

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Evaluación y caracterización de las mezclas de HA:X (X=TiO₂, In₂TiO₅, Sc₂TiO₅) como soportes de crecimiento de *Mycobacterium smegmatis* en una prueba de susceptibilidad a gentamicina



Tesis

Que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias de la Salud

Presenta

Flor Madalitz Vazquez Paz

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



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



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

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del Jurado Calificador designado para revisar el trabajo de Tesis de **Flor Madalitz Vazquez Paz**, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Salud.



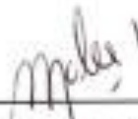
Dra. Iliana Celina Infanta Muñoz Palma
Director Académico



Dra. Adriana Garibay Escobar
Secretario



Dr. Francisco Brown Bojórquez
Vocal



M.C. Magali Avilés Acosta
Sinodal

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Iliana Muñoz Palma y al Dr. Francisco Brown Bojórquez por su amistad, apoyo, tiempo y confianza.

A la Dra. Adriana Garibay, M.C. Magali Avilés, Dr. Víctor Álvarez, M. C. Diego Monge y M.C. Wenceslao Coronado por su apoyo durante la realización de este trabajo.

Al Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales y al Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia de la Universidad de Sonora por las facilidades brindadas para la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo al proyecto 162175.

A la Universidad de Sonora por las facilidades otorgadas.

ÍNDICE

	Página
OBJETIVOS	IX
Objetivo General	IX
Objetivos Particulares	IX
RESUMEN	X
INTRODUCCIÓN	1
Justificación	2
Hipótesis	5
ANTECEDENTES	6
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	8
Biopelículas Bacterianas	8
Materiales Cerámicos	11
Fotocatálisis	14
Teoría de Bandas	14
Materiales Fotocatalíticos	15
METODOLOGÍA	18
Materiales y Equipo	18
Síntesis de los Materiales	19
Preparación de los Soportes Cerámicos	20
Caracterización por Difracción de Rayos X de Polvos	20
Análisis Termogravimétrico y Térmico Diferencial (TGA/DTA)	20
Caracterización por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)	21
Prueba de Solubilidad	21
Análisis de Resistencia al Tratamiento de Esterilización	21
Análisis de la Concentración de Oxígeno	22
Ensayo de Resazurina en Microplaca (REMA)	22
RESULTADOS	24

CONCLUSIONES	56
BIBLIOGRAFÍA	58
ANEXOS	63

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Representación del fenómeno fotocatalítico	16
2	Soportes de la mezcla de HA:TiO ₂ en proporción 1:1 (en relación molar)	25
3	Análisis TGA de la mezcla HA:TiO ₂ 1:1	27
4	Análisis TGA de la mezcla HA:Sc ₂ TiO ₅ 1:1	28
5	Análisis TGA de la mezcla HA:In ₂ TiO ₅ 1:1	29
6	Difractograma de Rayos X de la mezcla HA:TiO ₂ 1:1 sinterizada a 1200 °C durante 96 horas.	31
7	Difractograma de Rayos X de la mezcla la HA:In ₂ TiO ₅ 1:1 sinterizada a 1200 °C durante 48 horas	32
8	Difractograma de Rayos X de la mezcla HA:Sc ₂ TiO ₅ 1:1 sinterizada a 1200 °C durante 48 horas	33
9	Micrografía de un soporte de HA:TiO ₂ en proporción 1:1 sinterizado a 1200 °C	35
10	Imágenes obtenidas de MEB a varias magnificaciones para soportes de las diferentes mezclas en proporción 1:1 sinterizada a 1200 °C.	36
11	Fases identificadas mediante EDS realizado al soporte de HA:In ₂ TiO ₅ .	38
12	Representación del ensayo REMA	40
13	Porcentaje de oxígeno disuelto conforme pasa el tiempo después de 30 min de exposición a luz solar del medio de cultivo MDB 7H9 con pastillas de HA:In ₂ TiO ₅	44
14	Comparación entre micrografías de soportes empleados y no empleados en ensayos REMA	47

15	Micrografía obtenida de soportes de HA:TiO ₂ empleados en ensayos REMA	48
16	Bacilos de <i>M. smegmatis</i> sobre soportes de HA:TiO ₂ utilizados en ensayos REMA	50
17	Bacilos de <i>M. smegmatis</i> sobre soportes de HA:In ₂ TiO ₅ utilizados en ensayos REMA	51
18	Bacilos de <i>M. smegmatis</i> sobre soportes de HA:Sc ₂ TiO ₅ utilizados en ensayos REMA	52
19	Micrografía de soportes de HA:Sc ₂ TiO ₅ utilizados en ensayos REMA	54

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Concentración mínima inhibitoria (CMI) en ensayos de susceptibilidad de <i>M. smegmatis</i> utilizando los diferentes soportes. Para su comparación se muestran los resultados de los soportes de HA:In ₂ TiO ₅ expuestos a luz solar (LS) durante 30 y 60 minutos.	42

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar y caracterizar las mezclas de HA:X ($X=\text{TiO}_2$, In_2TiO_5 , Sc_2TiO_5) como soportes de crecimiento de *Mycobacterium smegmatis* en una prueba de susceptibilidad a gentamicina.

Objetivos Particulares

- Obtener las mezclas de HA:X ($X=\text{TiO}_2$, In_2TiO_5 , Sc_2TiO_5) en la proporción adecuada para preparar soportes porosos, insolubles y resistentes a la esterilización por medios térmicos.
- Promover el incremento de la concentración de oxígeno en el medio para crecimiento de *Mycobacterium smegmatis*, mediante efecto fotocatalítico.
- Evaluar el desarrollo de *Mycobacterium smegmatis* sobre los soportes de los diferentes materiales por microscopía electrónica de barrido.

RESUMEN

La tuberculosis es considerada un problema de salud pública por la OMS la cual reportó 9 millones de nuevos casos y 1.5 millones de muertes en 2013. *Mycobacterium tuberculosis* tienen un crecimiento muy lento en medios de cultivo; por lo que es necesario desarrollar métodos rápidos de su cultivo y aislamiento que contribuyan a un diagnóstico eficiente, permitiendo un tratamiento especializado y oportuno. En las últimas décadas se ha incrementado considerablemente el uso de los materiales cerámicos en aplicaciones biomédicas principalmente como sustratos para promover proliferación celular o formación de biopelículas en su superficie, debido a sus propiedades mecánicas como porosidad, rugosidad y baja toxicidad. Algunos ejemplos de dichos cerámicos son el TiO_2 y titanatos de bario; además se ha reportado crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* en soportes de hidroxiapatita. En este trabajo se reporta el uso de los sustratos TiO_2 y los titanatos In_2TiO_5 y Sc_2TiO_5 para crecimiento de *Mycobacterium smegmatis*, bacteria empleada como modelo de crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*. Las propiedades mecánicas y fotocatalíticas del TiO_2 y los titanatos favorecieron el aumento de la concentración de oxígeno disponible para el metabolismo y crecimiento de la bacteria. Mediante efecto fotocatalítico, promovido por luz solar, se potenció el desarrollo de la bacteria en un menor tiempo, lo que podría contribuir a un diagnóstico rápido y eficiente de la tuberculosis. Con las mezclas cerámicas preparadas se obtuvieron soportes insolubles, porosos y resistentes a la esterilización por medios térmicos. Se obtuvieron los mejores resultados para crecimiento de *M. smegmatis* con los soportes de HA: In_2TiO_5 expuestos a luz solar. La CMI aumentó de 0.5 a 4.0 en ensayos de resazurina en microplaca y se confirmó la formación de biopelícula sobre los soportes de las mezclas mediante microscopía electrónica de barrido.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es considerada un problema de salud pública por la Organización Mundial de la Salud la cual reportó en el 2014 una cifra de 9 millones de nuevos casos de tuberculosis en el 2013 y una proporción de 3.5% de nuevos casos de tuberculosis multidrogorresistente. Sin embargo, se calcula que en algunos países sólo son reportados uno de cada diez casos de *Mycobacterium tuberculosis (Mtb)* multidrogorresistente.

