a través de las membranas de UF. Para obtener una alta eficiencia de eliminación de iones metálicos, se propuso la ultrafiltración mejorada micelar (MEUF) y la ultrafiltración mejorada con polímero (PEUF) (*Yagut et al., 2020*).

### **c) NANOFILTRACIÓN (NF)**

Es una tecnología de membrana de ultra/baja presión con el mismo fundamento que la osmosis inversa, la diferencia principal es el grado de retención que logran estas membranas, son capaces de retener especies neutras con peso molecular entre 200-300 g/mol, y también de rechazar iones inorgánicos por un mecanismo de exclusión por tamaño en combinación con las interacciones electrostáticas entre los iones y la membrana cargada, presenta mayor rechazo de iones divalentes y menor rechazo de iones monovalentes. Es una técnica de tratamiento de agua relativamente reciente que utiliza membranas con poros muy pequeños (<1 nm), se emplea cuando la osmosis inversa o ultrafiltración no son opciones factibles para una separación (*González et al., 2006*).

### **d) OSMOSIS INVERSA (OI)**

Es un proceso de permeación a través de membrana para la separación por difusión controlado o cribado. La solución se pasa sobre la superficie de una membrana específica semipermeable, debiendo la presión aplicada superar la osmótica de la solución. La membrana debe ser: a) muy permeable al agua; b) muy impermeable a los solutos; c) capaz de soportar la presión aplicada sin fallo; d) tan fina como sea posible, consistente con la fuerza necesaria; e) químicamente inerte, mecánicamente fuerte y resistente al deslizamiento (*Nemerow 1998; Hernández. 1990*).

La microfiltración, la ultrafiltración y la osmosis inversa, básicamente son idénticos que difieren solo en el tamaño de la partícula a separar y el tipo de membrana usada.

### **e) ELECTRODIÁLISIS**

Es otra técnica de descontaminación que puede remover componentes iónicos de soluciones acuosas basada en la diferencia de potencial eléctrico, como fuerza impulsora; se utilizan membranas permeables selectivas de intercambio iónico que permiten el paso de los iones, pero no de agua ni de moléculas y coloides. Esta técnica tiene la capacidad de remover iones contaminantes cargados de hasta



0,0001  $\mu\text{m}$ , mediante hojas o láminas porosas de resinas de intercambio iónico con una baja permeabilidad relativa para el agua (*Taylor, 2002*).

**Tabla 1:** Tipos de tecnologías de filtración sobre membrana.

Proceso	Fuerza directora (diferencia de presión)	Retenido	Permeado	Ejemplo de aplicación
Microfiltración (MF)	0.1 - 5 bar	Partículas	Disolventes, Componentes diluidos	Lavado de pigmentos, separación de aceite/agua de emulsiones.
Ultrafiltración (UF)	1 - 10 bar	Partículas, Macromoléculas	Disolventes, Componentes diluidos con masa molecular pequeña e iones.	Limpieza de productos biotecnológicos: albumina, gelatina y suero.
Nanofiltración (NF)	10 – 40 bar	Partículas, sustancias diluidas e iones polivalentes.	Disolventes, componentes diluidos con masa molecular muy pequeña e iones monovalentes.	Desalinización y limpieza de aguas residuales
Osmosis Inversas (OI)	10 - 200 bar	Partículas y todos los componentes diluidos.	Solamente disolvente.	Desalinización de agua del mar, limpiezas de aguas residuales

**Fuente:** Chacon, 2010.

### 1.2.2. PRECIPITACIÓN QUÍMICA

Las reacciones de precipitación consisten en la formación de un compuesto no soluble, llamado precipitado, producido al mezclar dos disoluciones diferentes, cada una de las cuales aportará un ion a dicho precipitado, es decir, una reacción de precipitación tiene lugar cuando uno o más reactivos, combinándose llegan a generar un producto insoluble. Es una técnica muy utilizada en los procesos industriales ya que es relativamente sencilla de operar, económica y selectiva, aunque su principal desventaja es que genera grandes cantidades de lodos (*Huisman et al., 2006*).

### 1.2.3. INTERCAMBIO IÓNICO

Es un proceso de separación física en la que los iones intercambiados no se modifican químicamente, las principales ventajas del intercambio iónico son la recuperación del metal, la selectividad, el menor volumen de lodo producido (*Zewail et al., 2015*).

### 1.3. NORMAS DE REGULACIÓN DE METALES EN EL AGUA

Para minimizar la presencia de metales pesados, sustancias potencialmente perjudiciales, a nivel de trazas en el agua, se establecen normativas y estándares como medida de preservación de la calidad del agua, con el fin de realizar un monitoreo y definir el uso al cual se destine. En Paraguay la Secretaria del Medio Ambiente (SEAM), ahora Ministerio del Ambiente y Desarrollo Sostenible (MADES), a través de la resolución 222/02, establece el padrón de calidad de las aguas en territorio paraguayo, basado en parámetros estándares internacionales establecidos por la Organización Mundial para la Salud (OMS), donde son fijados los tenores máximos permisibles de los metales pesados, descritos en la Tabla 2 y clasifican las aguas en cuatro clases según sus uso: **Clase 1** para el abastecimientos domésticos después del tratamiento simplificado (cloración y filtración), **Clase 2** para el abastecimientos domésticos después del tratamiento convencional (coagulación, decantación, filtración y cloración), **Clase 3** para el abastecimientos domésticos después del tratamiento especial (tratamiento convencional más ozonización) y **Clase 4** para la navegación y uso menos exigentes.

**Tabla 2:** Sustancias potencialmente perjudiciales (tenores máximos permisibles), según resolución 222/02-SEAM y según la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Parámetros	Símbolo	OMS en mg/L	Tenores máximos permisibles en mg/L en Paraguay			
			Clase 1	Clase 2	Clase 3	Clase 4
Aluminio	Al	0,2	0,2	0,2	0,2	No especifica
Arsénico	As	0,01	0,01	0,01	0,05	No especifica
Bario	Ba	0,7	2	2	1	No especifica
Cadmio	Cd	0,003	0,001	0,001	0,001	No especifica
Cobre	Cu	2	1	1	1	No especifica
Cromo III	Cr III	0,05	0,5	0,5	0,5	No especifica
Cromo VI	Cr VI	0,05	0,05	0,05	0,05	No especifica
Estaño	Sn	-	2	2	2	No especifica
Hierro	Fe	0,3	0,3	0,3	0,3	No especifica
Manganeso	Mn	0,4	0,1	0,1	0,1	No especifica
Mercurio orgánico	Hg	-	0	0	0	No especifica
Mercurio inorgánico	Hg	-	0,002	0,002	0,002	No especifica
Níquel	Ni	0,02	0,025	0,025	0,025	No especifica
Plomo	Pb	0,10	0,001	0,001	0,003	No especifica
Selenio	Se	0,01	0,01	0,01		No especifica
Zinc	Zn	3	3	3	3	No especifica

**Fuente:** MADES (ex SEAM, 2002).

#### 1.4. HIDROXIAPATITA (Hap)

La Hap es una de las cerámicas bioactivas más estudiadas, considerada químicamente similar al componente mineral del hueso y otros tejidos duros en los mamíferos, es decir, se compone de los mismos iones que construyen la parte mineral de los huesos y dientes. En la Figura 1, se observa la composición del tejido óseo, la fase mineral está compuesta aproximadamente de 95% de Hap, 5% de magnesio (Mg), sodio (Na), potasio (K), flúor (F) y cloro (Cl); la fase Orgánica compuesta por 95% de colágenos, 5% de proteínas no-colágenas y un 10% de agua (Donglu, 2006).

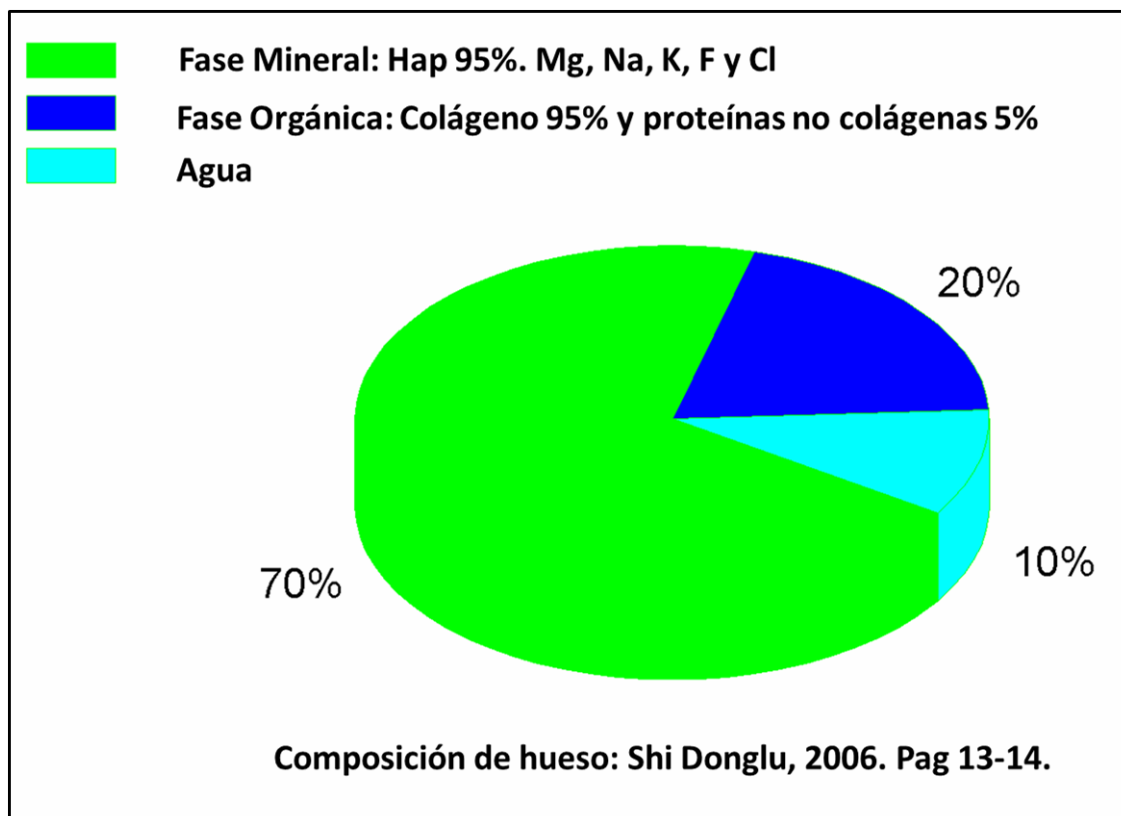


Figura 1: Composición de hueso.

#### 1.4.1. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LA (Hap)

La Hap cristaliza en el sistema hexagonal, clasificada por el grupo espacial  $P6_3/m$ , con simetría rotacional hexagonal y un plano de reflexión. Sus parámetros de red son de  $a=b= 0,943$  nm y  $c= 0,688$  nm, que se caracteriza por una simetría perpendicular a tres ejes "a" equivalentes ( $a_1, a_2, a_3$ ), formando un ángulo de  $120^\circ$  entre sí. Su celda unitaria contiene una representación completa del cristal de la apatita, consistente en grupos de  $Ca^{+2}$ ,  $PO_4^{-3}$  y  $OH^-$  empaquetados juntos en un arreglo atómico (Gregor, 2007; Guastaldi et al., 2010).

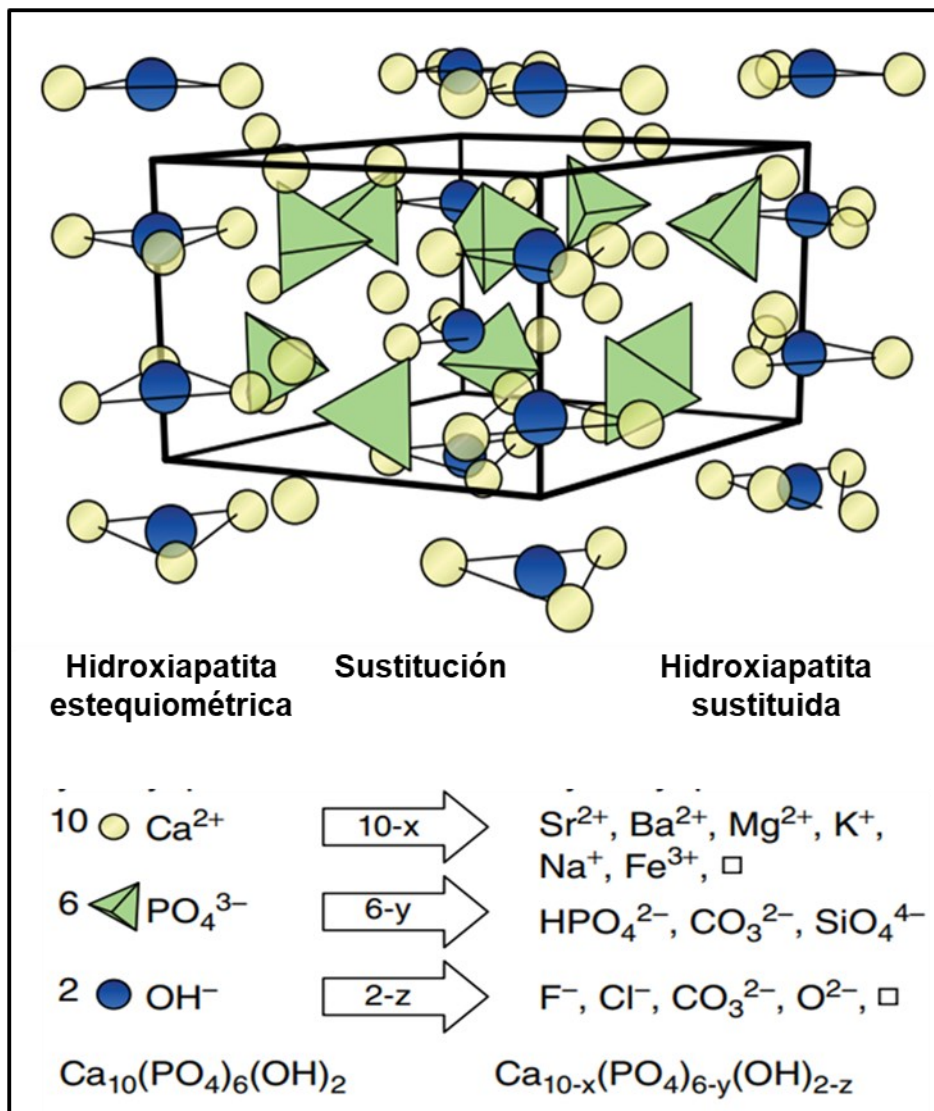
#### 1.4.2. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA Hap

La Hap presenta una fórmula química de  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ , con una relación de  $Ca/P= 1,67$ , aunque es común encontrar Hap deficiente en calcio, con una relación molar  $Ca/P$  que varía entre 1,5 y 1,67 (Dorozhkin et al., 2012). La Hap puede experimentar sustituciones tanto en posiciones aniónica como catiónica,

figura 2. Por ejemplo, los iones  $\text{Ca}^{2+}$  pueden sufrir un desplazamiento metátesis por cationes de Sr, Ba, Mg, K, Na, Fe, Ag, etc (Regí, 2014; Guastaldi et al., 2010).

Además, los aniones fosfato  $\text{PO}_4^{3-}$  se pueden reemplazar parcialmente por grupos carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) y los grupos  $\text{OH}^-$  pueden reemplazarse con bastante frecuencia por  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{O}^{2-}$  (Regí, 2014; Guastaldi et al., 2010).

Las sustituciones pueden provocar cambios en los parámetros de red, la cristalinidad, la simetría de los cristales, la estabilidad térmica, la morfología, la solubilidad, las características físicas, químicas y biológicas (Donglu, 2006).



**Figura 2:** Estructura cristalina de la Hap y alguna posible sustitución iónica más común que se produce en la celda unitaria (Regí, 2014).

## 1.5. PLATA (Ag)

La plata es uno de los metales más antiguos, tuvo un gran impacto en la medicina cuando se descubrió sus propiedades antibacterianas de amplio espectro.

Dichas propiedades han sido explotadas desde tiempos antiguos por las culturas asiática y mediterránea, la plata es utilizada en tratamientos quirúrgico de heridas y huesos rotos (*Balamurugan et al., 2008*). En la tabla 3, se reporta la amplia aplicabilidad de la Ag como agente bactericida.