Una de cada tres personas en el mundo está infectada con bacterias latentes de la tuberculosis, pero la enfermedad se presenta sólo cuando las bacterias están en división activa. Las bacterias pueden activarse como consecuencia de cualquier factor que reduzca la inmunidad, como la infección por el VIH, el envejecimiento o determinadas afecciones (OMS, 2014).

En México se reportó una incidencia de 16,8 casos por 100.000 habitantes para el año 2012, que correspondió a 19.697 casos de TB notificados (OMS, 2014).

Las características de la pared celular de *Mtb* contribuyen a su tardado aislamiento e identificación; en medios de cultivo sólidos los aislamientos aparecen entre la tercera y sexta semana pero algunos lo hacen después de la séptima semana de incubación por lo que es necesario contar con métodos de diagnóstico más eficientes que permitan suministrar un tratamiento especializado y oportuno, especialmente en los casos de tuberculosis multidrogorresistente (Forbes y col., 2009).

Se puede presentar tuberculosis extremadamente drogorresistente si los medicamentos se utilizan o administran inadecuadamente, volviéndose, por consiguiente, ineficaces. En estos casos existe resistencia de *Mtb* a los medicamentos de primera y segunda línea, siendo las opciones de tratamiento

muy limitadas. Así pues, es crucial el empleo de un método de diagnóstico a tiempo que nos permita analizar la drogosisceptibilidad de *Mtb* (OMS, 2014).

La bacteria utilizada en este trabajo fue *Mycobacterium smegmatis* (*Ms*) la cual es aceptada como modelo de estudio de *Mtb* ya que comparten la mayoría de sus genes a excepción de los genes responsables del fenotipo de virulencia, lo que hace posible trabajar con *Ms* en bioseguridad nivel 2 (BSL2) y obtener resultados en un menor tiempo debido al crecimiento menos lento de la bacteria en comparación con otras especies de *Mycobacterium* (Bonkat y col, 2012; Reyrat y col, 2001).

Con la presente investigación se plantea el uso de mezclas de hidroxiapatita (HA) con TiO_2 , In_2TiO_5 , Sc_2TiO_5 como soportes de crecimiento y formación de biopelícula de *Ms* para favorecer así su crecimiento en un menor tiempo en medio de cultivo líquido.

Se ha descrito en la literatura científica que algunos de estos materiales, como el TiO_2 y diferentes tipos de titanatos además de la HA, tienen la propiedad de favorecer la proliferación celular. (Frances y col., 2009; Haixin Zhao y col., 2011; Chih-Yao y col., 2009). Recientemente se ha reportado el crecimiento de *Mtb* en soportes porosos como Al_2O_3 , wollastonita (CaSiO_3) (Hertog y col., 2010).

Justificación

La tuberculosis es considerada un problema de salud pública a nivel mundial, debido en parte a la multidrogoresistencia de la bacteria. Sin embargo, no todos los países reportan anualmente los casos de *Mtb* multidrogoresistente o cuentan con métodos diagnósticos para tuberculosis que permitan controlar los nuevos casos de manera temprana, por lo que es necesario contar con métodos de diagnóstico más eficientes que permitan suministrar un tratamiento

especializado y a tiempo ya que el control del tratamiento es una de las actividades más importantes en el abordaje de la tuberculosis (OMS, 2014).

El diagnóstico de tuberculosis es tardado y algunos de los métodos actualmente empleados para la identificación de tuberculosis dejan un amplio margen de error, retrasando el inicio de un tratamiento oportuno, algunos métodos son caros o no son igual de eficientes para todas las poblaciones, entre ellos, la baciloscopía tiene poca sensibilidad ya que se calcula que se requieren más de 5000 bacilos por mililitro para detectar la presencia de la micobacteria, además es necesario examinar tres muestras diferentes del paciente lo que en algunos casos dificulta la obtención de un resultado final. La prueba llamada tuberculina presenta el inconveniente de obtener resultados falsos positivos en poblaciones donde previamente se han llevado a cabo campañas de vacunación contra tuberculosis. Por otro lado, las técnicas moleculares no están disponibles para poblaciones donde los recursos son limitados, debido a la infraestructura y al personal capacitado requeridos para llevarlas a cabo (Hurtado, 2008).

El aislamiento en medio de cultivo para posterior identificación de *Mtb* continua siendo considerado como la prueba de oro, sin embargo, como se mencionó anteriormente el crecimiento de esta bacteria es lento y los aislamientos pueden tardar más de seis semanas en aparecer, lo anterior muestra la importancia de desarrollar sistemas de inmovilización de células que generen alta densidad de las mismas en los medios de cultivo comúnmente usados en un tiempo y costo reducidos (Forbes y col., 2009).

Algunos tipos de materiales logran lo mencionado anteriormente al favorecer el crecimiento sobre su superficie de diferentes tipos de células debido a las características físicas y químicas que poseen. Aunque la mayoría de las investigaciones actuales sobre materiales de este tipo están enfocadas en el desarrollo de tejidos que funcionen como implantes o en regeneración de

tejido. En algunos casos se ha observado que sobre algunos de estos materiales existe la tendencia a la formación de biopelículas bacterianas que causan el rechazo del implante, por lo que han sido utilizados para favorecer el crecimiento de bacterias y reducir así el tiempo que se requiere para la obtención de aislamientos (Hertog y col., 2010).

Con la presente investigación se plantea el uso de materiales cerámicos como soportes de crecimiento de *Ms* como un modelo para disminuir el tiempo que se requiere para el aislamiento e identificación de *Mtb* lo que permitirá un diagnóstico de tuberculosis más eficiente en comparación con los métodos empleados actualmente.

En comparación con *M. tuberculosis*, el tiempo que se requiere para generar a *M. smegmatis* es corto, además ambas micobacterias comparten algunos de los genes homólogos de virulencia, debido a lo anterior *M. smegmatis* es estudiada para ayudar en la generación de nuevo conocimiento sobre diferentes aspectos de *M. tuberculosis*, por lo que en el presente trabajo se eligió a *M. smegmatis* como un modelo para la generación de resultados sobre su crecimiento en soportes cerámicos, los cuales igualmente podrían permitir y favorecer el crecimiento de *M. tuberculosis* (Reyrat y col., 2001).

Consideramos importante evaluar como soportes para crecimiento de *Ms* a la hidroxiapatita (HA) en combinación con otros materiales que promuevan la proliferación celular como el TiO_2 y titanatos como In_2TiO_5 y Sc_2TiO_5 , sobre los que no hay reporte en la literatura científica de sus propiedades como sustratos para adhesión celular o formación de biopelículas. Sin embargo, estos compuestos de titanio presentan fotocatalisis, lo que significa que reaccionan con el H_2O del medio debido a la absorción de luz generando O_2 , característica que ha sido aprovechada en algunos sistemas para la producción de oxígeno, elemento que es imprescindible para el desarrollo de las micobacterias. Además HA es el principal constituyente inorgánico de los

huesos humanos, sitio en el que *Mtb* puede crecer en el organismo; en investigaciones anteriores se ha utilizado como soporte para favorecer el crecimiento de *Mtb* (Narasaraju y col., 1996; Jaramillo y col., 2006).