Algunas bacterias son susceptibles a la acción y presentan baja resistencia a los efectos de la plata, por lo que los iones  $Ag^+$  han sido incorporados en variados materiales, tales como; Hap y vidrios bioactivos entre otros para dotarlos de propiedades antibacterianas a largo plazo (*Balamurugan et al., 2008*). Estudios han demostrado que los iones  $Ag^+$  son capaces de penetrar la pared celular bacteriana y destruir el equilibrio celular o causar daños estructurales en la membrana, se infiltran en el interior de las bacterias, en lugar de residir en el área de la membrana celular (*Yamanaka et al., 2005; Sondi et al., 2004*).

Además, la Ag inhibe la cadena de transporte de electrones de las células bacterianas, lo que provoca la destrucción de las mismas. (*Jones et al., 2010; Dibrov et al., 2002*). *Morones et al., 2005*, demostraron que las nanopartículas de Ag (AgNPs) actúan de tres maneras contra las bacterias: a) en el rango de 1 a 10 nm se adhieren a la superficie de la membrana y perturban drásticamente su funcionamiento normal, tal como la permeabilidad y la respiración; b) se liberan iones de Ag, lo que tendrá una contribución adicional al efecto bactericida de la AgNPs; c) son capaces de penetrar la pared celular bacteriana y causar daños al interactuar con compuestos que contengan azufre (S) y fósforo (P).

El efecto antibacteriano de la Ag, puede aumentarse manipulando el tamaño a nivel nanométrico (*Rai et al., 2012*), las partículas más pequeñas con una mayor relación superficie-volumen proporcionan un medio más eficiente para la actividad antibacteriana (*Baker et al., 2005*). También se ha reportado la actividad fungicida de las nanopartículas de Ag, solas y en combinación con agentes antifúngicos (*Gajbhive et al., 2009*).

**Tabla 3:** Diferentes ensayos de la Ag<sup>+</sup> como agente bactericida.

Referencia	Muestra	Cepa de prueba	Eficacia bactericida y fungicida	Cultivo celular
Yuan et al., 2018	Hap/Ag con 0,02%, 0.03% y 0.05% de Ag	<i>E. coli</i> Números de colonia (1215)	68,9% 78,2% 87,0%	A 37°C durante 24 h.
Wang et al., 2018	Hap/Ag con 6,6% Ag	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>E. coli</i>	100%	A 37 °C durante 10 h. La suspensión de bacterias (200 µl) se sembró en la solución de 0,002 g de Hap/Ag en 20 ml de medio de cultivo.
Riaz et al., 2018	Hap/Ag con 1,01%, 3,16%, 5,20% y 7,19% de Ag	<i>Staphylococcus aureus</i> 10 <sup>5</sup> UFC/ml	100%	A 35 °C durante 7 días. Se prepararon cuatro diluciones diferentes: 0,3 M, 0,7 M, 1,1 M y 1,5 M de cada muestra en 100 µl de agua destilada estéril.
Siek et al., 2017	Hap/Ag con 1,01% Ag	<i>E. coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> , 3x10 <sup>4</sup> UFC/ml	100% 85%	10 µl de bacteria se dejaron crecer a 37 °C durante 24 h.
Gajbhive et al., 2009	AgNPs con 0,108 mg Ag/ml (20 a 60 nm)	<i>Phoma glomerata</i> , <i>Phoma herbarum</i> , <i>Fusarium semitectum</i> , <i>Trichoderma sp</i> y <i>Candida albicans</i>	73% 47% 47% 67% 87%	10 µg fluconazol más 20µl AgNPs se incubaron a 25 °C durante 48 h.
Baker et al., 2005	AgNPs (75 nm por IGC y 15 nm por COCOM) ICG: i) 63,6 µg Ag/cm <sup>2</sup> ii) 31,8 µg Ag/cm <sup>2</sup> COCON: i) y ii) 8.0 µg Ag/cm <sup>2</sup>	<i>E. coli</i> UFC (2600) para IGC  UFC (1400) para COCOM	100%	A 37 °C durante 1 h. Evaluaron para dos casos: i) Las AgNPs se esparcieron en placas de agar seguido de la adición de <i>E. coli</i> ii) Las AgNPs y <i>E. coli</i> , se mezclaron y luego se esparcieron sobre las placas.
Morones et al., 2005	AgNPs (25, 50, 75 y 100 µg Ag/ml)	<i>E. coli</i> , <i>Vidrio Cholerae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Salmonella typhus</i>	100 % con (75 µg Ag/ml)	Las placas se incubaron con 90 µl de Ag <sup>+</sup> más 10 µl de la cepa en fase logarítmica con una densidad óptica de 0.5 a 595 nm, durante 30 min a 37°C
Sondi et al., 2004	Iones de Ag 10 µg Ag/ml 50-100 µg Ag/ml 20 µg Ag/ml	<i>E. coli</i>  10 <sup>5</sup> UFC  10 <sup>4</sup> UFC	70% 100% 100%	Las placas se incubaron durante 24 h a 37°C.
Yamanaka et al., 2005	Iones de Ag 900 µg Ag/ml	<i>E. coli</i> 10 <sup>7</sup> -10 <sup>8</sup> UFC	99,99%	Las placas se incubaron con 90 ml de Ag <sup>+</sup> mas 10 ml de la cepa durante 24 h a 35°C

## 1.6. HIDROXIAPATITA DOPADA CON PLATA (Hap/Ag)

La plata ha sido usada como agente bactericida (*Rai et al., 2012; Jones et al., 2010; Baker et al., 2005; Morones et al., 2005; Yamanaka et al., 2005; Sondi et al., 2004; Dibrov et al., 2002*). Es de esperarse que su incorporación en dosis controladas, en la estructura de la Hap le proporcione una propiedad antibacteriana. De los diversos mecanismos por los cuales la Ag inhibe el desarrollo bacteriano, el que se relaciona con la aplicación de Ag se relaciona con las cargas electrónicas de la especie atómica. Los átomos de Ag tienen carga positiva, que son atraído por la carga negativa de la membrana celular de las bacterias, esta propiedad provoca la alteración y el rompimiento de dicha membrana, ocasionando la destrucción de la bacteria. También puede suceder que el ion Ag penetre la membrana y se ubique en el interior de la bacteria y modifique el ADN, por mecanismos de alteración del sistema enzimático; así inhibirá la reproducción bacteriana (*Castellano et al., 2007; Yamanaka et al., 2005*). Se ha reportado la capacidad de la Hap de incorporar una amplia variedad de iones en su estructura, como lo mencionado por (*Regí, 2014*) y la presencia de estos iones juega un rol esencial en las propiedades biológicas y químicas de la Hap.



## CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo, se describen los procedimientos experimentales utilizados en la elaboración de esta investigación. El estudio de la Hap dopada con Ag se desarrolló en 4 etapas:

- Primera etapa consiste en el procesamiento de polvo de la Hap a partir del hueso bovino por calcinación.
- Segunda etapa: se realizan los procedimientos de síntesis de la Hap dopada con Ag vía sol-gel.
- Tercera etapa: se realizan los procedimientos de síntesis de la Hap/Ag por el método químico - mecánico vía molienda.
- Cuarta etapa: se describen las técnicas y métodos adoptados en la caracterización química y microestructural de las muestras de Hap/Ag.

### 2.1. PROCESAMIENTO DE POLVO DE HIDROXIAPATITA

Para la producción de la Hap en polvo, fue utilizado hueso bobino como materia prima. Se lo calcinó a 900°C durante 6 h con una velocidad de calentamiento de 10°C/min en mufla (BABERTHERM B 180, Alemania), este proceso fue realizado para garantizar la eliminación completa de la materia orgánica. Luego fue sometido a un proceso de tamizado para obtener una granulometría de 37 µm, fueron utilizados tamices graduados que siguen los estándares ASTM con código TAMABS-400-1 (apertura: 37 µm y malla Nro.: 400), Zonytest, Argentina.

La producción de la Hap a partir de hueso bovino por calcinación fue previamente establecida en el Labioymat (*Ferreiro et al., 2012*). El polvo producido fue almacenado en recipientes de vidrios cerrados y guardados en desecadores, para los posteriores ensayos y caracterizaciones.

## **2.2 SINTESIS DE LA HIDROXIAPATITA DOPADA CON PLATA.**

### **2.2.1 VÍA MOLIENDA (Hap/Ag\_1)**

Para la síntesis de la Hap dopada con Ag por el método mecánico vía molienda (Hap/Ag\_1), se emplearon como materiales precursores los siguientes: Hap obtenida a partir de hueso bovino con granulometría de 37  $\mu\text{m}$  y sal de  $\text{AgNO}_3$  (99,9 % de pureza, Unicorn, India). Para la reacción se utilizó un molino de bolas planetarios (ND2L, Torrey Hills Technologies LLC, EE.UU.), con capacidad de molienda de hasta nivel nano (0,03  $\mu\text{m}$ ), perteneciente al Laboratorio de Ingeniería de Materiales del Departamento de Ingeniería Mecánica y Producción – DEMEP, Universidad Federal de São João del-Rei (UFSJ)- Brasil.

Este proceso se basa en la producción de reacciones químicas entre los materiales precursores, los cuales son activados mecánicamente por la alta energía producida por la molienda mecánica, asociada a la energía potencial y cinética que poseen las bolas, durante el proceso de molienda y que se traduce en energía para la reacción.

Las bolas de alúminas chocan con las paredes laterales del crisol de alúmina, con el fondo y la tapa, produciendo fricción e impacto entre los precursores facilitando la reacción entre ellos. Para la síntesis descrita, fueron empleadas 30 bolas de alúmina de 10 mm de diámetro (Figura 3), para la cantidad de muestra de 5 g de precursores, la velocidad de operación fue de 387 rpm, durante el tiempo de la molienda de 30 min.

Después de molidas, las muestras fueron separadas de las bolas de alúmina por un proceso de tamizado. Luego, la muestra fue secada a 100°C por 24 h en estufa. Una vez seca la muestra, se procedió a la realización del tratamiento térmico (calcinación) a 900°C en mufla (BABERTHERM B 180, Alemania), por 2 h, con velocidad de calentamiento de 5°C/min, a fin de eliminar los residuos de iones nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y proveer el ordenamiento cristalino del compuesto. Posteriormente, las muestras fueron reservadas para su posterior caracterización por microscopio electrónico de barrido y espectroscopia de energía dispersiva (MEB/EDS), análisis de partícula por PDI (Fiji/ImageJ), espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y difracción de rayos-X (DRX).



**Figura 3:** Molino de bolas, jarros y bolas de alúmina utilizadas en la molienda.

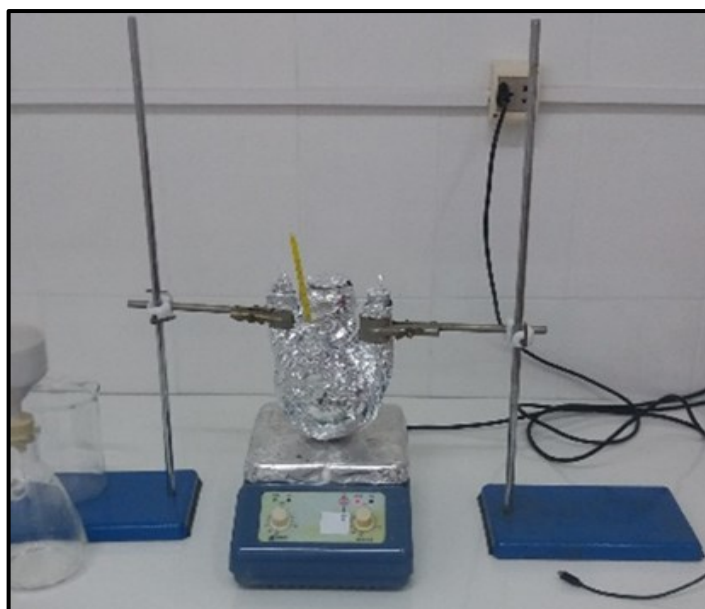
### 2.2.2 VÍA SOL-GEL (Hap/Ag\_2)

Para la síntesis de la muestra de Hap/Ag\_2, primeramente, se preparó una solución de gel en medio agar. En un matraz de 3 cuellos de 500 ml, se vertió 100 ml de agua bidestilada, a esto se le agregó 0,45 g de agar bacteriológico, (OXOID, Inglaterra); la solución fue calentada hasta temperatura de ebullición sobre una placa de calefacción, (BOECO, Alemania), bajo agitación constante, donde se lo mantuvo por 5 min, aproximadamente, hasta obtener una solución gelatinosa (sol-gel) homogénea.

Luego, a la sol-gel se le añadió Hap (con granulometría de 37  $\mu\text{m}$ ) y nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) (con 99,9 % de pureza, Unicorn, India), donde la relación es de Hap/Ag 97:3 en porcentaje de masa. El matraz fue envuelto con papel de aluminio para evitar la exposición de la solución de Ag a la luz (Figura 4). La mezcla fue mantenida bajo agitación por 12 h más, bajo una temperatura, que varió entre 50-60°C, de forma a mantener el gel semilíquido.

Una vez alcanzado el tiempo deseado, la muestra fue filtrada empleando una bomba de vacío manual y papel de filtro cuantitativo con porosidad de 25  $\mu\text{m}$  (J. Prolab, Brasil), fue lavada con agua bidestilada para eliminar el residuo de  $\text{AgNO}_3$  y colocada en estufa a 100°C durante 24 h, para el secado.

Finalmente, la muestra seca fue sometida a un tratamiento térmico a 900°C en mufla (BABERTHERM B 180, Alemania), durante 2 h, con velocidad de calentamiento de 5°C/min; a fin de eliminar algún residuo o material orgánico remanentes del proceso de síntesis, además de proveer el ordenamiento cristalino del compuesto. Luego de la calcinación, las muestras fueron preparadas para su posterior caracterización por microscopio electrónico de barrido y espectroscopía de energía dispersiva (MEB/EDS), análisis de tamaños de partícula por PDI (Fiji/ImageJ), espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y difracción de rayos-X (DRX).



**Figura 4:** Montaje del sistema de obtención de la Hap/Ag<sub>2</sub> vía sol-gel.

## **2.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS**

Las muestras sintetizadas de la Hap/Ag vía molienda y sol-gel fueron caracterizadas para conocer sus propiedades estructurales y microestructurales, mediante las técnicas de: microscopía electrónica de barrido y energía dispersiva de rayos-X (MEB/EDS), espectroscopía infrarroja de transformado de Fourier (FTIR) y difracción de rayos-X (DRX).

### **2.3.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB/EDS)**

Para la caracterización de las muestras Hap/Ag\_1 vía molienda y Hap/Ag\_2 sol-gel con microscopio electrónico de barrido MEB, se utilizó el equipo TM 3.000 de Hitachi, EE.UU, perteneciente al Laboratorio de Ingeniería de Materiales del Departamento de Ingeniería Mecánica y Producción – DEMEP, Universidad Federal de São João del-Rei (UFSJ)- Brasil; operado a un voltaje de aceleración de 5 kV, para la obtención de las micrografías de superficie. Para obtener la composición química, fue aplicado voltaje de aceleración de 15 kV con magnificación máxima de 30 Kx y las imágenes fueron obtenidas por retrodispersión, con identificador de elementos automático (Microanalizador EDX Nano XFlash) y análisis semi cuantitativo usando el software Bruker Quantax 70, Alemania. Las muestras de Hap/Ag calcinadas fueron fijadas en porta muestra de aluminio por medio de cinta de carbono doble faz. También, se repitió algunos análisis con el equipo Zeiss Evo 15, Alemania, perteneciente al laboratorio de bio y materiales de la Facultad Politécnica de la Universidad Nacional de Asunción, con el propósito de mejorar la resolución de las imágenes para un mejor estudio.

Las imágenes fueron obtenidas con voltaje de 15 kV con mayor corriente, igual a 7 Kcps (Tasa de conteo de señal o conteo por s); el tiempo de lectura de cada imagen fue de 150 s y presentaba un área de 126 x 84  $\mu\text{m}^2$ , con el fin de estudiar la microestructura del material y su composición química.

Los microanálisis por EDS fueron realizados con el fin de observar y cuantificar los elementos constituyentes en una determinada región de la muestra. También, se realizó el mapeo de la distribución de Ag sobre la superficie de los compuestos Hap/Ag\_1 y Hap/Ag\_2 y los resultados se reportan en la sección correspondiente.