Hipótesis

Las mezclas de HA:X (X=TiO₂, In₂TiO₅, Sc₂TiO₅), son capaces de favorecer el crecimiento de *Mycobacterium smegmatis*.

ANTECEDENTES

La Organización Mundial de la Salud estima que 37 millones de vidas fueron salvadas entre 2000 y 2013 gracias a diagnósticos y tratamientos efectivos, sin embargo el número de muertes registradas en los últimos años continúa siendo inaceptablemente alto.

Aunque el acceso al tratamiento de tuberculosis se ha ampliado considerablemente los progresos en la lucha contra la tuberculosis multirresistente (TB-MR) siguen siendo lentos presentándose durante el 2011 casi 60 000 casos reportados de TB-MR en todo el mundo. Se calcula que, a nivel mundial, el 3,7% de los nuevos casos y el 20% de los tratados con anterioridad tienen TB-MR (OMS, 2014).

Una de las maneras en que los países pueden prevenir la TB-MR, es procurando que sus programas nacionales de control de la tuberculosis cuenten con un diagnóstico adecuado para los enfermos con tuberculosis (OMS, 2012).

Mycobacterium tuberculosis

Los organismos pertenecientes al género *Mycobacterium* son bacilos inmóviles, delgados (0,2-0,4 x 2-10 μm), con una capa gruesa de estructura poco común que contiene ácido N-acetilmurámico y una cantidad muy elevada de lípidos, característica que les permite resistir la coloración con alcohol acidificado siendo la propiedad de ácido alcohol resistencia la que permite distinguir a *Mycobacterium* de otros géneros. También se caracterizan por crecer lentamente debido a la superficie celular hidrófoba que induce la formación de grumos y contribuye a que los nutrientes hidrosolubles ingresan con dificultad en la célula, por lo que el tiempo de replicación de *Mtb* es de 18 horas (Forbes y col., 2009).

Aunque *Mycobacterium tuberculosis* es el principal agente etiológico de la infección tuberculosa, no es el único, ya que entre las especies de microorganismos que aparecen en seres humanos y pertenecen al complejo *Mycobacterium tuberculosis* figuran también *M. bovis*, *M. bovis BCG* y *M. africanum*, todas consideradas de desarrollo lento y formadoras de colonias no pigmentadas (Ingraham y col., 1998; Forbes y col., 2009).

La enfermedad puede afectar cualquier órgano o tejido, por ejemplo, ganglios linfáticos, pleura, pericardio, riñones, huesos y articulaciones, laringe, oído medio, piel, intestinos, peritoneo y ojos. Aunque la tuberculosis extrapulmonar es menos común que la pulmonar, siendo esta el tipo más frecuente de tuberculosis en el mundo. Sin tratamiento, la mayoría de los enfermos muere en menos de 18 años; los síntomas son fatiga, fiebre, sudores nocturnos, pérdida de peso y en etapas avanzadas, tos, dolor torácico, hemoptisis y ronquera (Chin, 2001).

Para el aislamiento de micobacterias, se utilizan tanto medios sólidos como líquidos. El medio sólido más comúnmente empleado es el Löwenstein Jensen que es un medio de formulación compleja con base de huevo, también se utilizan medios semisintéticos con base de agar, como los medios Middlebrook 7H10 y 7H11. Los medios líquidos suelen basarse en formulaciones parecidas al medio Middlebrook 7H9 suplementado con diversos factores de crecimiento y mezclas de antibióticos (Prats, 2006).

La mayoría de los aislamientos de *Mycobacterium tuberculosis* en medios de cultivo sólidos aparecen entre las tercera y sexta semanas pero algunos lo hacen después de la octava semana de incubación; en medios líquidos el tiempo se ha logrado disminuir hasta 10 días, por lo que el diagnóstico de tuberculosis es tardado y como ya se mencionó algunos de los métodos actualmente empleados son costosos o no son igual de eficientes para todas las poblaciones (Forbes y col., 2009).

Mycobacterium smegmatis

M. smegmatis es el modelo no patogénico de *M. tuberculosis* ya que ambas presentan características genéticas similares las cuales permiten estudiar aspectos de adaptación fisiológica en *M. smegmatis* y esperar resultados similares o iguales en *M. tuberculosis* con la ventaja de requerirse menos tiempo y niveles de bioseguridad para la obtención de resultados con *M. smegmatis* (Reyrat y col., 2001).

M. smegmatis puede causar infecciones en humanos bajo ciertas circunstancias, sin embargo sigue siendo considerada dentro del grupo de las micobacterias atípicas raramente implicadas en patología humana (Scheld y col., 2004). Las micobacterias de crecimiento rápido se definen como bacilos ácido-alcohol resistentes que forman colonias visibles en un medio sólido a partir de inóculos diluidos en un período menor a 7 días, con un tiempo de replicación entre 2-5 horas (Ausina y col., 2006). En comparación con *M. tuberculosis*, el tiempo que se requiere para generar a *M. smegmatis* es corto, además ambas micobacterias comparten algunos de los genes homólogos de virulencia, debido a lo anterior *M. smegmatis* es estudiada para ayudar en la generación de nuevo conocimiento sobre diferentes aspectos de *M. tuberculosis*, por lo que en el presente trabajo se eligió a *M. smegmatis* como un modelo para la generación de resultados sobre su crecimiento en soportes cerámicos, los cuales igualmente podrían permitir y favorecer el crecimiento de *M. tuberculosis* (Reyrat y col., 2001).

Biopelículas Bacterianas

Una biopelícula está unida a un substrato y consiste en bacterias adheridas entre sí por interacciones físicas y sustancias extracelulares (Garrett 2008). La formación de biopelículas proporciona algunas ventajas para las bacterias como contribuir a la resistencia a antibióticos, protección frente a desinfectantes o a

ambientes dinámicos. La comunicación intracelular entre las bacterias que forman la biopelícula estimula la regulación de la expresión genética permitiendo la adaptación, la variación fenotípica y la habilidad de sobrevivir en condiciones deficientes de nutrientes. El desarrollo de biopelículas está sujeto a procesos químicos, físicos y biológicos.

La acumulación de microorganismos en una superficie se ha descrito como un proceso de tres pasos: 1) la absorción o acumulación del microorganismo en una superficie colectora o sustrato; 2) la unión entre el organismo y el sustrato y 3) la colonización o crecimiento y división del organismo en la superficie del sustrato.

La capa sobre la que una biopelícula crece está compuesta de muchas partículas orgánicas e inorgánicas y cualquier elemento presente en el líquido podría llegar a formar parte de esta capa facilitando la adhesión de la bacteria y alterar la carga potencial y tensión superficial favorablemente por la interacción entre la capa y el sustrato. El sustrato puede proveer anclaje y nutrientes aumentando el crecimiento de la población bacteriana (Herrera, 2004).

Una fracción de las células en la superficie del sustrato son adheridas de manera reversible y algunos factores como la temperatura, la presión y condiciones de superficie influyen en este paso del proceso de la formación de biopelículas. Si las fuerzas de repulsión son mayores que las fuerzas de atracción la bacteria se desprenderá de la superficie del sustrato.