### 2.3.2. IDENTIFICACIÓN DE TAMAÑO DE PARTÍCULAS POR PDI

Para la identificación de tamaño de partículas por procesamiento digital de imágenes (PDI), se utilizó el programa *Fiji/ImageJ*, que es un paquete de procesamiento de imágenes de código abierto basado en ImageJ, utilizado en el ámbito de procesamiento digital de imágenes obtenidas por microscopia, tanto óptica como electrónica, desarrollado en el National Institute of Health (NIH), EE. UU por Wayne Rasband. Este programa puede medir distancias y ángulos entre píxeles, calcular áreas, crear histogramas de densidad y hacer transformaciones geométricas tales como escala, rotación y volteo, agrupa una serie de *plugins* instalados y organizados en un menú bien estructurado (*Fernández, 2018; De La Fuente et al., 2015; Hartig et al 2013; Ferreira et al., 2012*).

Con el SAI *Fiji/ImageJ* se realizó un análisis sobre las imágenes obtenidas por MEB de las muestras procesadas Hap/Ag\_1 y Hap/Ag\_2. Los análisis fueron realizados con el fin de detectar todas las partículas y cuantificar las variables: (1) el tamaño de las partículas, expresada en área que se calcula como  $A=\pi*r^2$ , calibradas en  $\mu\text{m}^2$  y en diámetro  $D= 2r$ , (2) los descriptores de forma: a) circularidad:  $4\pi * \frac{\text{Área}}{[\text{Perímetro}]^2}$ , indicando con un valor de 1 el círculo perfecto, mientras que con el valor 0 forma muy alargada, b) redondez o esfericidad (valores entre 0 y 1), índice obtenido entre el área y el eje longitudinal mayor de la partícula:  $4\pi * \frac{\text{Área}}{\pi*(\text{Eje Mayor})^2}$ , que es el inverso de la relación de aspecto, c) relación de aspecto (RA): (alto/ancho) de las partículas, (3) Desviación Estándar, que indica cuánto se desvían los datos en su distribución respecto de la media aritmética de dicha distribución, y (4) Solidez:  $\frac{\text{Área}}{\text{convexo Área}}$ , que indica el nivel de compactación o consistencia de la muestra analizada (*De La Fuente et al., 2015; Ferreira et al., 2012*).

A partir de los resultados, se realizó un análisis estadístico, con el objetivo de determinar, en cuál de los métodos se logró menor distribución de tamaño de partículas, a fin de determinar, en cuál método resultó más eficiente en el proceso de dopaje de plata y en la obtención de menor tamaño de partículas. Las imágenes utilizadas para este estudio corresponden a una magnificación de 15,0 Kx.

Para cuantificar los tamaños de partículas de las muestras Hap/Ag\_1 y Hap/Ag\_2, se consideraron los valores de los puntos que estuvieron mejor

individualizados y se promediaron, se realizaron los mismos procedimientos para la circularidad; en cambio para partículas aglomeradas se tomó un solo punto con el valor más alto de las mismas, con el objetivo de explicar este comportamiento.

### **2.3.3. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)**

Para la identificación de las bandas de adsorción y determinación de los grupos funcionales característicos, tanto de la Hap y Ag puras, como de la Hap dopada con Ag, se empleó el equipo Nicolet iS5, Thermo Fisher, EE. UU. Los datos fueron obtenidos en el rango de 4.000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , con 4  $\text{cm}^{-1}$  de resolución y 128 de barrido.

Para el análisis de las muestras se utilizó la técnica de pastillas con KBr (bromuro de potasio), donde 5 mg de cada muestra fue dispersado en 95 mg de KBr y compactada a 29,3 MPa por 30 s.

### **2.3.4. DIFRACCIÓN DE RAYOS-X (DRX)**

Los difractogramas de rayos-X de las muestras: Hap, Hap/Ag\_1 vía molienda y la Hap/Ag\_2 vía sol-gel, fueron obtenidos por medio de un equipo X'Pert<sup>3</sup> Powder, Holanda, con los siguientes parámetros: rango de medición entre 10 y 70° (2 $\theta$ ), tamaño de paso 0,02 (2 $\theta$ ), tiempo por paso 0,3 s, radiación  $\text{CuK}\alpha 1$  ( $\lambda = 1,54060$ ).

La identificación cuantitativa de las fases cristalinas presentes en las muestras se realizó mediante comparaciones con los patrones reportados en la base de datos ICDD (*Internacional Center for Diffraction Data*), con códigos de referencias: 00-009-0432 para la Hap y 00-004-0783 para la Ag.

Los valores de los picos de máximas intensidades de cada fase fueron utilizados para determinar el porcentaje de fase de Hap y Ag presentes en las muestras, aplicando la ecuación de RIR (por sus siglas en inglés Relative Intensity Ratio), la cual se presenta a continuación:

$$\text{Relative Intensity Ratio: } \text{RIR}_{\text{Ag}} = \frac{I_{\text{Ag}}}{I_{\text{Hap}} + I_{\text{Ag}}} \quad \text{Ecuación 1.}$$

En la cual:  $I_{\text{Ag}}$  y  $I_{\text{Hap}}$  corresponden a los picos de máximas intensidades de las fases Hap y la plata. El tamaño medio de cristalito de las muestras Hap/Ag obtenidas vía sol-gel y molienda, se evaluó utilizando la ecuación de Scherrer:

Ecuación de Scherrer:  $\beta = \frac{k \cdot \lambda}{FWHM \cdot \cos(\theta)}$

Ecuación 2

En la cual:

$\beta$  = es el tamaño promedio del cristal.

$k$  = el factor de forma del cristal o constante de Scherrer y su valor es 0,90.

$\lambda$  = es la longitud de onda de la radiación utilizada ( $\lambda_{Cu}$ ).

FWHM = es el ancho a la altura media del pico de difracción y  $\theta$  es la posición del pico de difracción.

El grado de cristalinidad se evaluó utilizando la siguiente ecuación:

Grado de cristalinidad:  $XC = \frac{A_C}{A_C + A_A} \cdot 100$

Ecuación 3

En la cual:  $A_C$  es el área cristalina bajo la curva y  $A_A$  es el área amorfa o jorobada debajo de la curva (*Erny et al., 2019*).



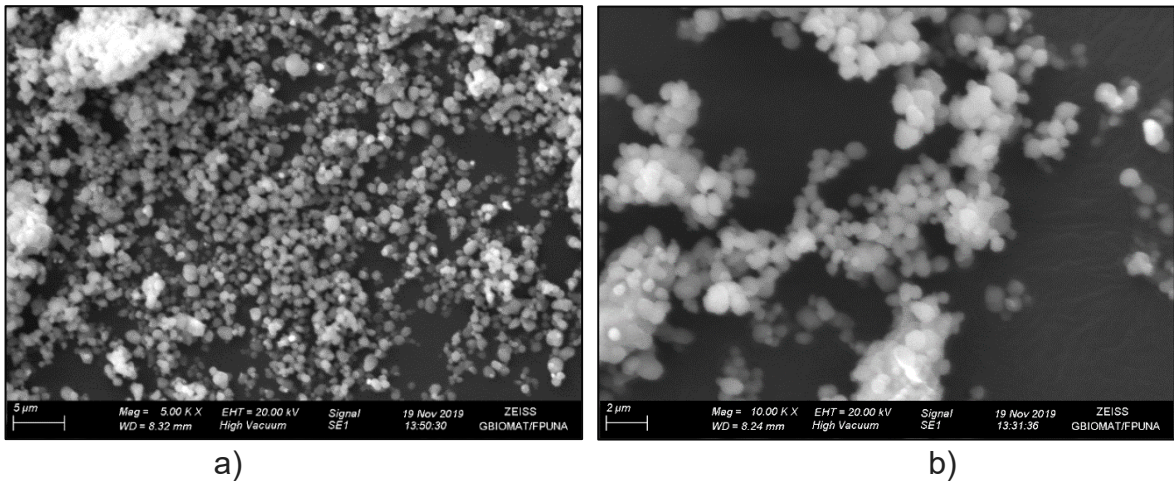
### CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSIONES

En este capítulo se presentan y se discuten los resultados experimentales obtenidos mediante las técnicas de: microscopia electrónica de barrido y energía dispersiva de rayos-X (MEB/EDS), espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) y difracción de rayos-X (DRX).

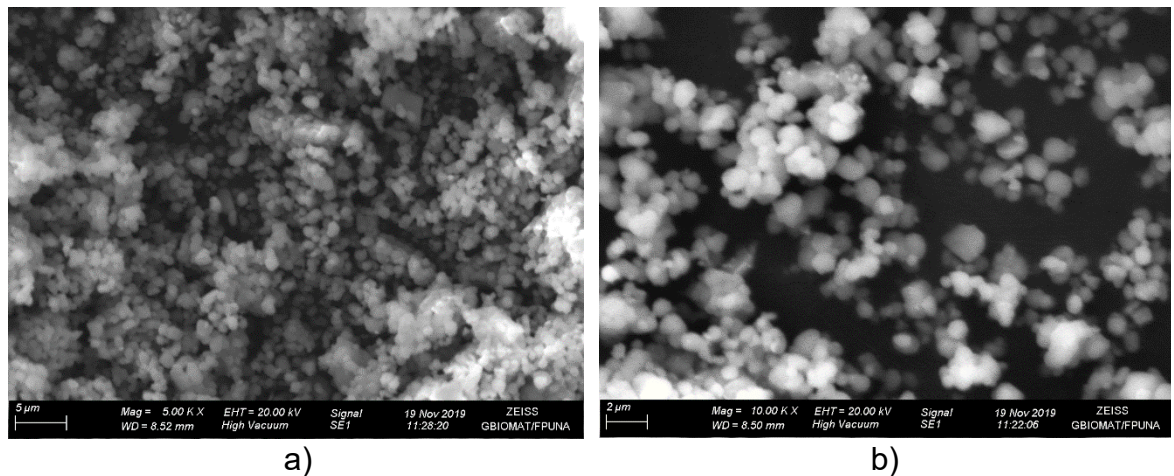
#### 3.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB/EDS)

La morfología y el tamaño de partículas de las muestras Hap/Ag\_1 y Hap/Ag\_2 se examinaron mediante análisis por MEB y las micrografías obtenidas se muestran en las Figuras 5 y 6, respectivamente. En los resultados fue posible observar que, ambos métodos de obtención produjeron partículas con forma semiesférica y con formación de aglomerados, principalmente entre las partículas de menor tamaño. Como la teoría sugiere que a menor tamaño de partícula más grande será la fuerza de atracción entre ellas, debido al aumento de la energía de superficie (*Alvarez, 2013*).

También se observó que el método vía molienda produjo partículas de tamaños más pequeño, Figura 6b. Estos resultados pueden ser corroborados con los obtenidos por procesamiento digital de imágenes a través del programa Fiji/ImageJ, en el ítem 3.2. La circularidad promedio de las partículas es de 0,484 para Hap/Ag\_1 y de 0,474 para Hap/Ag\_2, estos resultados demuestran que la Hap dopada con Ag posee forma semiesférica, considerando que los valores de circularidad oscilan entre 1 (círculo perfecto) y 0 (forma elongada) (*De La Fuente et al., 2015; Ferreira et al., 2012*). Existen diversas morfologías de la Hap dopada con Ag, como esféricas, varillas, agujas, alambres y esto está influenciado por los valores de pH y las temperaturas de reacción de la Hap con la Ag (*Wang, 2010*).



**Figura 5:** Micrografía observada con magnificación de (a) 5,0 Kx y (b) 10,0 Kx de la muestra Hap/Ag \_1 vía molienda.

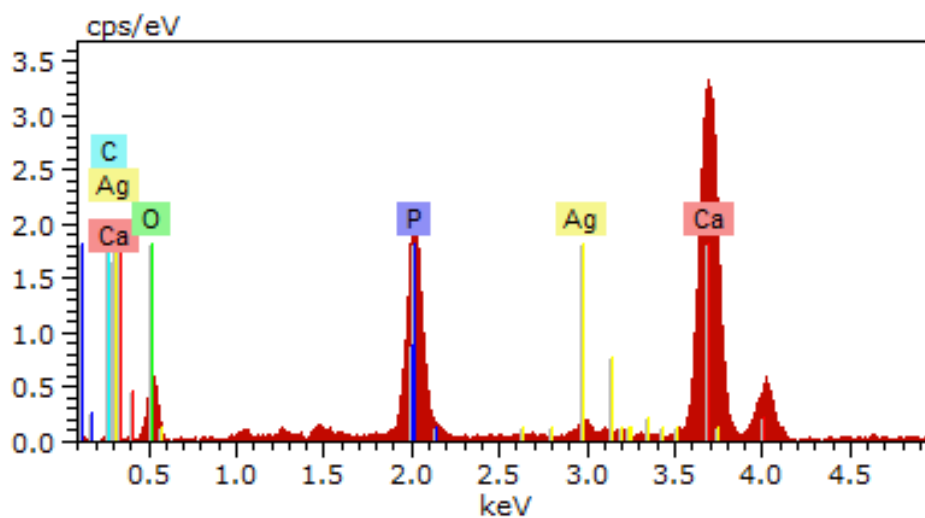


**Figura 6:** Micrografía observada con magnificación de (a) 5,0 Kx y (b) 10,0 Kx de la muestra Hap/Ag \_2 vía sol-gel.

De acuerdo con Saini (2019), al disminuir el tamaño de partícula, se incrementa la fuerza de interacción de Van der Waals entre las mismas, que tienden a atraerse entre sí y a aglomerarse reduciendo su reactividad química para alcanzar la estabilidad. Al disminuir el tamaño de partícula, la relación entre el área superficial/volumen se ve incrementada, lo que a la vez aumenta la proporción de átomos inestables en contacto directo con el medio, dicha inestabilidad, está directamente relacionada con la reactividad química de las partículas, o sea, los átomos situados en la superficie tienen mayor nivel energético y las fuerzas con que son atraídos por los átomos internos son débiles, en consecuencia, tienen mayor

potencial de reacción y capacidad de intercambiarse con otros átomos superficiales de otras partículas, con una alta velocidad de reacción y forman enlaces químicos más fuertes (Alvarez, 2013). Esta condición propicia que las reacciones ocurran a nivel de superficie y no de volumen. Esto también explica porqué la concentración de iones  $\text{Ag}^+$  es un poco superior en la muestra Hap/Ag\_1 sintetizada vía molienda, dado que se generó mayor sustitución de los iones  $\text{Ca}^{+2}$  por los iones de  $\text{Ag}^+$  (LLorentes, 2011).

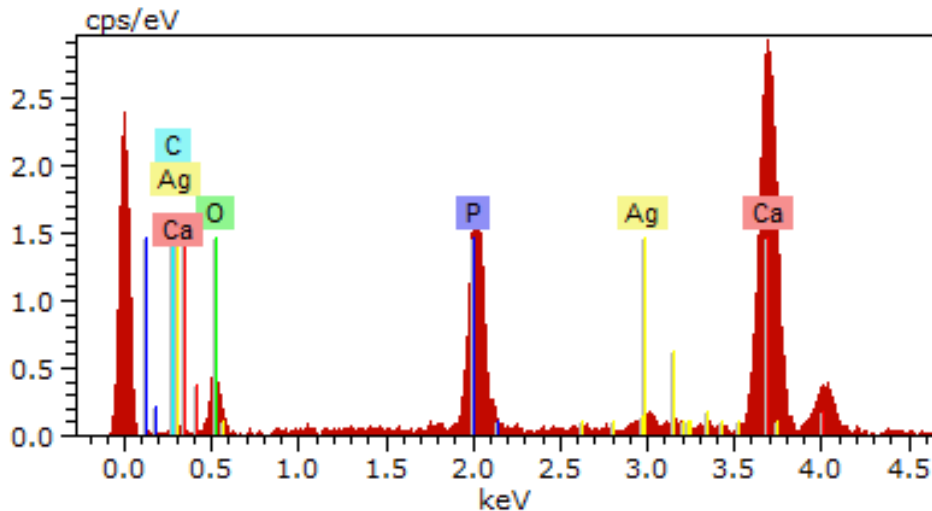
El microanálisis por espectroscopia de energía dispersiva de rayos-X (EDS), de tipo cualitativo reveló la composición química de las muestras Hap/Ag\_1 y Hap/Ag\_2, Figuras 7 y 8 y el porcentaje de cada uno de los elementos identificados se presentan en la tabla 4 y 5 respectivamente. Se observa que están compuestas de los elementos químicos: Calcio (Ca), Fósforo (P), Oxígeno ( $\text{O}_2$ ), Carbono (C) y Plata (Ag).