Las fuerzas físicas asociadas a la adhesión de las bacterias incluyen las fuerzas de van der Waals, interacciones estéricas e interacciones electroestáticas conocidas conjuntamente como fuerzas DVLO (Derjaguin, Verwey, Landau y Overbeek). La teoría DVLO ha sido usada para describir la interacción entre las células y una superficie plana como un balance entre dos fuerzas diferentes, interacciones van der Waals (fuerzas de atracción) e interacciones de repulsión debido a la superposición entre la doble capa

eléctrica de la célula y el substrato, que es repulsiva debido a cargas negativas de las células, la teoría describe la posibilidad o no de que la adhesión sea reversible o irreversible (Ábalos, 2005).

Algunas de las células absorbidas reversiblemente permanecen inmobilizadas y son irreversiblemente absorbidas. Hay evidencias de que la adhesión microbiana depende fuertemente de las propiedades hidrofóbicas e hidrofílicas de la superficie.

A medida que las células se dividen, las células hijas se propagan formando grupos y estructuras que permiten el paso de nutrientes a las bacterias que se encuentran en áreas más profundas dentro de la biopelícula.

Después de estos procesos ocurre un rápido incremento en la población descrito como fase de crecimiento exponencial. Este depende de la naturaleza del entorno tanto físicamente como químicamente. El rápido crecimiento ocurre a expensas de los nutrientes disponibles, en este punto la contribución química y física a la adhesión termina y los procesos biológicos comienzan a dominar.

La fase de crecimiento estacionario describe una fase donde el grado de división celular es igual al grado de muerte celular. Al comenzar la fase de muerte celular comienza también la ruptura de la biopelícula, las enzimas que se producen causan la descomposición de los polisacáridos que sujetan a las bacterias formadoras de la biopelículas, liberándose bacterias a la superficie.

Entre los factores del medio que influyen en el desarrollo de la biopelícula se encuentra el pH. Las bacterias responden a cambios en el pH interno y externo ajustando la actividad y la síntesis de proteínas asociadas con diferentes procesos celulares. Se ha demostrado que las bacterias pueden sobrevivir a un incremento gradual en la acidez en comparación con un incremento debido a la adición rápida de HCl. Lo anterior sugiere que las bacterias poseen mecanismos de adaptación que permiten a la población bacteriana adaptarse a cambios pequeños en la variación de pH del medio.

El crecimiento en comunidad parece ser una estrategia de sobrevivencia guardada en componentes genéticos que regulan el arreglo superficial, la comunicación intracelular y la síntesis de sustancias extracelulares poliméricas, las cuales facilitan la tolerancia a un medio ambiente de estrés.

La formación de biopelícula ha sido descrita como un importante factor teniendo implicaciones significativas en la virulencia patógena, además protege a las bacterias del efecto inhibitorio de antibióticos y de las células inmunes por que previenen su penetración efectiva (Ábalos, 2005; Herrera 2004).

Materiales Cerámicos

En las últimas décadas se ha incrementado considerablemente el uso de los materiales cerámicos con aplicaciones biomédicas por lo que muchas investigaciones tienen como objetivo el desarrollo de materiales cerámicos como sustratos de células para promover su proliferación sobre este tipo de materiales, aprovechándose sus propiedades mecánicas como porosidad y rugosidad y su baja toxicidad (Cormack y col., 2012).

Se ha descubierto que algunos de estos materiales, como el TiO_2 y la hidroxiapatita, tienen la propiedad de favorecer la proliferación celular. Particularmente se tienen reportes de TiO_2 y titanatos de bario empleados para el cultivo de células tipo osteoblastos, en los cuales se evalúa la proliferación, viabilidad, morfología y actividad metabólica de células cultivadas sobre estos compuestos (Frances y col., 2009; Haixin Zhao y col., 2011; Chih-Yao y col., 2009).

Existen también reportes sobre la posible aplicación de cerámicos de tipo hidroxiapatita como transportadores de células madres en cultivos celulares favoreciendo su adhesión y proliferación celular (Ivanchenko y col., 2012).

Estudios recientes reportan la actividad de algunos cerámicos y materiales de tipo hidroxiapatita (HA) sobre diferentes tipos de células, se reportó, por ejemplo, sobre la actividad fotocatalizadora del TiO_2 , utilizado en la industria eléctrica y electrónica, sobre células de cáncer de cuello uterino (HeLa) (Camargo y col., 2012).

Por otra parte, se han sintetizado nanotubos de TiO_2 los cuales mostraron una sustancial mejora en la adhesión-propagación de osteoblastos de ratón. La estructura de nanotubo, indujo la aceleración significativa de la velocidad de crecimiento de osteoblastos entre un 300 a 400% (Seunhan Oh y col., 2006).

Aunque la búsqueda de nuevos materiales y compuestos con aplicaciones en medicina se enfoca en ocasiones a la regeneración de tejidos y la formación de tejido nuevo (Cormack y Tilocca., 2012), recientemente se ha reportado el crecimiento de *Mtb* en soportes porosos como Al_2O_3 , wollastonita (CaSiO_3) e hidroxiapatita (Hertog y col., 2010; Monge y col., 2012).

Además se ha descubierto que la presencia de calcio en un 34-40% en soportes de hidroxiapatita se relaciona con la formación de biopelículas de *Mtb* sobre este tipo de soportes ya que esta bacteria crece en hueso donde el calcio y la hidroxiapatita son unos de los principales constituyentes (Monge y col., 2012).

Con base a lo antes expuesto, consideramos importante evaluar como soportes para crecimiento de *Ms* (como modelo del crecimiento de *Mtb*) a la hidroxiapatita en combinación con otros materiales que promuevan la proliferación celular como el TiO_2 . Los titanatos como In_2TiO_5 y Sc_2TiO_5 , que también serán evaluados, no tienen reportes en la literatura científica como sustratos para adhesión celular; sin embargo, sí se han estudiado los efectos fotocatalíticos sobre sangre humana de In_2TiO_5 e incluso de TiO_2 al irradiar con luz UV, reportándose en sangre un incremento en la concentración de oxígeno

elemento que como ya se mencionó, es necesario para el crecimiento de *M. tuberculosis* (Subrahmanyam y col., 2007).

Además se propone investigar si la exposición a luz solar mejora el crecimiento de *Ms* sobre los materiales propuestos ya que existen reportes de la potencialidad de la luz UV para incrementar significativamente la adhesión celular sobre placas de titanio expuestas previamente a irradiación UV. El efecto fotocatalítico producido en este material durante 20 minutos con luz UV, es suficiente para modificar la superficie del Ti e incrementar la adhesión celular (Scougall y col., 2011).

En cuanto a las propiedades de fotocatalisis que presentan los materiales empleados en este proyecto, existen reportes de la mayor actividad fotocatalítica de In_2TiO_5 que la de TiO_2 (Weng-Deng y col., 2007). Y recientemente se ha reportado que comparado con In_2TiO_5 , Sc_2TiO_5 es más sensible a la radiación beta y gamma (Durán y col., 2012).

In_2TiO_5 es un óxido ternario de estructura cristalina abierta que ha sido ampliamente estudiado principalmente debido a su resistencia al ambiente. La síntesis del titanato de indio, In_2TiO_5 , se realiza mediante la reacción de estado sólido de In_2O_3 (óxido de indio) y TiO_2 (Senegas y col. 1975). Sus primeras aplicaciones han sido como filtro (bypass), microcapacitor, cerámico refractario y como fotocatalizador (Wen-Deng y col., 2007).