**Figura 7:** Espectros EDS de la muestra Hap/Ag\_1 vía molienda.

**Tabla 4:** Porcentajes de los analitos presentes en la muestra Hap/Ag\_1 vía molienda: (**AN**= Número atómico, **norm wt%** = Porcentaje de masa normal, **norm. at. %** = Porcentaje atómico normal).

Elemento	AN	[norm. wt. %]	[norm. at. %]	Error in %
Calcio	20	39,20	24,74	1,15
Oxígeno	8	32,82	51,89	6,14
Fósforo	15	23,26	18,99	0,88
Plata	47	2,97	0,70	0,11
Carbono	6	1,75	3,68	0,82
		100	100	



**Figura 8:** Espectros EDS de la muestra Hap/Ag\_2 vía sol-gel.

**Tabla 5:** Porcentajes de los analitos presentes en la muestra Hap/Ag\_2 vía sol-gel: (**AN**= Número atómico, **norm wt%** = Porcentaje de masa normal, **norm. at. %** = Porcentaje atómico normal).

Elemento	AN	[norm. wt. %]	[norm. at. %]	Error in %
Oxígeno	8	40,26	59,99	7,52
Calcio	20	38,34	22,81	1,15
Fósforo	15	16,64	12,81	0,65
Plata	47	2,87	0,63	0,11
Carbono	6	1,89	3,75	0,95
		100	100	

### **Análisis de la relación Ca/P.**

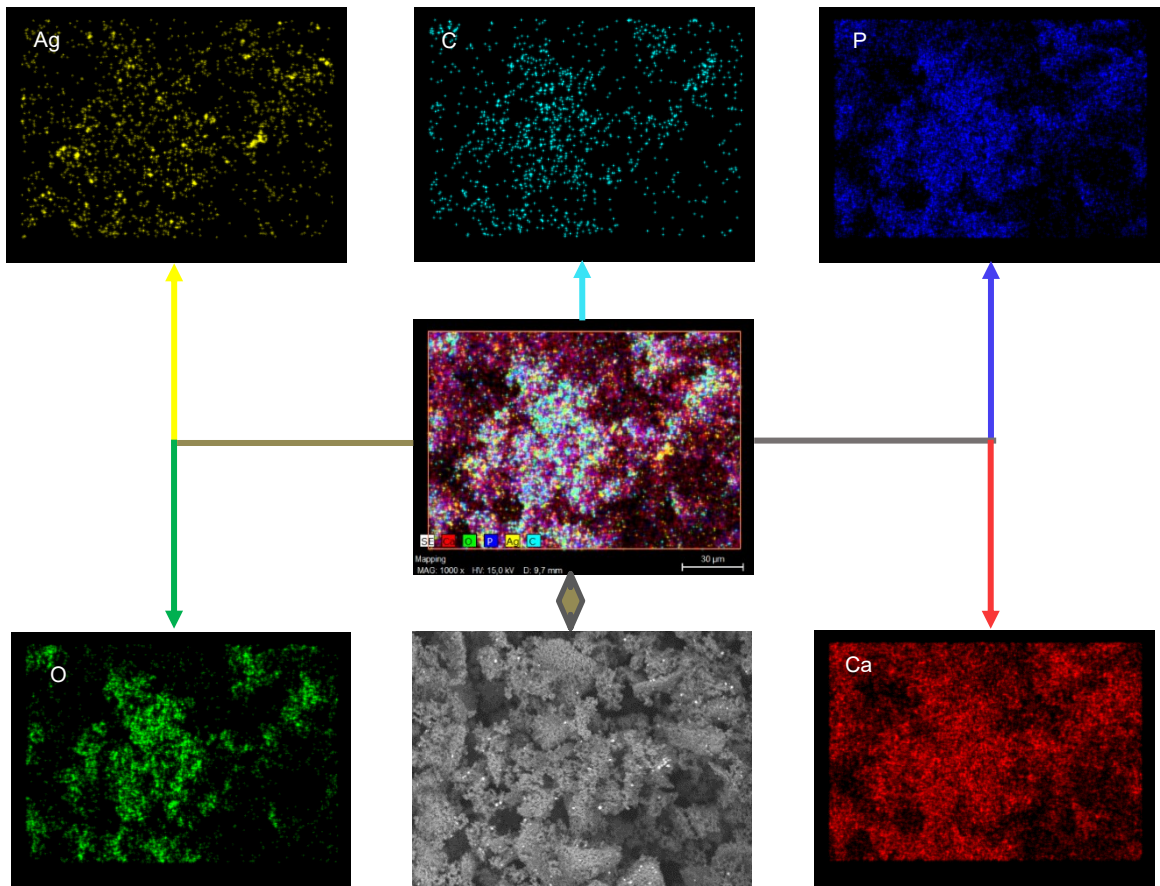
A partir de los espectros EDS, se cuantificó cada uno de los elementos químicos presentes en cada muestra, por el proceso vía molienda se obtuvo 2,97% de Ag (Tabla 4) y por el proceso vía sol-gel 2,87% de Ag (Tabla 5).

La relación molar Ca/P obtenida es de 1,69 vía molienda y de 2,3 para vía sol-gel (Tabla 6); estos valores, se encuentran en el rango de 1,4 y 2,0 que recomienda la literatura, siendo considerado el valor de 1,64 la relación ideal (Muñoz et al., 2012).

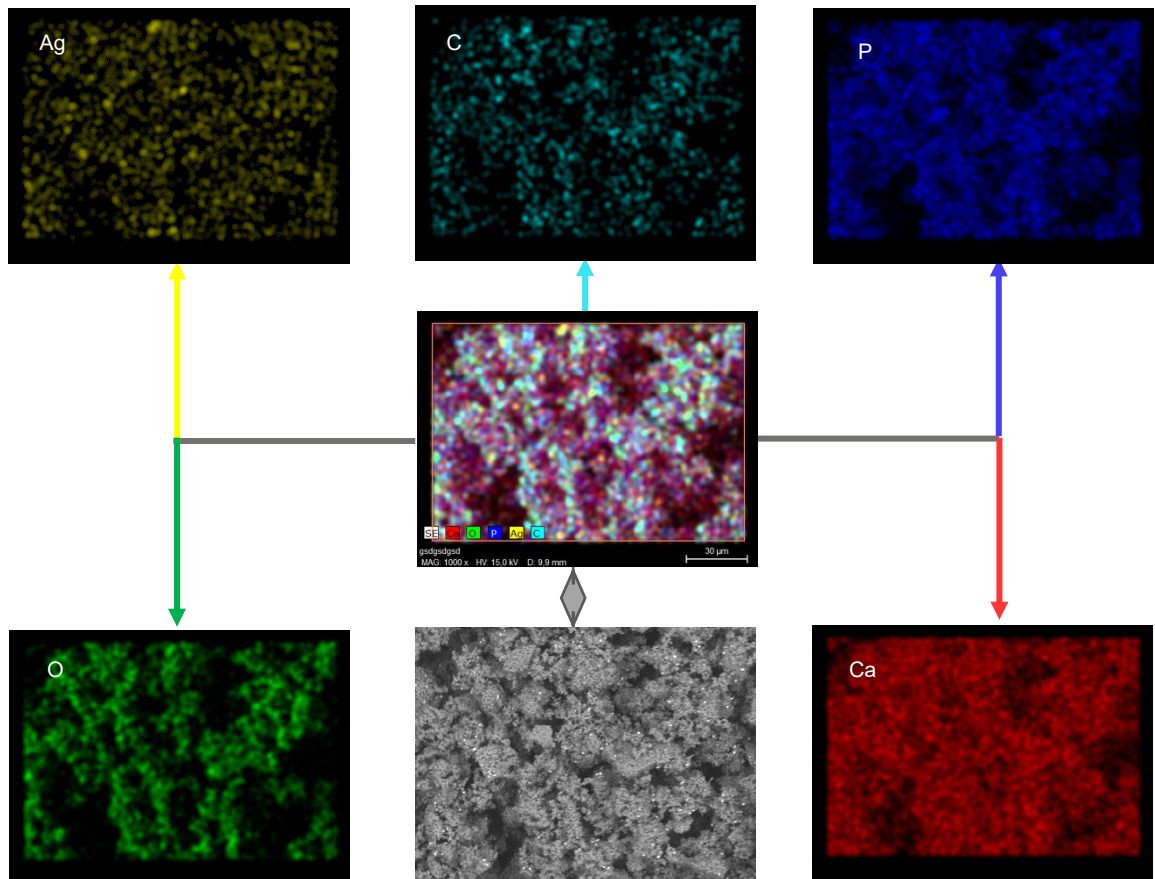
**Tabla 6:** Relación molar Ca/P de las muestras Ha/Ag sintetizadas vía gel y molienda y calcinada a 900°C, obtenidas vía análisis de EDS.

<b>Elementos Químicos</b>	<b>Hap/Ag_1 vía molienda</b>	<b>Hap/Ag_2 vía sol-gel</b>
Calcio (Ca)	39,20	38,34
Fósforo	23,26	16,64
Plata (Ag)	2,97	2,86
Ca/P	1,69	2,30

En las figuras 9 y 10 se puede observar el mapa de distribución de los elementos químicos: Ca, P, O<sub>2</sub> y C, además se puede visualizar regiones con dispersiones homogéneas de Ag, principalmente, en la muestra Hap/Ag\_1 (Figura 9), lo que también, puede estar relacionado con el tamaño de partículas y aglomerados obtenidos: 0,517 y 18,1  $\mu\text{m}^2$  (D=0,81 y 4,80  $\mu\text{m}$ ) para Hap/Ag\_1 (Figuras 11 y 13); 0,708  $\mu\text{m}^2$  y 8,6  $\mu\text{m}^2$  (D=0,95 y 3,30  $\mu\text{m}$ ) para Hap/Ag\_2 (Figuras 12 y 14), respectivamente, resumida en la Tabla 7.



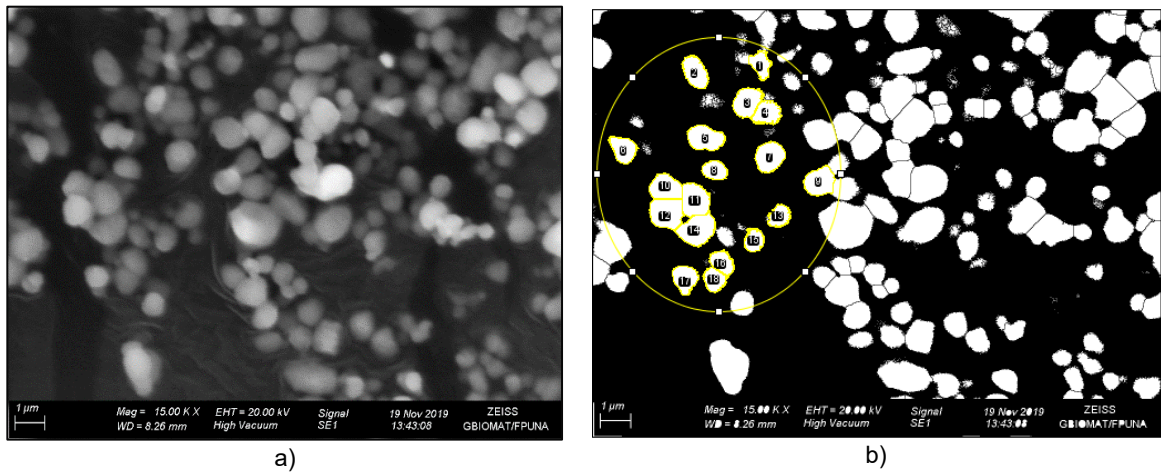
**Figura 9:** Mapeamiento de la distribución de elementos químicos en la muestra Hap/Ag\_1 vía molienda, donde se observa en las imágenes los analitos presentes: Carbono (en turquesa), Oxígeno (en verde), Calcio (en rojo), Fósforo (en azul) y Plata (en amarillo). En el centro inferior, en gris, la imagen real obtenida por MEB/EDS.



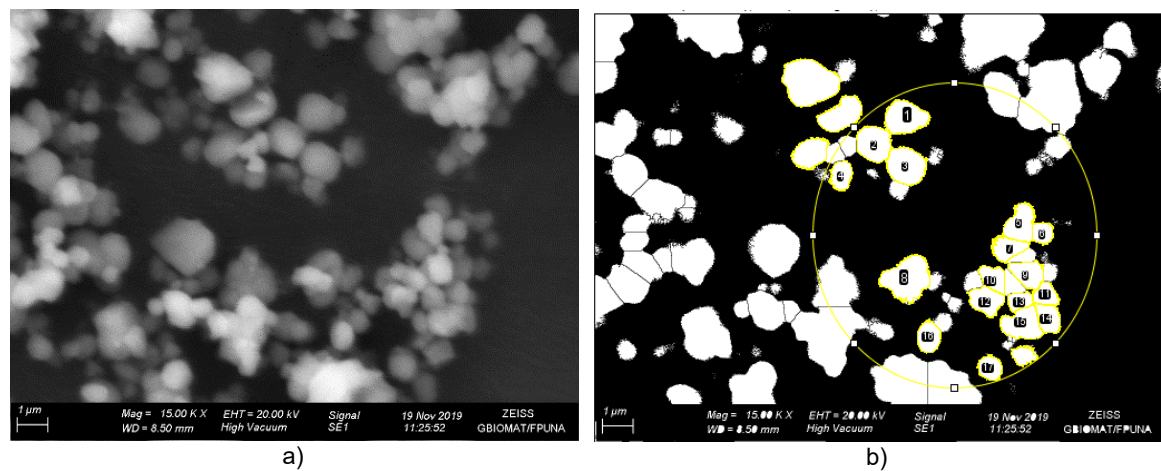
**Figura 10:** Mapeamiento de la distribución de elementos químicos en la muestra Hap/Ag\_2 vía sol-gel, donde se observan en las imágenes los analitos presentes: Carbono (en turquesa), Oxígeno (en verde), Calcio (en rojo), Fósforo (en azul) y Plata (en amarillo). En el centro inferior, en gris, la imagen real obtenida por MEB/EDS.

### 3.2 DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA POR PDI

El conteo de las partículas fue realizado de manera automática, a partir de regiones consideradas más adecuadas, de igual manera sobre los aglomerados y se logró la identificación del tamaño y la circularidad de las partículas como unidades individualizadas. En la Tabla 7 se encuentran los valores promedios obtenidos para cada síntesis: vía molienda (Hap/Ag\_1) y vía sol-gel (Hap/Ag\_2), respectivamente.

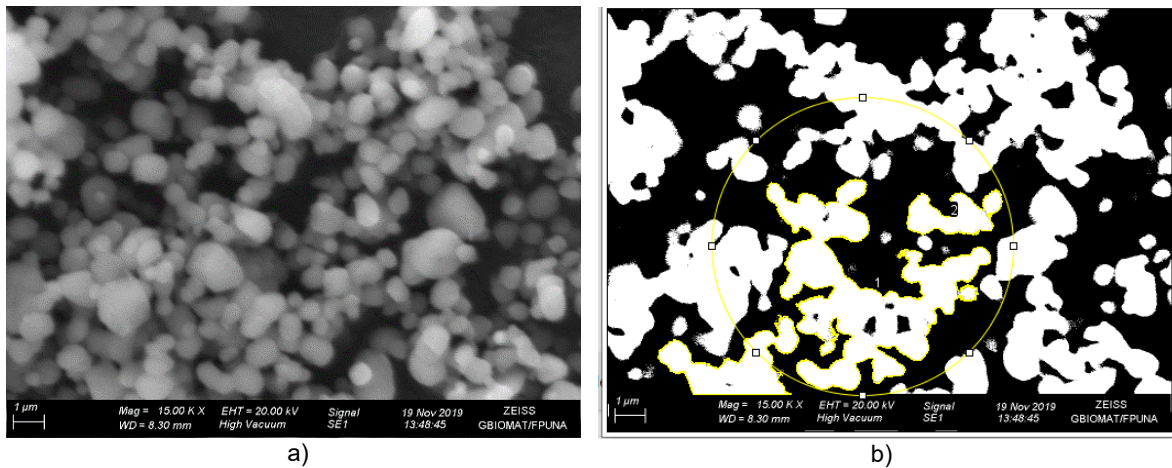


**Figura 11:** Mapeamiento obtenido con el SAI Fiji/ImageJ para determinación de tamaños de partículas de la muestra Hap/Ag\_1. a) micrografías analizadas corresponden a una magnificación de 15,00 Kx y b) región mapeada.