El compuesto Sc_2TiO_5 , ha sido sintetizado por reacción de estado sólido y también por el método de flujo (Ito, 1971) y se ha reportado su caracterización cristalográfica. Sin embargo, se desconocen muchas de sus propiedades fisicoquímicas.

En este trabajo se llevó a cabo la síntesis de titanato de indio y titanato de escandio mediante reacción de estado sólido. Los titanatos fueron caracterizados estructuralmente por microscopía electrónica de barrido, EDS y difracción de rayos X. El TiO_2 se utilizó como está disponible comercialmente.

Este proyecto de investigación planteó el uso de materiales cerámicos como soportes de crecimiento de *Mycobacterium smegmatis* como un modelo de *tuberculosis* H37Rv con el objetivo de mejorar el crecimiento celular de la bacteria, favoreciendo con ello la disminución del tiempo que se requiere para el aislamiento e identificación de *Mycobacterium tuberculosis*.

Fotocatálisis

La fotocatalisis es el proceso en el cual la luz puede reducir la energía de activación de una reacción química. La participación de un material semiconductor como fotocatalizador en este fenómeno puede ser explicada mediante la teoría de bandas.

Teoría de Bandas

En la estructura de un sólido los átomos están empaquetados muy cerca uno del otro, de tal manera que se generan traslapes de orbitales atómicos de diferentes conjuntos de átomos, a los cuales, la teoría de bandas considera como orbitales moleculares con niveles de energía tan próximos entre sí que podemos pensar en estos como un intervalo continuo de energías (Smart col., 1995).

A un grupo de orbitales moleculares con similares intervalos de energía permitidas se le llama “banda de energía” que son formadas por diferentes tipos de orbitales atómicos que pueden ser parte de orbitales moleculares de enlace o de antienlace (Smart col., 1995).

Así los electrones en un cristal están repartidos en bandas de energía de conducción y de valencia, separadas por “bandas prohibidas” o “bandas gap”. La banda de menor energía es la banda de valencia y en aislantes en el cero absoluto esta banda se encuentra llena, mientras que están vacantes todos los

estados de la banda de conducción. La banda de conducción es la más externa y a la que pasa un electrón cuando se excita térmicamente al aumentar la temperatura o al adquirir suficiente energía para saltar la banda prohibida y dejar la banda de valencia durante la conducción eléctrica (McKeever, 1985).

La “banda prohibida” o “banda gap” es la diferencia de energía entre el punto más bajo de la banda de conducción y el más elevado de la banda de valencia. Son regiones de energía en las que no existen orbitales electrónicos ondulatorios y en las que teóricamente no pueden encontrarse electrones (McKeever 1985; Kittel, 1997).

En los materiales semiconductores, la banda prohibida tiene una anchura pequeña, por lo que al haber una excitación cada vez más electrones adquieren la energía suficiente para superarla (Burbano y col., 2003).

Materiales Fotocatalíticos

Los materiales semiconductores, pueden funcionar como fotocatalizadores ya que cuentan con un ancho de banda prohibida lo suficientemente pequeño para que los electrones absorban la energía de fotones de luz y logren pasar de la banda de valencia a la banda de conducción, la combinación de uno de esos electrones con alguno de los huecos o defectos en el material (pares electrón-hueco) produce la emisión de fotones de luz que son las responsables de llevar a cabo las reacciones químicas implicadas, en este caso la formación de H_2 y O_2 mediante la escisión de moléculas de H_2O (Figura 1).

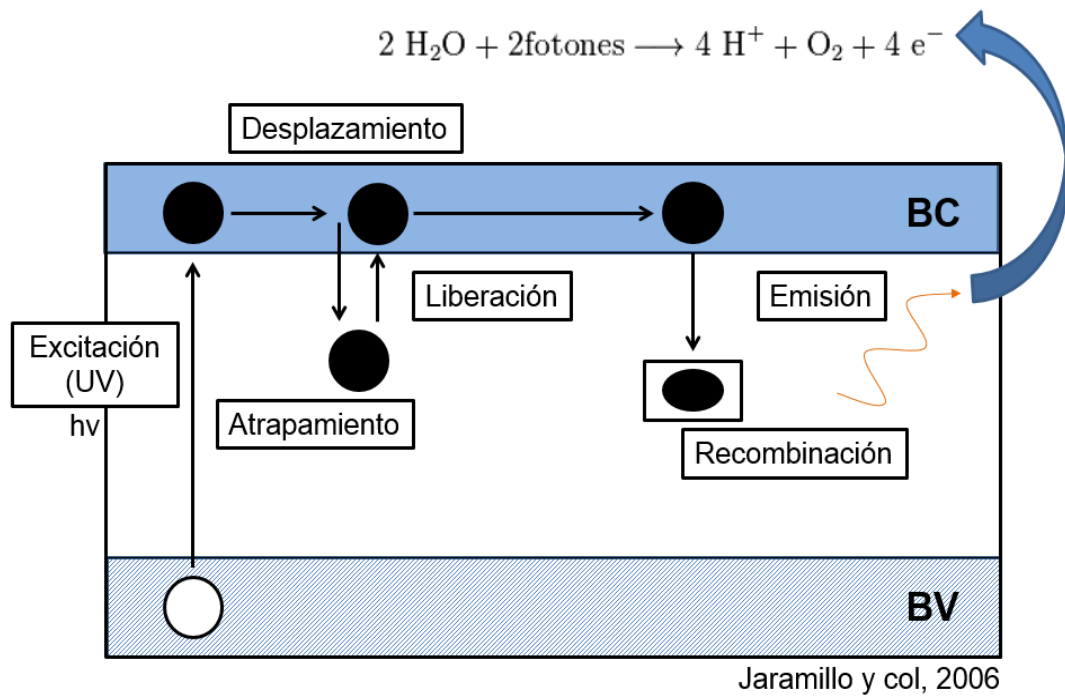


Figura 1. Representación del fenómeno fotocatalítico.

De acuerdo al potencial de estos semiconductores para la oxidación o reducción del agua se pueden dividir en tres grupos: los materiales reductivos que reducen el agua y generan $H_{2(g)}$, los materiales redox que pueden oxidar y reducir el agua, así como en materiales oxidativos que pueden producir la oxidación del agua y generar O_2 , ya que la banda de valencia está localizada a un potencial energético suficientemente negativo. Sin embargo el potencial de reducción de la banda de conducción es insuficiente para reducir el agua (Rodríguez y col., 2005).

METODOLOGÍA

Materiales y Equipo

Se contó con acceso al laboratorio de estado sólido del Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales en la Universidad de Sonora en donde se dispuso del siguiente equipo y material necesario para síntesis de materiales y para la elaboración de soportes de los diferentes materiales, entre ellos morteros de ágata y moldes de acero Carver modelo 4359, así como una prensa hidráulica Carver modelo C y horno Thermolyne modelo FB1300.

En dicho laboratorio se cuenta además con un microscopio electrónico Jeol modelo JSM-5410LV equipado con un sistema EDS (Energy Dispersive Spectroscopy, por sus siglas en inglés) de la marca Oxford.