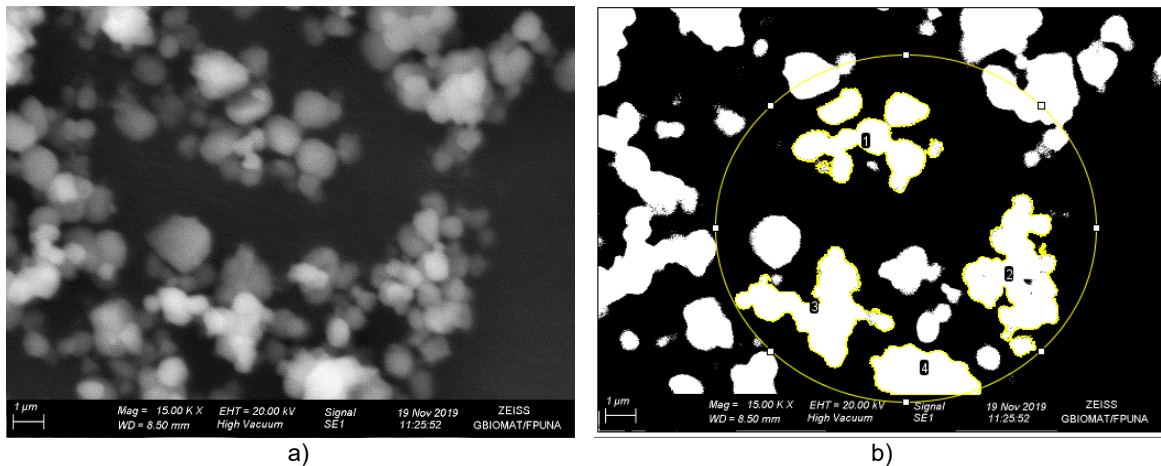


**Figura 12:** Mapeamiento obtenido con el SAI Fiji/ImageJ para determinación de tamaños de partículas de la muestra Hap/Ag\_2. a) micrografías analizadas corresponden a una magnificación de 15,00 Kx y b) región mapeada.





**Figura 13:** Mapeamiento obtenido con el SAI Fiji/ImageJ para determinación de tamaños de aglomerados de la muestra Hap/Ag\_1 (a) micrográficas analizadas corresponden a una magnificación de 15,00 Kx y b) región mapeada.



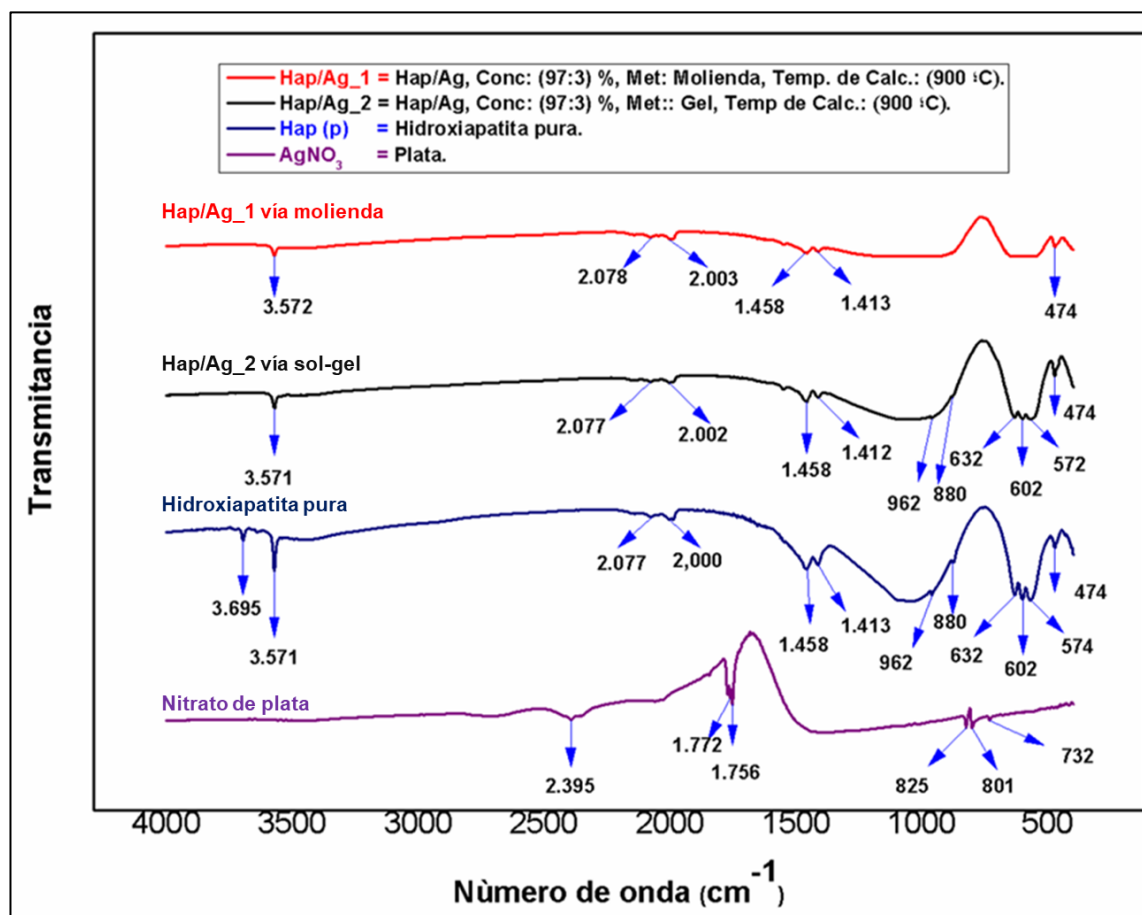
**Figura 14:** Mapeamiento a obtenido con el SAI Fiji/ImageJ, de la muestra Hap/Ag\_2 para determinación de tamaños de aglomerados a) micrográficas analizadas corresponden a una magnificación de 15,00 Kx y b) región mapeada.

**Tabla 7:** Resultados de cuantificación automática de tamaños de partículas y de circularidad, obtenidos por el SAI Fiji/ImageJ de las muestras de Hap/Ag\_1 vía molienda y Hap/Ag\_2 vía sol-gel.

VARIABLES ANALIZADAS	Hap/Ag_1 vía molienda	Hap/Ag_2 vía sol-gel
Conteo total de partículas (unidades)	18	17
Tamaño promedio en área ( $\mu\text{m}^2$ )	0,517	0,708
Tamaño promedio en área diámetro ( $\mu\text{m}$ )	0,81	0,95
Índice de redondez promedio	0,76	0,76
Índice de solidez	0,898	0,897
Tamaño medio de aglomerados en área ( $\mu\text{m}^2$ )	2,7 $\approx$ 18,1	4,5 $\approx$ 8,6
Tamaño promedio de aglomerados en diámetro ( $\mu\text{m}$ )	1,85 $\approx$ 4,80	2,40 $\approx$ 3,30
Índice de circularidad media	0,484	0,474

### 3.3. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).

La Figura 15 muestra los espectros FTIR de la Hap, Hap/Ag\_1, Hap/Ag\_2 y Ag, donde se observan bandas correspondientes a varios modos vibratorios originados por grupos funcionales, en los cuales se identifican las bandas de vibración ( $\text{PO}_4^{3-}$  y  $\text{OH}^-$ ) característicos de la Hap.



**Figura 15:** Espectros FTIR de las muestras indicadas en la imagen.

En los espectros FTIR de Hap a  $3695 \text{ cm}^{-1}$  se observa una banda que se atribuye al  $\text{OH}^-$  y está directamente relacionado con la presencia de agua absorbida por la humedad del ambiente (*Huang et al., 2016*). Esta banda no fue observada en las muestras Hap/Ag\_1 y Hap/Ag\_2.

Las bandas a alrededor de  $3571\text{-}3572$  y  $632 \text{ cm}^{-1}$  se observaron en todas las muestras, corresponden al modo de estiramiento y flexión del grupo  $\text{OH}^-$

característicos de la Hap, como reportado anteriormente por *Yuan et al., 2018; Fakharzadeh et al., 2017 y Siek et al., 2017*.

Se puede observar que la intensidad de las bandas alrededor de 632 y 3571  $\text{cm}^{-1}$  disminuye para las muestras Hap/Ag\_1 y Hap/Ag\_2, lo que indica que la estructura molecular de la Hap sufre un cambio estructural al doparlo con Ag, hecho que se atribuye a los cambios en los parámetros de la red, cuando un radio iónico menor de  $\text{Ca}^{2+}$  (0,99 Å) se sustituye por un radio iónico mayor de  $\text{Ag}^+$  (1,28 Å) en la red de la Hap, lo que provoca tensión en la estructura cristalina (*Riaz et al., 2018; Fakharzadeh et al., 2017*).

La banda a 962  $\text{cm}^{-1}$  se atribuye al estiramiento simétrico ( $\nu_1$ ) del enlace P-O para la Hap (*Wang et al., 2018; Siek et al., 2017 y Huang et al., 2016*), se observa una disminución en intensidad de esta banda para la Hap/Ag\_2 y desaparece para la Hap/Ag\_1. Las bandas de flexión ( $\nu_2$ ) alrededor de 602, 572 y 474  $\text{cm}^{-1}$ , se atribuyen al enlace O-P-O del  $\text{PO}_4^{3-}$  para la Hap (*Yuan et al., 2018; Siek et al., 2017 y Fakharzadeh et al., 2017*); donde también se observan los mismos efectos, una disminución en intensidad de las bandas para la Hap/Ag\_2 y la desaparición de las bandas a 602 y 572  $\text{cm}^{-1}$  para la Hap/Ag\_1, indicando cambios en la estructura molecular de la Hap al doparlo con Ag. Estos cambios se deben a las diferencias en el radio iónico de iones  $\text{Ag}^+$  e iones de  $\text{Ca}^{2+}$ . (*Riaz et al., 2018; Kaygili et al., 2014*).

Las bandas de baja intensidad alrededor de 880, 1413 y 1458  $\text{cm}^{-1}$  para las muestras Hap y Hap/Ag\_1 y de 1413 y 1458  $\text{cm}^{-1}$  para la muestra Hap/Ag\_2 corresponden al ion  $\text{CO}_3^{2-}$ , la posición de estas bandas indica la sustitución de  $\text{PO}_4^{3-}$  con grupos  $\text{CO}_3^{2-}$  (*Rameshbabu et al., 2007*). Por otro lado, la sustitución del ion  $\text{PO}_4^{3-}$  con iones  $\text{CO}_3^{2-}$  a 880  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a la formación de la Hap de tipo B, relacionado al estado de vibración por flexión fuera del plano  $\nu_2$  (*Meejoo et al., 2006; Fakharzadeh et al., 2017*).

La sustitución de los iones fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) por iones carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) tienden a incrementar la relación Ca/P. Cabe mencionar que, el  $\text{CO}_3^{2-}$  puede sustituir dos sitios en la estructura de la Hap: (a) el sitio de  $\text{OH}^-$  denominada sustitución directa del tipo A:  $\text{CO}_3^{2-} \leftrightarrow 2 \text{OH}^-$  y (b) el sitio de  $\text{PO}_4^{3-}$  considerada una sustitución de tipo B (*Donglu, 2006*).

En la Tabla 8 se muestran las bandas características de los grupos funcionales, presentes en la Hap, reportados en la bibliografía, la que se evalúan los espectros FTIR mostrados en la Figura 15, utilizada como referencia para identificar las fases presentes en las muestras.

**Tabla 8:** Diferentes bandas originadas por grupos funcionales, analizadas por distintos autores.

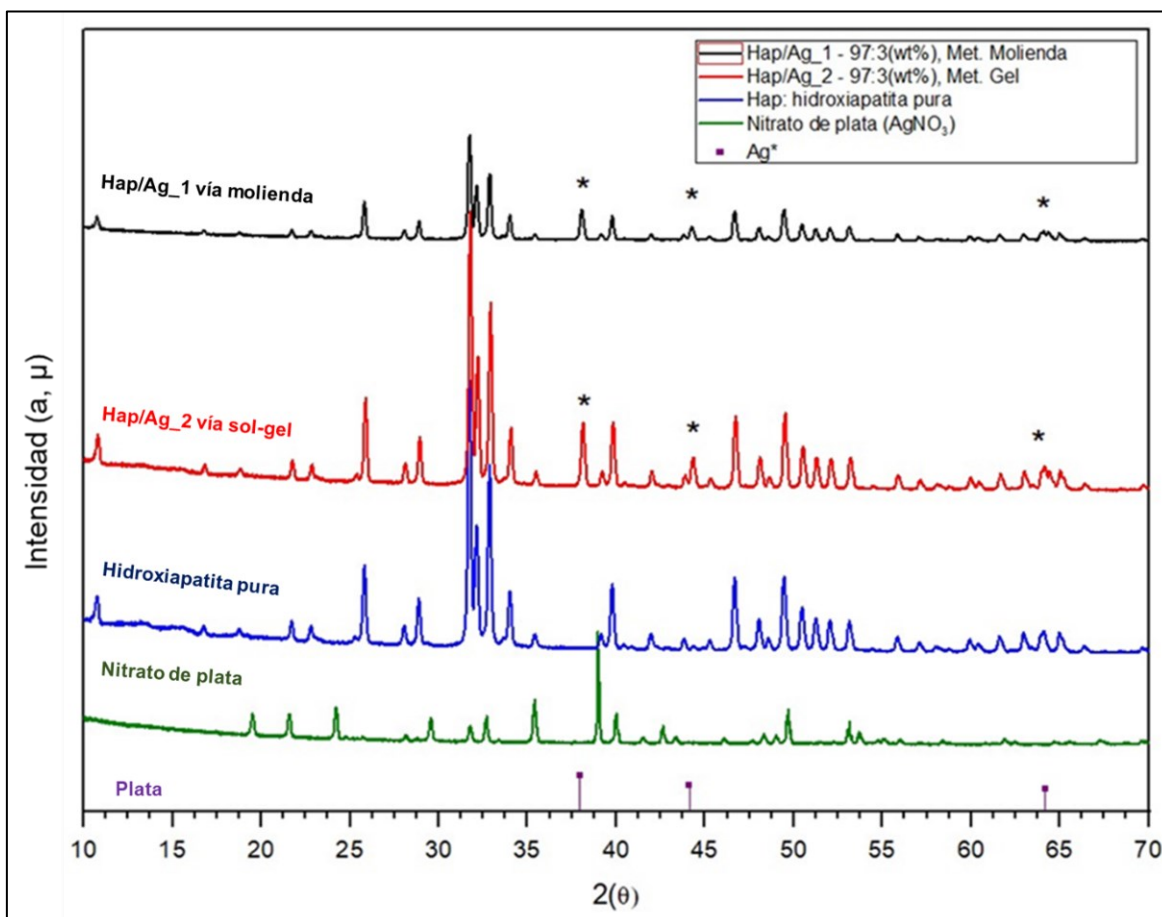
Grupo	Banda (cm <sup>-1</sup> )				Referencia	Observaciones
	Hap	Hap/Ag (97:3) % sol-gel.	Hap/Ag (97:3) % molienda	Bandas	Autores	
H <sub>2</sub> O	3695	-	-	3700	Huang et al., 2016	Corresponden al agua absorbida.
OH <sup>-</sup>	3571	3.571	3572	3570 3572 3568 3572 3569 3572 3572	Yuan et al., 2018 Siek et al., 2017 Fakharzadeh et al., 2017 Huang et al., 2016 Majid et al., 2016 Rajendran et al., 2014. Akhavan et al., 2014	Alargamiento de OH <sup>-</sup>
C=O				1759	Yuan et al., 2018	Vibraciones de C=O
CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	1458	1.458	1458	1458 1460 1451 1457 1457 1450	Fakharzadeh et al., 2017 Majid. M et al., 2016 Huang et al., 2016 Akhavan et al., 2014 Rameshbabu et al., 2007 Meejoo et al., 2006	Estiramiento asimétrico del CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> . Sustitución de ion fosfato (PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ), se forma Hap de tipo B
CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	1413	1.412	1413	1400 1416	Yuan et al., 2018 Akhavan et al., 2014	Vibraciones de CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	962	962		962 963 963 960 962 962	Wang et al., 2018 Siek et al., 2017 Majid .M et al., 2016 Huang et al., 2016 Rajendran et al., 2014 Akhavan et al., 2014	Estiramiento simétrico (ν <sub>1</sub> ) del enlace P – O

**Tabla 8:** Diferentes bandas originadas por grupos funcionales, analizadas por distintos autores (continuación).

Grupo	Banda (cm <sup>-1</sup> )			Bandas	Referencia Autores	Observaciones
	Hap	Hap/Ag (97:3) % sol-gel.	Hap/Ag (97:3) % molienda			
<b>CO<sub>3</sub><sup>2-</sup></b>	880	880		876 877 870 875 875 873	Fakharzadeh et al., 2017 Huang et al., 2016 Majid .M et al., 2016 Akhavan et al., 2014 Rameshbabu et al., 2007 Meejoo et al., 2.006	Flexión fuera del plano del CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> (v <sub>2</sub> ). Sustitución del ion fosfato (PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ), se forma Hap de tipo B.
<b>OH<sup>-</sup></b>	632	632	-	630 633 630 631 631 630	Yuan et al., 2018 Siek et al., 2017 Fakharzadeh et al., 2017 Majid .M et al., 2016 Huang et al., 2016 Rajendran et al., 2014	Flexión OH <sup>-</sup> Los iones OH <sup>-</sup> prueban la presencia de Hap.
<b>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup></b>	602, 570 ,474	602, 572 474	474	603, 565, 474 602, 572  602, 568, 473 565, 601 600, 562 473, 602	Yuan et al., 2018  Siek et al., 2017  Fakharzadeh et al., 2017  Majid .M et al., 2016 Huang et al., 2016 Akhavan et al., 2014	Flexión de O-P-O, (v <sub>2</sub> ).

### 3.4. DIFRACCIÓN DE RAYOS-X (DRX)

La Figura 16 muestra los difractogramas de rayos-X de las muestras: Hap, Hap/Ag\_1, Hap/Ag\_2 y Ag, correspondientes a la muestra pura y a las muestras sintetizadas por los métodos vía molienda y sol-gel, respectivamente.



**Figura 16:** Difractogramas de rayos-X de las muestras Hap/Ag\_1 vía molienda, Hap/Ag\_2 vía sol-gel, Hap y Ag.

Al comparar las posiciones e intensidades de los picos, se observó la presencia de Hap en ambas muestras Hap/Ag\_1 y Hap/Ag\_2, de acuerdo al patrón de difracción de la Hidroxiapatita sintética (Ficha-PDF) N° 00-009-0432 de la base de datos ICDD.

La Hap exhibe los picos de difracción a  $2\theta = 25,30 - 31,74 - 32,14 - 32,88 - 34,08 - 46,71$  y  $49,46^\circ$ , que corresponden a los planos (002), (211), (112), (300), (202), (222) y (213), respectivamente. El pico máximo a  $31,74^\circ$  correspondiente al

plano (211) es considerado el pico característico de la Hap (Yuan et al., 2018; Riaz et al., 2018).

Se identificó la presencia de una nueva fase para las muestras Hap/Ag\_1 y Hap/Ag\_2, a unos picos de difracción alrededor de 38°, 44° y 64°, al ser comparadas con los picos de difracción de la Hap, estos picos de difracción coinciden con los tres picos más intenso de Ag, según base de datos ICDD N° 00-004-0783, y Database (AtomWork) (Ver anexo 1), y no se observó existencia de impurezas en las muestras, valores similares de 38° y 38,1° correspondientes al ion de Ag fueron encontrados respectivamente por Yuan et al., 2018, Wang et al., 2018 y Siek et al., 2017. Esto indica que la nueva fase corresponde al ion de Ag<sup>+</sup> y que algunos iones Ag<sup>+</sup> han reemplazado a los iones Ca<sup>2+</sup> entrando en la red de la estructura molecular de la Hap pura en lugar de formar impurezas como (AgO, Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>).

Al comparar las intensidades de los picos correspondientes al ion de Ag en las muestras Hap/Ag\_1 y Hap/Ag\_2, se pudo observar una pequeña variación en las intensidades de los picos, la Hap/Ag\_1 presenta pico más achatado en comparación con la Hap/Ag\_2, que exhibe un pico más intenso, de la misma se puede decir que a medida que aumenta la relación (Ag/Ca), (0,090 para Hap/Ag\_1 y 0,086 para Hap/Ag\_2), se observa una disminución en la intensidad de los picos.

Al aumentar la relación Ag/Ca para las muestras Hap/Ag\_1 y Hap/Ag\_2 y al comparar con los picos de la Hap, se puede notar que las intensidades de todos los picos de la Hap disminuyeron, especialmente las de los planos (002), (211), (112) y (300), esto probablemente debido a la sustitución de los iones Ca<sup>2+</sup> de la Hap por iones de Ag<sup>+</sup>, donde el radio iónico de la Ag ( $R_{Ag^+} = 1,28 \text{ \AA}$ ) es ligeramente mayor que el radio iónico del Ca<sup>2+</sup> ( $R_{Ca^{2+}} = 0,99 \text{ \AA}$ ), lo que causa pequeñas distorsiones e imperfecciones de la red al producirse el intercambio iónico, disminución del tamaño de los cristalitos y cristalinidad, estas hipótesis concuerdan con lo reportado por Fakharzadeh et al., 2017 y Yuan et al., 2018, pero difiere con lo reportado por Riaz et al., 2018, donde menciona el aumento de la intensidad de los picos y el tamaño del cristal al aumentar la relación Ag/Ca dentro de la estructura de la Hap.

La cristalinidad de las muestras Hap/Ag\_1, Hap/Ag\_2 y Hap, se calculó utilizando la ecuación 3. Se utilizó el software OriginPro8 2020 para determinar el área cristalina y amorfa, seleccionada bajo la curva de difracción de cada muestra,



(Figura 16). Los picos fueron seleccionados en función de su valor de mayor intensidad, posicionados en el rango de 20° a 40°, se observó que el porcentaje de cristalinidad fue mayor para la Hap/Ag con 68% en comparación con la Hap/Ag\_1 que fue de 58% y Hap/Ag\_2 de 63% (Tabla 9), podemos decir que la diferencia de cristalinidad entre la muestra Hap/Ag\_2 y la Hap fue mínima. Esto, puede estar asociado a la concentración de Ag reaccionada con la Hap, que fue menor para esta muestra, lo que ocasionó una menor deformación en la estructura cristalina de la Hap precursora.

**Tabla 9:** Identificación y Cuantificación de fase.

Muestra	Porcentaje de fase (%)	Cristalinidad (%)	Tamaño de cristalito (nm)
			Scherrer
Hap/Ag_1 vía molienda	Hap= 76,4 Ag= 23,6	58	0,9476
Hap/Ag_2 vía sol-gel	Hap= 79,9 Ag= 20,1	63	0,9405
Hap	100	68	1,3928
AgNO <sub>3</sub>	100	68	-

## CAPITULO IV: CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos a partir de los análisis de las muestras Hap/Ag vía molienda y sol-gel, nos permitieron llegar a las siguientes conclusiones:

- Los dos métodos de síntesis aplicados: molienda y sol-gel, lograron el dopaje exitoso de Hap con Ag (Hap/Ag). Los resultados de caracterización (MEB/EDS, FTIR y DRX) demostraron que algunos iones de  $\text{Ca}^{2+}$  fueron reemplazados por iones de  $\text{Ag}^+$  en la red cristalina de la Hap.
- Las muestras Hap/Ag\_1 y Hap/Ag\_2 obtenidas fueron de morfología semiesférica, lo que puede promover una mejor funcionalidad que partículas irregulares, debido a que son más eficientes para rellenar los espacios.
- Mediante el análisis EDS se comprobó que la eficiencia del dopaje es muy similar en las dos síntesis, teniendo en cuenta que las muestras (Hap/Ag) fueron preparadas con una relación de 97/3 en porcentaje de masa y se verificó 2,97% de Ag para la Hap/Ag\_1 vía molienda (eficiencia 99%) y de 2,87% de Ag para la Hap/Ag\_2 vía sol-gel (eficiencia 96%).
  - Los resultados del análisis por FTIR muestran una disminución de las bandas de vibración del ion fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), según aumenta la concentración de los iones  $\text{Ag}^+$  y que las distorsiones de red generadas provocaron tensiones en la estructura cristalina de la Hap, lo que también comprueba la existencia en cambios microestructurales.

Luego de todo lo estudiado y comprobado, podemos afirmar que ambas metodologías son promisoras para la obtención de hidroxiapatita natural con plata. Además de ser un compuesto estable y sin presencia de impurezas, se cree que pueda ser una alternativa más económica, comparando con la hidroxiapatita sintética dopada con plata.

## **PERSPECTIVAS**

Se han mencionado las propiedades bactericidas de la Ag y la eficacia de la Hap pura para la remediación medioambiental como captador de algunos metales pesados, sin embargo, en el presente trabajo no se han realizado pruebas de la Hap dopada con Ag como captador de metales pesados en presencia de bacterias, en este sentido es conveniente realizar dichas pruebas, de modo a comprobar dicha capacidad.

Si se enfoca el uso de la Hap dopada con Ag como captador de metales pesados con propiedades anti bactericidas, la característica clave que debe abordarse es la tasa de liberación de iones de Ag al ambiente, se deben evitar dos extremos: La baja concentración y la alta concentración de iones  $\text{Ag}^+$ . Pues, la baja concentración de iones  $\text{Ag}^+$ , no será suficiente para un eficaz efecto anti bactericida y una alta concentración puede resultar en la liberación de la plata en exceso.

## **APORTE DE LA TESIS**

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, generaron nuevos conocimientos útiles en el área de biomateriales, permitiendo el desarrollo de dos metodologías eficientes para obtener Hidroxiapatita dopada con plata con morfología semiesférica, usando las técnicas de molienda y sol-gel. Es importante resaltar, que con esto se espera estar atribuyendo de propiedades bactericidas, la hidroxiapatita al ser dopada con plata, con posibilidad de aplicación en la remediación medioambiental de agua residual contaminada por metales pesados y microorganismos patógenos, ya que la hidroxiapatita es un eficiente captador de algunos metales pesados y el ion  $\text{Ag}^+$  es un potente bactericida.

## REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- [1] Álvarez, L.C. (2013). La revolución nanotecnológica en el siglo XXI. Aplicaciones de la Industria de la Construcción Túneles.
- [2] Arias, F.M; M. Boutinguiza, J. Del Val, C. Covarrubias (2020). Copper nanoparticles obtained by laser ablation in liquids as bactericidal agent for dental applications. *Aplicado Surface Sciencia* 507 (2020) 145032.
- [3] Baker, C; Pradhan, A; Pakstis, L. (2005). Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol* 5 (2), 244–249.
- [4] Balamurugan A; Balossier G; D Laurent, M. (2008). An in vitro biological and anti-bacterial study on a sol–gel derived silver-incorporated bioglass system, *Dental Materials*.
- [5] Barberá. M; Sonia Torres de Flores. (2014). Absorción de Pb (II) en soluciones acuosas sobre hidroxiapatita de calcio sintética. Estudio cinético y termodinámico del proceso de sorción. *Energías Renovables y Medio Ambiente* Vol. 33, pp. 15 - 24, Impreso en la Argentina ISSN 0328-932X.
- [6] Bohner, M; Eur Cell Mater. (2010). Design of ceramic-based cements and putties for bone graft substitution, *Eur. Cell. Mater.* 20 (2010) 1–12.
- [7] Bosco. R; M. Lafisco; A Tampieri. (2015). Hydroxyapatite nanocrystals functionalized with alendronate as bioactive components for bone implant coatings to decrease osteoclastic activity, *Appl. Surf. Sci.* 516–524.
- [8] Caballero. N; Magna. M. (2019). Kinetic Analysis of Lead Removal by Natural Hydroxyapatite from Aqueous Solution in High Concentration. *Materials Research*.
- [9] Castellano, J.J; Shafii, S.M; Ko, F; Donate, G (2007) Comparative evaluation of silver-containing antimicrobial dressings and drugs. *Int Wound J* 4, 14–22.
- [10] Chacon. Mendoza, J.H. (2010). Uso de la tecnología de membranas en la clarificación de vinos. *Tecnología de Membranas*. Universidad del Valle – Colombia.
- [11] Coreño A; J. M. Mújica C; D Hernández. (2010). Evaluación de hidroxiapatita nanoparticulada como material adsorbente de iones flúor, plomo y arsénico en soluciones acuosas. *Superficies y vacío*, vol. 23, pp. 161-165. Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología de Superficies y Materiales.
- [12] Concon, J.M. (2009). Heavy metals in food. In: *Food Toxicology, Part B: Contaminants and Additives*. New York, Dekker, 3(4) p.1043-1045.

- [13] Constantino. L, C.A; García. P, F. (2005). Chemical fractionation of boron and heavy metals in soils irrigated with wastewater in central Mexico. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 108: 57–71.
- [14] Cremet; Corvec, P. (2012). Orthopaedic-implant infections by *Escherichia coli*: molecular and phenotypic analysis of the causative strains, *J. Infect.* 64 (2012) 169-175.
- [15] De La Fuente, G.A; Sergio D. Vera. (2015). Using image analysis software (IAS) for the technological characterization of archaeological ceramics: scope, limitations and perspectives. *Chungará (Arica)* Vol.47, N°.2, Pag. 257-265. *Revistas de Antropología chilena*.
- [16] Dibrov. P; J. Dzioba, KK Gosink. (2002). Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag<sup>+</sup> in *Vibrio cholera*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 46 (2002) 2668–2670.
- [17] Donglu. S. (2006). *Introduction to biomaterials*. World Scientific Publishing, p. 253.
- [18] Dorozhkin, S.V. (2012). Biphasic, triphasic and multiphasic calcium orthophosphates. *Acta Biomaterialia*, 8, 963-977.
- [19] Fakharzadeh A; Reza Ebrahimi, K; Bahman, N. T. (2017). Effect of dopant loading on the structural features of silver-doped hydroxyapatite obtained by mechanochemical method. *Ceramics International*, Volume 43, Pages 12588-12598.
- [20] Franco Londoño, L.F; Londoño Muñoz, P.T. (2016). Risk of heavy in human and animal health. (14) 145-153.
- [21] Ferreira, T; Rasband, W. (2012). *ImageJ. User Guide*.
- [22] Fernández, V.M (2018). *Análisis de Imágenes de Microscopia con ImageJ y Fiji*. Universidad de Cantabria.
- [23] Gajbhiye, M; Kesharwani, J; A Ingle. (2009) Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their activity against pathogenic fungi in combination with fluconazole *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 5 (2009) 382–386.

- [24] González, M; Navarroa, R; Martínb, A. Hernández, A. (2006). Effect of phosphoric and hydrofluoric acid on the charge density of a nanofiltration membrane. *Desalination*. 200, 361-363.
- [25] Guastaldi, A. G; Aparecida, A.H. (2010). Fosfatos de cálcio de interesse biológico: Importância como biomateriais, propriedades e métodos para obtenção de revestimentos. *Quim. Nova*, Vol. 33, No 6, p 1353-1358.
- [26] Gregor Mc. In Silva, Marcelo H. Prado. (2007). *Apostilla de Biomateriais, CERAMED*.
- [27] Hartig, S.M. (2013). *Basic Image Analysis and Manipulation in ImageJ*. Baylor College of Medicine, Houston, Texas.
- [28] Hernández. A; F. Tejerina; J.I. Arribas. (1990). *Microfiltración, Ultrafiltración y Osmosis Inversa. Procesos de Transporte y Separación en Membranas*. Universidad de Murcia.
- [29] Huisman, JL; Schouten, G; Schultz, C. (2006). Biologically produced sulphide for purification of process streams, effluent treatment and recovery of metals in the metal and mining industry. *Hydrometallurgy* 83, 106-113.
- [30] Huang Y; Z. Xu; X Zhang. (2017). Nanotube-formed Ti substrates coated with silicate/silver co-doped hydroxyapatite as prospective materials for bone implants. *Journal of Alloys and Compounds*, Volume 697, Pages 182-199.
- [31] Jones. C.M; E.M.V. Hoek. (2010). A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment, *J. Nanoparticle Res.* 12 (2010) 1531–1551.
- [32] Kaygili. O; S. Keser; VS Dorozhkin; F. Yakuphanoglu. (2014) Structural and dielectric properties of Ag and Ba substituted hydroxyapatites. *J. Inorg. Organomet. Polym*, 24· 1001-1008.
- [33] Kasuga. T; H. Maeda; K. Kato. (2003). Preparation of polylactic acid composites containing calcium carbonate, *Biomaterials* 24 (2003) 3247–3253.
- [34] Khan M.S; S. Rehman. (2008). Infection in orthopedic implant surgery, its risk factors and outcome, *J. Ayub Med. Coll. Abbottabad* 20 (2008) 23-25.
- [35] Llorentes, C.B; Junquera, E.C; Gago, J.A; Domingo, P.A. (2011). *Nanociencia y Nanotecnología. Entre la ciencia ficción del presente y la tecnología del futuro*. Fundación Española para la ciencia y la tecnología (FECYT). Pag 27 y 192.