El análisis de difracción de rayos-X (DRX) de los materiales se llevó a cabo en un Difractómetro de Rayos X de polvos Bruker AXS D8 Advance, equipado con una fuente de radiación de Cu y monocromador de grafito. Las condiciones para la obtención de los difractogramas son 45 kV y 40 mA, con una velocidad de $2^\circ/\text{min}$ (en 2θ) y un intervalo de 0.02° en el rango de $10-70^\circ$ (en 2θ).

Los materiales fueron sintetizados a partir de los siguientes óxidos obtenidos de manera comercial: TiO_2 (óxido de titanio) Rare Metallic 99.9%, In_2O_3 (óxido de indio) Rare Metallic 99.9% y Sc_2O_3 (óxido de escandio) Rare Metallic 99.9%. Se utilizó Etanol marca Merck 99.9% para homogenizar las mezclas de los materiales.

En el Departamento de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad de Sonora se dispuso del equipo necesario para llevar a cabo los ensayos en microplaca con la bacteria; utilizando una campana de bioseguridad Logic clase II tipo A2 de Labconco, micropipetas marca labnet, micropipeta multicanal marca labnet; los medios de cultivo y reactivos necesarios proporcionados por

el mismo departamento fueron: medio Middlebrook 7H9 (MDB) suplementado con OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa), Gentamicina, Resazurina, Hidroxiapatita (34-40% Ca) Aldrich. Se utilizó un Turbidímetro y material para cultivo en placas de 96 pozos.

Se utilizó además el Equipo SDT 2960 simultaneous DSC-TGA marca TA instruments para el análisis termogravimétrico y un Medidor de Oxígeno Fisher Scientific proporcionados por el Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia.

Síntesis de Materiales

Las síntesis de In_2TiO_5 (titanato de indio) y Sc_2TiO_5 se llevaron a cabo mediante reacción de estado sólido en el laboratorio de Estado Sólido del Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales (DIPM) de la Universidad de Sonora.

Para la síntesis del titanato de indio, los reactivos de partida In_2O_3 y TiO_2 (en relación 1:1 molar), fueron llevados a molienda en un mortero de ágata durante 25 min hasta obtener un polvo fino, durante la molienda del material se añadió alcohol etílico, para una mejor homogenización de la mezcla de reactivos. Posteriormente la mezcla se moldeó en forma de pastilla para ser horneada a $1300\text{ }^\circ\text{C}$ durante 48 h en un crisol de alta alúmina.

La síntesis de Sc_2TiO_5 procedió del mismo modo que en la reacción recién descrita, a partir de la mezcla de Sc_2O_3 y TiO_2 en forma de pastillas tratadas a $1100\text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 h en crisoles de alta alúmina.

El avance de la reacción fue monitorizado mediante difracción de rayos X del bulto de reacción, en caso de ser necesario, las pastillas regresarán a molienda seguido de horneado, hasta obtener los patrones de difracción esperados.

El TiO_2 empleado fue el disponible comercialmente de la marca Rare Metallic con pureza del 99.9%.

Para la obtención de las mezclas de TiO_2 , In_2TiO_5 y Sc_2TiO_5 con hidroxiapatita en diferentes proporciones, los reactivos fueron sometidos a molienda en un mortero de ágata durante 25 min hasta obtener un polvo fino, durante la molienda del material se añadió alcohol etílico, para una mejor homogenización de la mezcla de reactivos.

Con el objetivo de obtener soportes de las mezclas preparadas que sean resistentes, insolubles y con la adecuada porosidad, se establecieron las condiciones de compresión, tiempo y temperatura de sinterizado.

Preparación de los Soportes Cerámicos

Se pesaron 0.050 g de cada una de las mezclas preparadas de los material cerámicos en una balanza Mettler Toledo modelo ML54/03 type Newclassic ML, una vez pesado el material se realizó un prensado uniaxial en una prensa manual Pellet Press, utilizando dados de acero inoxidable para dar una forma a los soportes.

Caracterización por Difracción de Rayos-X de Polvos

El análisis de difracción de rayos-X (DRX) de las muestras se realizó en un Difractómetro de Rayos X de polvos Bruker AXS D8, equipado con una fuente de radiación de Cu y monocromador de grafito.

Análisis Termogravimétrico y Térmico Diferencial (TGA/DTA)

Se llevó a cabo un análisis termogravimétrico y térmico diferencial en un equipo SDT 2960 simultaneous DSC-TGA marca TA instruments utilizando el software Thermal Advantage, con el objetivo de conocer la temperatura óptima de

sinterizado de las mezclas HA:TiO₂, HA:In₂TiO₅ y HA:Sc₂TiO₅ en diferentes proporciones.

Caracterización por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Se realizaron microscopías electrónicas de barrido de las muestras utilizando un microscopio electrónico marca Jeol modelo JSM-5410LV con el objetivo de observar la porosidad de las distintas mezclas de óxidos. Para conocer la composición elemental semicuantitativa en las mezclas se empleó el análisis elemental mediante EDS (energy dispersive scanning).

Para observar el crecimiento de la bacteria y la formación de la biopelícula se obtuvieron las micrografías de los soportes utilizados en ensayos de resazurina en microplaca.

Prueba de Solubilidad

Se colocaron pastillas de 0.050 g de las diferentes mezclas y sinterizadas bajo diferentes condiciones en tubos con 200 µL de agua o medio Middlebrook 7H9 (MDB). Con este experimento se seleccionaron las condiciones de sinterizado para obtener soportes que no se deformaran en el medio de cultivo.

Análisis de Resistencia al Tratamiento de Esterilización

Se sometieron a esterilización por autoclave a los diferentes soportes preparados bajo diferentes condiciones de sinterizado y que resultaron insolubles en el medio de cultivo, así se establecieron las condiciones de preparación de soportes que no experimentarían algún daño debido al proceso de esterilización.

Análisis de la Concentración de Oxígeno

Para aumentar la concentración de oxígeno disponible para el metabolismo y crecimiento de *M. smegmatis* mediante efecto fotocatalítico, los soportes de los materiales seleccionados se expusieron a la luz solar en medio MDB y la presencia de oxígeno fue monitorizada mediante el análisis de oxígeno disuelto.

Para obtener el porcentaje de oxígeno disuelto en el medio de cultivo Middlebrook 7H9 (MDB) suplementado con OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa) se utilizó un Medidor de Oxígeno Disuelto Fisher Scientific. El porcentaje de oxígeno fue monitorizado después de exponer a luz solar durante 30 min y 60 min muestras de 1 gr de la mezcla HA:In₂TiO₅ en medio de cultivo. Se realizaron comparaciones entre los resultados obtenidos en agua destilada en lugar de medio de cultivo. Se utilizaron controles de medio de cultivo sin pastilla así como medio de cultivo y agua aireados.

Con el fin de conocer el crecimiento de *M. smegmatis* con la formación de biopelículas sobre los soportes, además de evaluar la drogasusceptibilidad de *M. smegmatis* a gentamicina en presencia o ausencia de las mezclas de los materiales cerámicos propuestos, se llevaron a cabo los experimentos descritos a continuación.

Ensayo de Resazurina en Microplaca (REMA)

Se realizó un ensayo de susceptibilidad a gentamicina adicionando 100 µL de medio Middlebrook 7H9 (MDB) suplementado con OADC a los pocillos de una placa con 96 pozos. Se adicionó después 100 µL de gentamicina con una concentración inicial de 60 µg/mL realizando diluciones seriadas 1:2 en los pozos, quedando todos con un mismo volumen. Se prepararon filas de pozos con y sin soportes que contenían medio de cultivo y las diferentes concentraciones de gentamicina.