- [36] Meejoo S; Weerakanya. M; Pongtip Winotai. (2006). Phase and thermal stability of nanocrystalline hydroxyapatite prepared via microwave heating. *Thermochimica Acta*, Volume 447, Pages 115-120.
- [37] Méndez. P, J; César A. González Ramírez. (2009). Plant Contamination and Phytotoxicity due to heavy metals from soil and water. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, vol. 10, núm. 1, pp. 29-44 Universidad Autónoma de Yucatán, México.
- [38] Mohseni. E; Zalnezhad E; A.R. Bushroa. (2014). Comparative investigation on the adhesion of hydroxyapatite coating on Ti-6Al-4V implant: a review paper, *Int. J. Adhesion Adhes.* 48 (238–257).
- [39] Morones, J.R; Elechiguerra, J.L. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 16, 2346–2353.
- [40] Muñoz. G.A. (2012). Study of the Properties of Coatings of Hydroxyapatite (HA) Deposited by Thermal Plasma on Ti-6Al-4V. *Journal de Ciencia e Ingeniería*, Vol. 4, pp. 43 – 48.
- [41] Mirzaee .M; Mohammadreza Vaezi; Yahya Palizdar. (2016). Synthesis and characterization of silver doped hydroxyapatite nanocomposite coatings and evaluation of their antibacterial and corrosion resistance properties in simulated body fluid. / *Materials Science and Engineering C* 69 (2016) 675–684.
- [42] Nath. S; S Kalmodia; B. Basu. (2010) Densification, phase stability and in vitro biocompatibility property of hydroxyapatite-10 wt% silver composites, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 21 (2010) 1273–1287.
- [43] Nemerow. N; Dasgupta. A. (1998). *Tratamiento de Vertidos Industriales Peligrosos*. Ed. Dias de Santos. Madrid, 822 pp.
- [44] Pineda Beltrán, M.E; Gómez. R, A.M. (2015). Heavy metals (Cd, Cr and Hg): impact on environment and possible. biotechnological strategies for remediation. *Revista I3+*, 2(2), 82 – 112 p.
- [45] Rad. A. T; M.S. Hashjin; NAA Osman. (2014). Improved bio-physical performance of hydroxyapatite coatings obtained by electrophoretic deposition at dynamic voltage, *Ceram. Int.* 40 (2014) 12681–12691.

- [46] Rai, M K; S.D Deshmukh; A.P. Ingle. (2012). Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. Department of Biotechnology, S.G.B. Amravati University, Amravati 444602, Maharashtra, India.
- [47] Rameshbabu; Sampath Kumar; T. S; T.C. Prabhakar. (2007). Antibacterial nanosized silver substituted hydroxyapatite Synthesis and characterization
- [48] Regi V, M (2.014). Bioceramics with clinical applications/edited by.
- [49] Riaz M; Rehana Zia; Ijaz A. (2018). Synthesis of monophasic Ag doped hydroxyapatite and evaluation of antibacterial activity. Materials Science and Engineering C90 (2018) 308-313.
- [50] Saini, R. k; Bagri; A.k, Bajpai. (2019). Nano-silver hydroxyapatite based antibacterial 3D scaffolds of gelatin/ alginate/poly (vinyl alcohol) for bone tissue engineering applications Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 177 (2019) 211–218.
- [51] Salwiczek, M; Y. Qu; J. Gardiner. (2014) Emerging rules for effective antimicrobial coatings, Trends Biotechnol. 32 (2014) 82-90
- [52] Shalfie, E.R.M; Zainal. (2019). Synthesis of hydroxiapatite via phase transformation of calcium hydrogen phosphate dehydrate: Effects of temperature variation on phase and morphology. Ceramics International.
- [53] Siek. D; Anna Ślósarczyk; A Przekpra. (2017). Evaluation of antibacterial activity and cytocompatibility of  $\alpha$ -TCP based bone cements with silver-doped hydroxyapatite and CaCO<sub>3</sub>. Ceramics International, Volume 43, Pages 13997-14007.
- [54] Sondi. I; B Salopek Sondi. (2004) Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. Journal of Colloid and Interface Science, 275 (1), 177-182.
- [55] Suchanek, K; A. Bartkowiak, A. (2015). Crystalline hydroxyapatite coatings synthesized under hydrothermal conditions on modified titanium substrates, Mater. Sci. Eng. C 51 (2015) 57–63.
- [56] Suzuki T; Hatsushika T; Hayakawa. (1981). Chem Synthetic Hydroxyapatites Employed as Inorganic Cation Exchangers. J. Chem. Soc. Faraday Trans.I, vol 77, p. 1059- 1062.

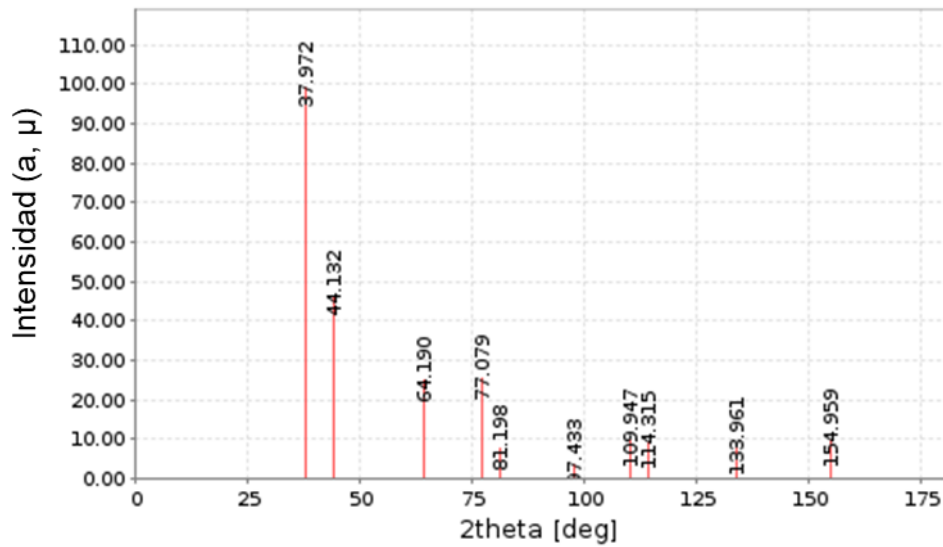


- [57] Suzuki T; Hatsushika T; Miyake. (1982). Part 2. J. Chem. Soc. Faraday Trans.I, vol 78, p. 3605-3611.
- [58] Suzuki, Y; Takeuchi, Y. (1994). Journal of Chemical Engineering of Japan, vol 27, p. 571-576.
- [59] Taipei. M, G; Almandoz Landa, A.L; Santillán Espinoza, F.A. (2020). Preparación y caracterización de biosorbentes basados en compósitos de MWCNT- Magnetita-Hidroxiapatita y su potencial aplicación en la remoción de metales pesados. Rev Soc Quím Perú. 85(4)
- [60] Taylor J; Wiesner M. (2002). Membranas. Capítulo 11. En: AWWA. Calidad y Tratamiento del Agua. Manual de suministros de Agua Comunitaria. McGraw Hill. Madrid, 707 - 779 pp.
- [61] Vahabzadeh. S; Mangal. Roy. (2015). Phase stability and biological property evaluation of plasma sprayed hydroxyapatite coatings for orthopedic and dental applications, Acta Biomater. 17 (2015) 47–55.
- [62] Wang J; Xue. Gong; Jun Hai. (2018). Synthesis of silver - hydroxyapatite composite with improved antibacterial properties. Vacuum 152 (2018) 132-137.
- [63] Wang, P; Caihong Li; Haiyan Gong; Xuerong Jiang. (2010). Effects of synthesis conditions on the morphology of hydroxyapatite nanoparticles produced by wet chemical process. Powder Technology 203 (2010) 315–321
- [64] Xu Yuping B.S; M.S. (1994). Interactions of Heavy Metals with Minerals, dissertation. The Ohio State University.
- [65] Xu Yuping; Schwartz, F.W. (1994) Lead immobilization by hydroxyapatite in aqueous solutions. J. Contaminant Hydrology, 15, 187-206.
- [66] Yamanaka M; Hara K; Kudo J. (2005) Bactericidal actions of a silver ion solution on Escherichia coli, studied by energy-filtering transmission electron microscopy and proteomic analysis. Appl Environ Microbiol 71, 7589–7593.
- [67] Yuan Q; Anping Xu. (2018). Bioactive silver doped hydroxyapatite composite coatings on metal substrates: Synthesis and characterization. Materials Chemistry and Physics, Pages 130-139.
- [68] Yagut Muhammad; Seung Hwan Lee. (2020). Micellar enhanced ultrafiltration (MEUF) of mercury-contaminated wastewater: Experimental and artificial neural network modeling. Journal of Water Process Engineering 33 (2020) 101046.

[69] Zewail T M; Yousef, NS. (2015). Kinetic study of heavy metal ions removal by ion exchange in batch conical air spouted bed, Alexandria Engineering Journal, 54, 83-90.

## ANEXOS

**Anexo 1:** Información de los picos correspondientes a la (Ag), extraída de base de datos de materiales inorgánicos AtomWork (Inorganic Material Database AtomWork).



**Anexo 2:** Información de los picos correspondientes a la Ag extraída de base de datos de materiales inorgánicos Atomwork (Inorganic Material Database AtomWork).

2θ (°)	Miller Indices			Intensidad	d - espaciado (nm)
37.972	1	1	1	99	0.2367
44.132	2	0	0	46	0.2050
64.190	2	2	0	24	0.1450
77.079	3	1	1	25	0.1236
81.198	2	2	2	7	0.1184
97.433	4	0	0	3	0.1025
109.947	3	3	1	9	0.0941
114.315	4	2	0	9	0.0917
133.961	4	2	2	7	0.0837
154.959	5	1	1	9	0.0789
154.959	3	3	3	9	

**Anexo 3:** Información de los picos correspondientes a la Hap, extraída de centro internacional de datos de difracción (ICDD) (International Centre for Diffraction Data).

<b>Nombre y formula</b>							
Código de referencia: 00-009-0432							
Nombre del mineral: Hidroxiapatita							
Fórmula empírica: Ca <sub>5</sub> HO <sub>13</sub> P <sub>3</sub>							
Fórmula química: Ca <sub>5</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> (OH)							
Lista de pico							
No.	h	k	l	d [Å]	2θ [°]	I [%]	
1	1	0	0	8,17000	10,820	12,0	
2	1	0	1	5,26000	16,842	6,0	
3	1	1	0	4,72000	18,785	4,0	
4	2	0	0	4,07000	21,820	10,0	
5	1	1	1	3,88000	22,902	10,0	
6	2	0	1	3,51000	25,354	2,0	
7	0	0	2	3,44000	25,879	40,0	
8	1	0	2	3,17000	28,127	12,0	
9	2	1	0	3,08000	28,967	18,0	
10	2	1	1	2,81400	31,774	100,0	
11	1	1	2	2,77800	32,197	60,0	
12	3	0	0	2,72000	32,902	60,0	
13	2	0	2	2,63100	34,049	25,0	
14	3	0	1	2,52800	35,481	6,0	
15	2	1	2	2,29600	39,205	8,0	
16	3	1	0	2,26200	39,819	20,0	
17	2	2	1	2,22800	40,453	2,0	
18	3	1	1	2,14800	42,030	10,0	
19	3	0	2	2,13400	42,319	4,0	
20	1	1	3	2,06500	43,805	8,0	
21	4	0	0	2,04000	44,370	2,0	
22	2	0	3	2,00000	45,306	6,0	
23	2	2	2	1,94300	46,713	30,0	
24	3	1	2	1,89000	48,104	16,0	
25	3	2	0	1,87100	48,624	6,0	
26	2	1	3	1,84100	49,469	40,0	
27	3	2	1	1,80600	50,494	20,0	
28	4	1	0	1,78000	51,285	12,0	
29	4	0	2	1,75400	52,101	16,0	
30	0	0	4	1,72200	53,145	20,0	
31	1	0	4	1,68400	54,442	4,0	
32	3	2	2	1,64400	55,881	10,0	
33	3	1	3	1,61100	57,129	8,0	
34	5	0	1	1,58700	58,075	4,0	
35	4	2	0	1,54200	59,940	6,0	
36	3	3	1	1,53000	60,459	6,0	
37	2	1	4	1,50300	61,662	10,0	
38	5	0	2	1,47400	63,012	12,0	
39	5	1	0	1,46500	63,444	4,0	
40	3	2	3	1,45200	64,080	13,0	
41	3	0	4	1,45200	64,080	13,0	
42	5	1	1	1,43300	65,033	9,0	
43	4	1	3	1,40700	66,388	4,0	
44	4	2	2	1,40700	66,388	4,0	
45	5	1	2	1,34800	69,701	3,0	
46	4	0	4	1,31600	71,653	5,0	
47	4	3	1	1,31600	71,653	5,0	
48	2	0	5	1,30600	72,288	4,0	

**Anexo 4:** Proceso de producción de la Hap a partir de hueso bobino.



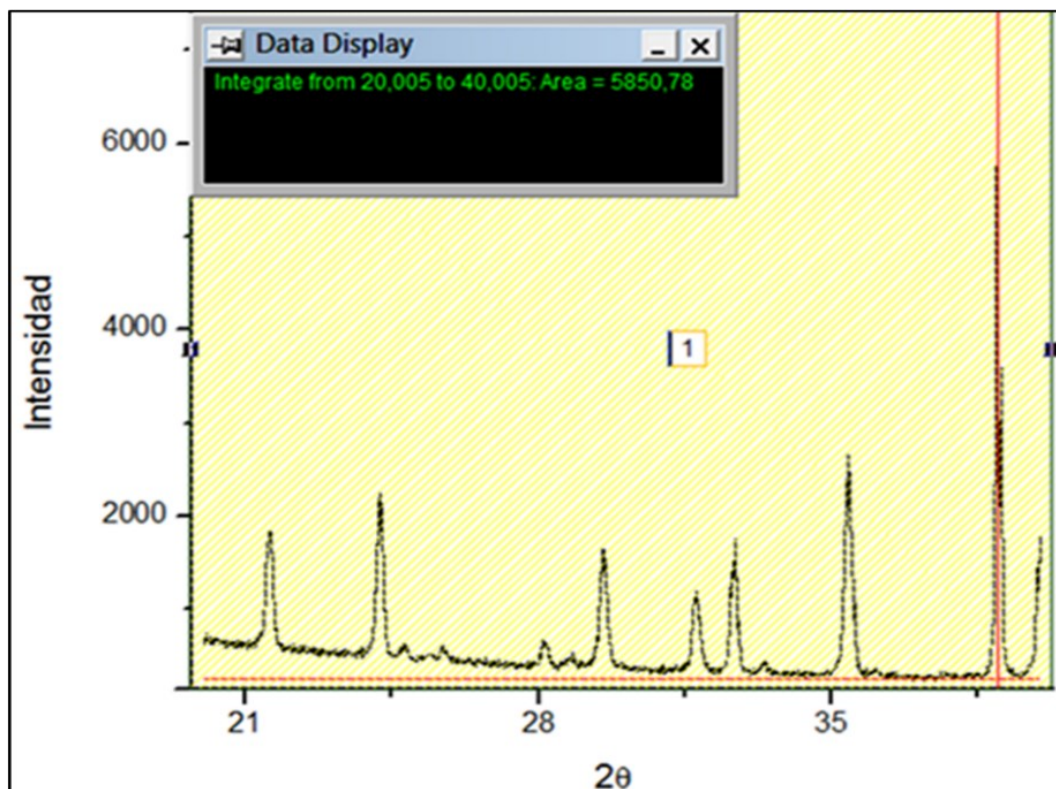
**Anexo 5:** Proceso de síntesis de la Hap/Ag.