Después de haber colocado el soporte en los pozos correspondientes y de exponerlos a luz solar, se adicionó el inóculo 1:25 de *M. smegmatis* a los pocillos a estudiar, el cual se obtuvo de colonias de 3 días de crecimiento en medio Löwenstein-Jensen, diluyendo con solución salina estéril isotónica y ajustando al patrón de turbidez número 1 de McFarland.

Como controles se utilizaron pozos que contenían Middlebrook 7H9 suplementado con OADC, otro pozo con Middlebrook 7H9 suplementado con OADC y gentamicina, Middlebrook 7H9 suplementado con OADC con soporte, Middlebrook 7H9 suplementado con OADC con gentamicina y soporte, Middlebrook 7H9 suplementado con OADC con el inóculo de TB 1:50.

La placa se incubó por 5 días a 37 °C para después agregar 30 µL de Resazurina a los pocillos controles y se incubó de nuevo durante 24 horas a 37 °C, transcurrido este tiempo se agregó resazurina a los pocillos a evaluar y la placa se reincubó por 48 horas a 37°C. Se realizaron lecturas visuales a las 24 y 48 horas. Aquellos pozos que presentaron un color azul se consideraron sin crecimiento, mientras que un color rosa o violeta, producto de la reducción de resazurina, se consideraba como pozos con crecimiento de *M. smegmatis*.

RESULTADOS

La síntesis de los materiales cerámicos In_2TiO_5 y Sc_2TiO_5 por reacción de estado sólido se realizaron a temperaturas de 1300 y 1100 °C respectivamente. Los polvos finos de ambos materiales fueron analizados por DRX. No se observaron los picos de difracción de los materiales de partida, por lo que se consideró que la reacción fue completa.

Las mezclas de HA con cada uno de los materiales sintetizados (In_2TiO_5 y Sc_2TiO_5) y con TiO_2 obtenido de manera comercial (HA: TiO_2 , HA: In_2TiO_5 y HA: Sc_2TiO_5) fueron preparadas en un mortero de ágata mediante moliendas de 25 minutos homogeneizando con etanol 99.9% y en proporciones entre titanato (In_2TiO_5 , Sc_2TiO_5 o TiO_2) con HA de 1:1, 1:5 y 1:10 respectivamente.

Las mezclas en proporción 1:5 y 1:10 de los materiales no se compactaron en forma de soporte o formaban un soporte muy débil que se deformaba al sacarlo del molde. Por lo que se seleccionaron los soportes de las mezclas en proporción 1:1.

El prensado de las mezclas de los materiales se realizó en una prensa hidráulica empleando moldes de acero; se aplicaron diferentes presiones comenzando con 0.1 ton hasta 2 ton y diferentes tiempos de compresión entre 10 segundos y 2 minutos para determinar las condiciones de presión y tiempo de prensado óptimos.

Se prepararon soportes de aproximadamente 50 mg de masa de cada una de las mezclas (Figura 2). Se establecieron las condiciones de compresión en 0.5 ton de presión durante 10 segundos para el moldeo de todos los soportes; al ejercer una presión menor o durante menos tiempo, los soportes obtenidos se deshacían al retirarlos del molde o al colocarlos dentro de los crisoles.



Figura 2. Soportes de la mezcla de HA:TiO₂ en proporción 1:1 (en relación molar).

Para mejorar la firmeza y resistencia mecánica de los soportes se sometieron a un tratamiento térmico de sinterizado.

Para determinar la temperatura de sinterizado de las mezclas se realizaron análisis de TGA a soportes de las mezclas en proporción 1:1 de HA:TiO₂, HA:In₂TiO₅ y HA:Sc₂TiO₅, así como a soportes de HA, TiO₂, In₂TiO₅ y de Sc₂TiO₅. Se obtuvieron mediante el análisis de los datos en el programa Origin 8.5, las curvas de peso contra temperatura, mismas que permitieron relacionar la pérdida de peso con la reacción de los materiales en las mezclas las cuales provienen de la pérdida de grupos OH o de la descomposición de alguno de los componentes.

En las figuras 3, 4 y 5 se muestra la pérdida de peso contra temperatura de soportes de cada una de las mezclas en proporción 1:1 en diferentes proporciones, así como de los materiales que conforman las mezclas por separado. Los soportes fueron sinterizados previamente a 1200 °C, y en el análisis, el incremento de la temperatura se llevó a cabo en una rampa de 10 °C/min hasta 1400 °C con flujo de aire constante.

Se observó un comportamiento no lineal, es decir que los materiales presentes en los soportes preparados con las mezclas de los materiales no pierden el mismo peso conforme se incrementa la temperatura con respecto a cuando se calientan individualmente cada componente, lo que indica que en el caso de las mezclas HA:X existe una posible interacción entre los componentes que da lugar a la formación de nuevos compuestos.

A partir de la gráfica que se muestra en la figura 5 se seleccionó la temperatura de 1200 °C, en la cual se observa un cambio pronunciado en el peso, para realizar DRX a los soportes tratados térmicamente a esa temperatura durante diferentes tiempos.

Se obtuvo el difractograma de rayos X para la mezcla en polvo de HA:TiO₂ en proporción 1:1 sinterizada como soporte a 1200 °C durante una

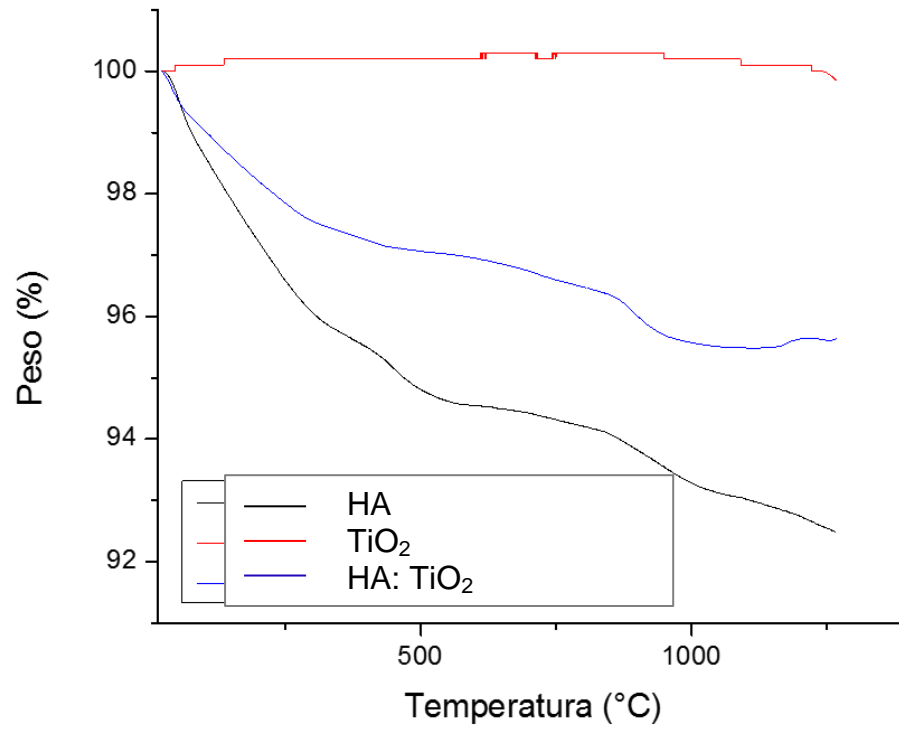


Figura 3. Análisis TGA de la mezcla HA:TiO₂ 1:1.