**Anexo 6:** Microscopia electrónica de barrido (MEB).

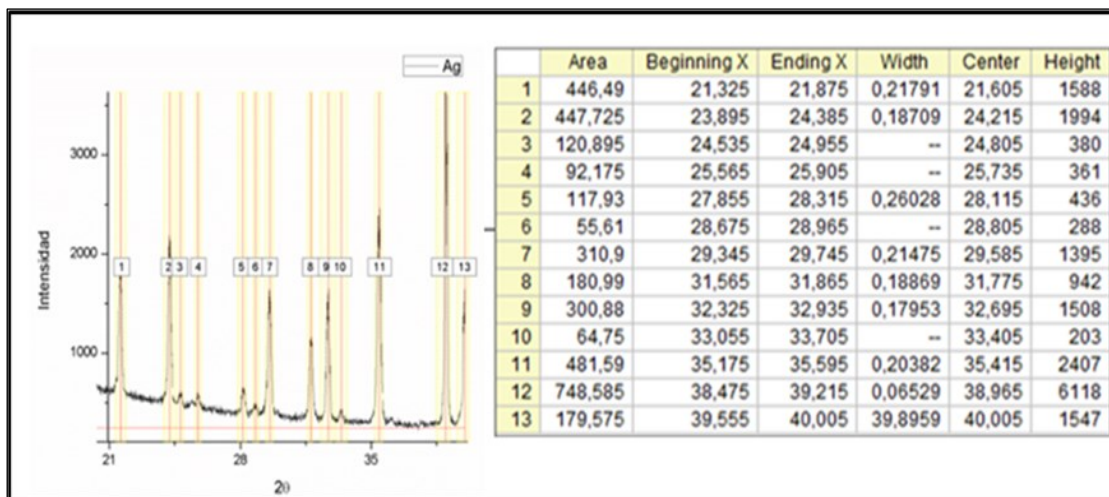


**Anexo 7:** Área amorfa o jorobada de la plata.

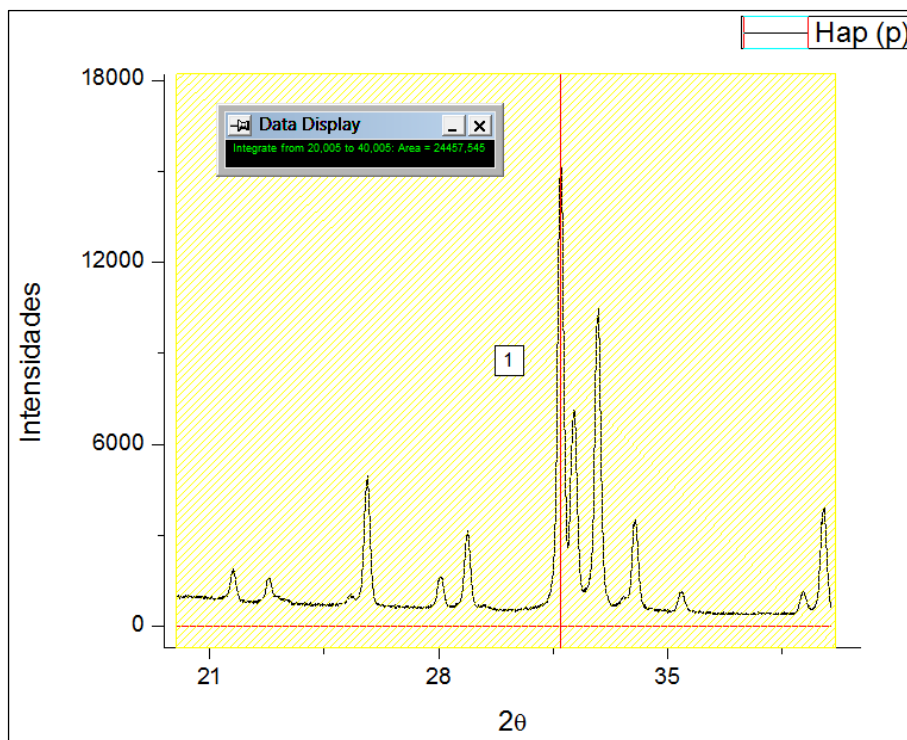


**Anexo 8:** Área cristalina de la plata.

**Inicio X=** Beginning X; **Final X=** Ending X, **Ancho=** Width; **Centro=** Center;  
**Altura=** Height.

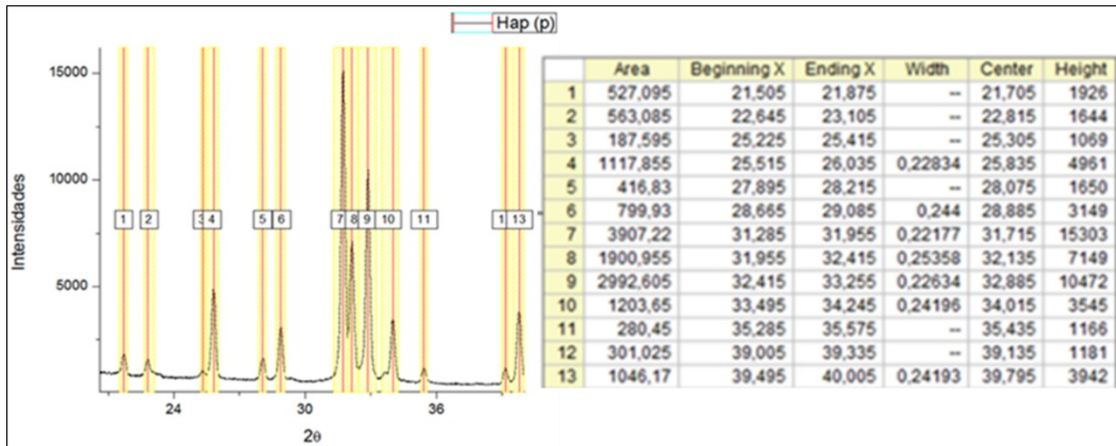


**Anexo 9:** Área amorfa o jorobada de la Hidroxiapatita.



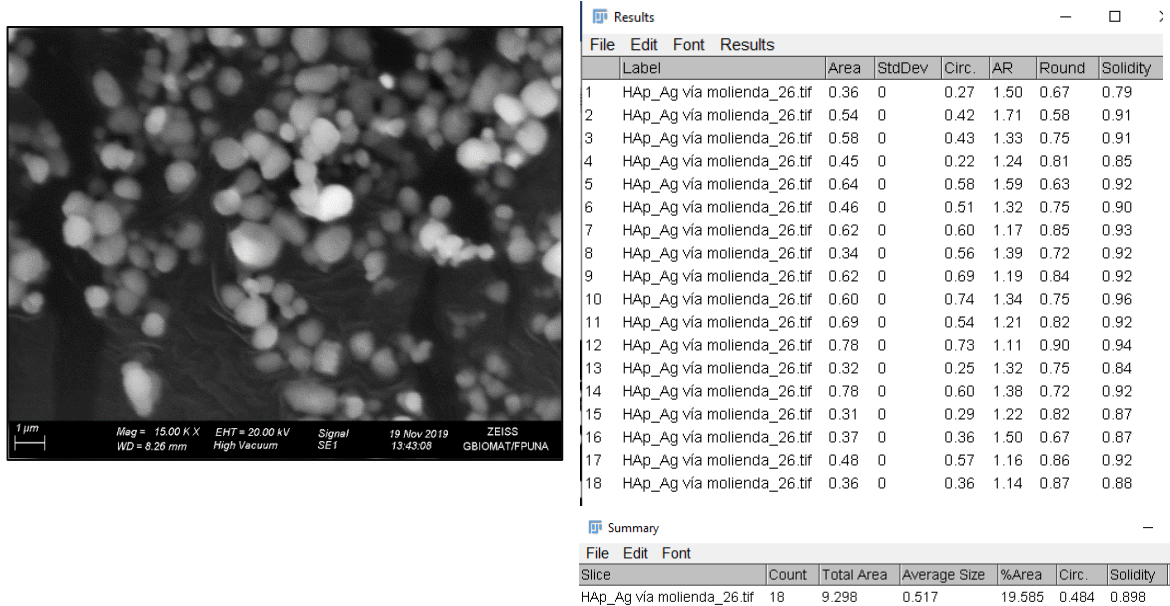
**Anexo 10:** Área cristalina de la hidroxiapatita.

(Inicio X= Beginning X; Final X= Ending X, Ancho= Width; Centro= Center; Altura= Height).



**Anexo 11:** Resultado obtenido de la muestra Hap/Ag\_1 con SAI Fiji/ImageJ:

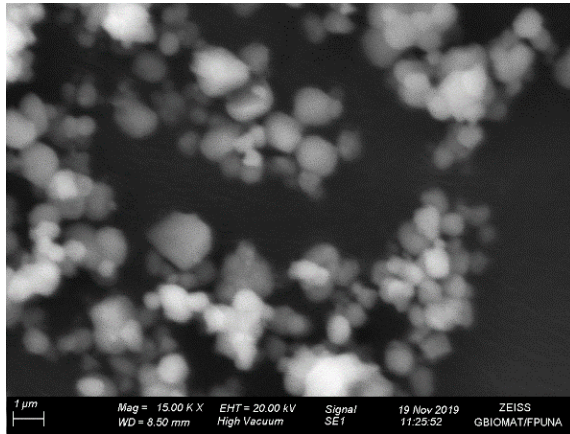
(StdDv: Desviación estándar; Circ: Circularidad; AR: Relación de aspecto; Round: Redondez; Solidity: Solidez; Count: Contaje; Average Size: Tamaño promedio).





**Anexo 12:** Resultado obtenido de la muestra Hap/Ag\_2 con SAI Fiji/ImageJ.

(**StdDv:** Desviación estándar; **Circ:** Circularidad; **AR:** Relación de aspecto; **Round:** Redondez; **Solidity:** Solidez; **Count:** Contaje; **Average Size:** Tamaño promedio).



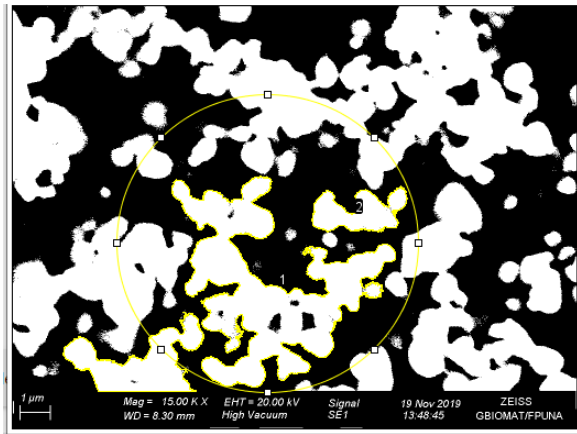
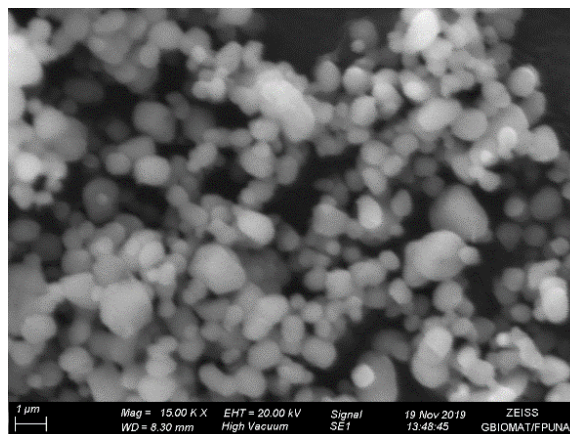
Results							
File	Edit	Font	Results				
Label	Area	StdDev	Circ.	AR	Round	Solidity	
1	HAp_Ag via gel_22.tif	1.07	0	0.38	1.35	0.74	0.91
2	HAp_Ag via gel_22.tif	0.96	0	0.55	1.10	0.91	0.94
3	HAp_Ag via gel_22.tif	1.13	0	0.50	1.16	0.86	0.93
4	HAp_Ag via gel_22.tif	0.48	0	0.41	1.42	0.70	0.88
5	HAp_Ag via gel_22.tif	0.82	0	0.31	1.43	0.70	0.86
6	HAp_Ag via gel_22.tif	0.36	0	0.57	1.03	0.97	0.92
7	HAp_Ag via gel_22.tif	0.58	0	0.25	1.53	0.66	0.84
8	HAp_Ag via gel_22.tif	1.51	0	0.33	1.23	0.81	0.88
9	HAp_Ag via gel_22.tif	0.67	0	0.55	1.41	0.71	0.91
10	HAp_Ag via gel_22.tif	0.49	0	0.63	1.54	0.65	0.92
11	HAp_Ag via gel_22.tif	0.42	0	0.48	1.16	0.86	0.88
12	HAp_Ag via gel_22.tif	0.70	0	0.51	1.33	0.75	0.88
13	HAp_Ag via gel_22.tif	0.34	0	0.62	1.59	0.63	0.89
14	HAp_Ag via gel_22.tif	0.54	0	0.49	1.46	0.68	0.90
15	HAp_Ag via gel_22.tif	0.95	0	0.50	1.30	0.77	0.89
16	HAp_Ag via gel_22.tif	0.55	0	0.57	1.36	0.74	0.93
17	HAp_Ag via gel_22.tif	0.44	0	0.41	1.12	0.89	0.90

File	Edit	Font					
Slice	Count	Total Area	Average Size	%Area	Circ.	Solidity	
HAp_Ag via gel_22.tif	17	12.028	0.708	18.433	0.474	0.897	

**Anexo 13:** Cuantificación de tamaños de las partículas aglomeradas con el SAI Fiji/ImageJ, de la muestra Hap/Ag\_1.

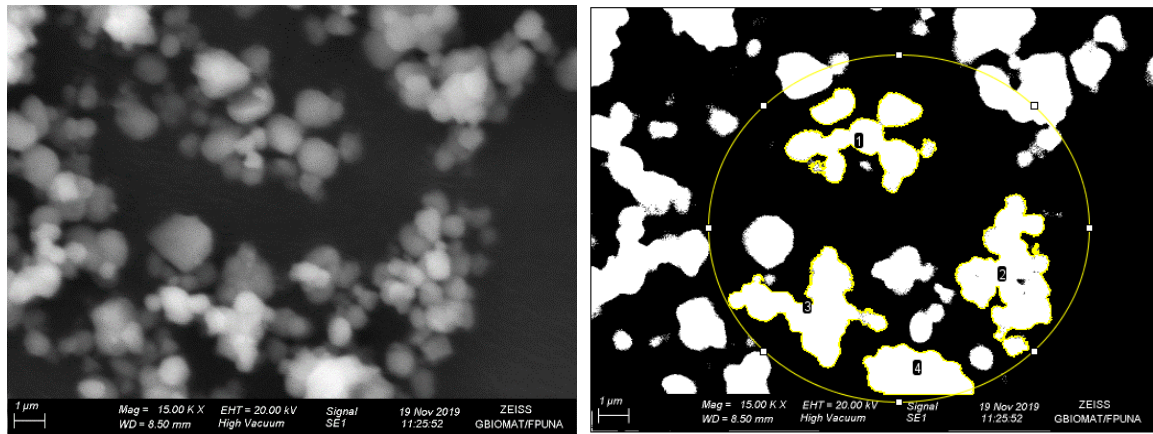
(**StdDv:** Desviación estándar; **Circ:** Circularidad; **AR:** Relación de aspecto; **Round:** Redondez; **Solidity:** Solidez).



Results							
File	Edit	Font	Results				
Label	Area	StdDev	Circ.	AR	Round	Solidity	
1	HAp_mol_29.tif	18.11	0	0.05	1.23	0.82	0.53
2	HAp_mol_29.tif	2.71	0	0.21	2.53	0.39	0.72

**Anexo 14:** Cuantificación de tamaños de las partículas aglomeradas con el SAI Fiji/ImageJ, de la muestra Hap/Ag\_2.

(**StdDv:** Desviación estándar; **Circ:** Circularidad; **AR:** Relación de aspecto; **Round:** Redondez; **Solidity:** Solidez).



Results							
File	Edit	Font	Results				
	Label	Area	StdDev	Circ.	AR	Round	Solidity
1	HAp_Ag via gel_22.tif	6.28	0	0.08	1.82	0.55	0.58
2	HAp_Ag via gel_22.tif	8.62	0	0.10	1.70	0.59	0.74
3	HAp_Ag via gel_22.tif	7.42	0	0.13	1.40	0.71	0.60
4	HAp_Ag via gel_22.tif	4.50	0	0.48	2.30	0.43	0.93