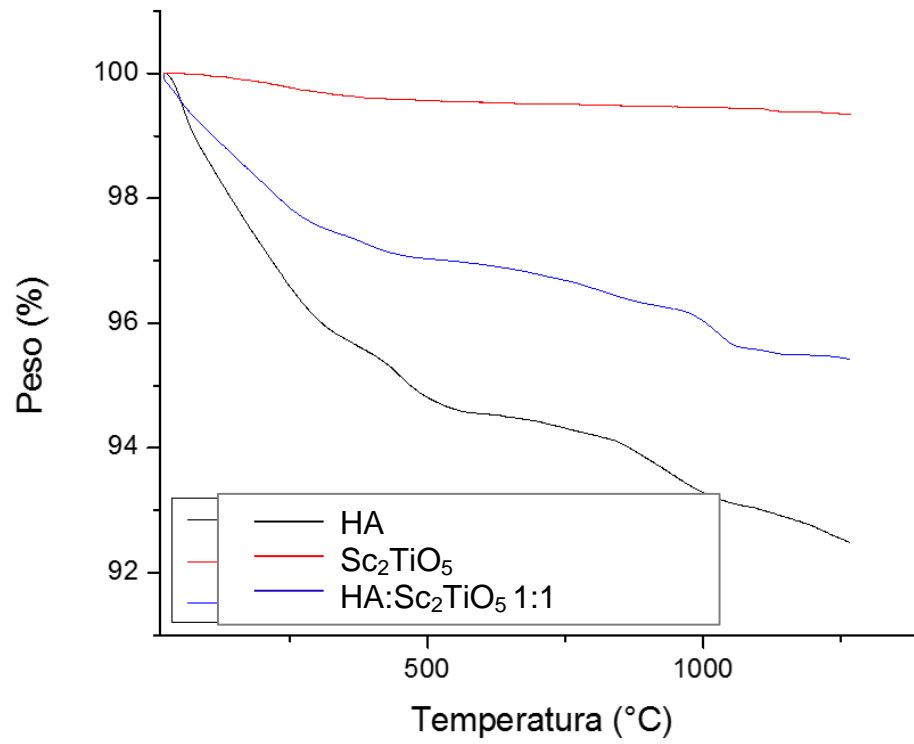


Figura 4. Análisis TGA de la mezcla HA:Sc₂TiO₅ 1:1.

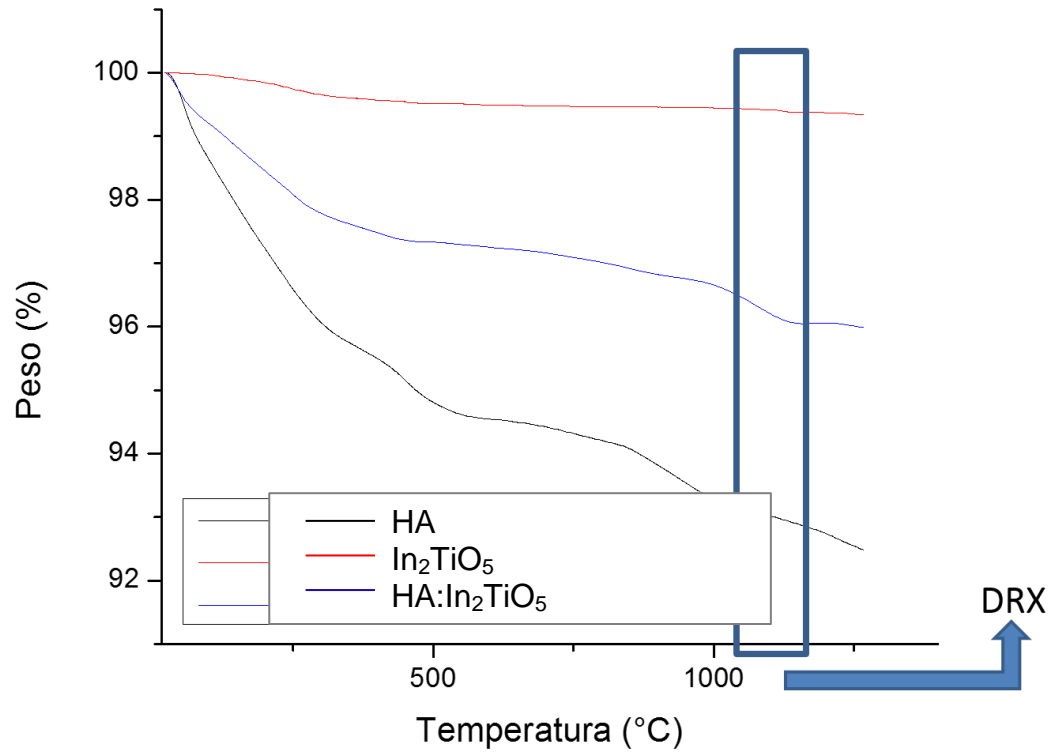


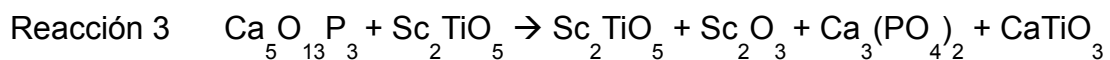
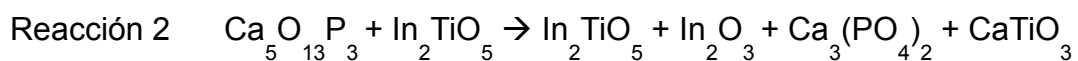
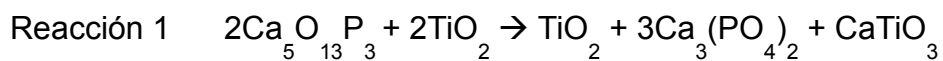
Figura 5. Análisis TGA de la mezcla HA:In₂TiO₅ 1:1.

hora. Se encontró la formación de perovskita (CaTiO_3) así como la presencia de TiO_2 fase rutilo y de apatita (Figura 6).

Se obtuvieron difractogramas de rayos X para las mezclas en polvo de $\text{HA:In}_2\text{TiO}_5$ y de $\text{HA:Sc}_2\text{TiO}_5$ en proporción 1:1 sinterizada como soporte a 1200°C durante una hora (Figura 7 y 8) donde de igual manera se observan diferentes productos de la reacción entre la HA y los titanatos.

Se sinterizaron soportes a la misma temperatura de 1200°C pero durante un mayor tiempo comenzando por 24 h hasta 48 horas para el caso de los soportes de las mezclas $\text{HA:In}_2\text{TiO}_5$ y de $\text{HA:Sc}_2\text{TiO}_5$ y hasta 96 horas para los soportes de HA:TiO_2 , con el objetivo de que al haber reacción entre los componentes de la mezcla durante ese tiempo disminuyera el número de componentes en la misma.

Se realizó DRX a las mezclas en polvo de los materiales sinterizados como soportes, donde se continuaron observando patrones de difracción correspondientes a diferentes compuestos productos de la reacción entre los componentes de la mezcla estando presente en todos los casos, compuestos de tipo perovskita. A continuación se presentan las reacciones que se presentaron en los soportes en base a los resultados de la DRX bajo las condiciones de sinterizado anteriormente mencionadas:



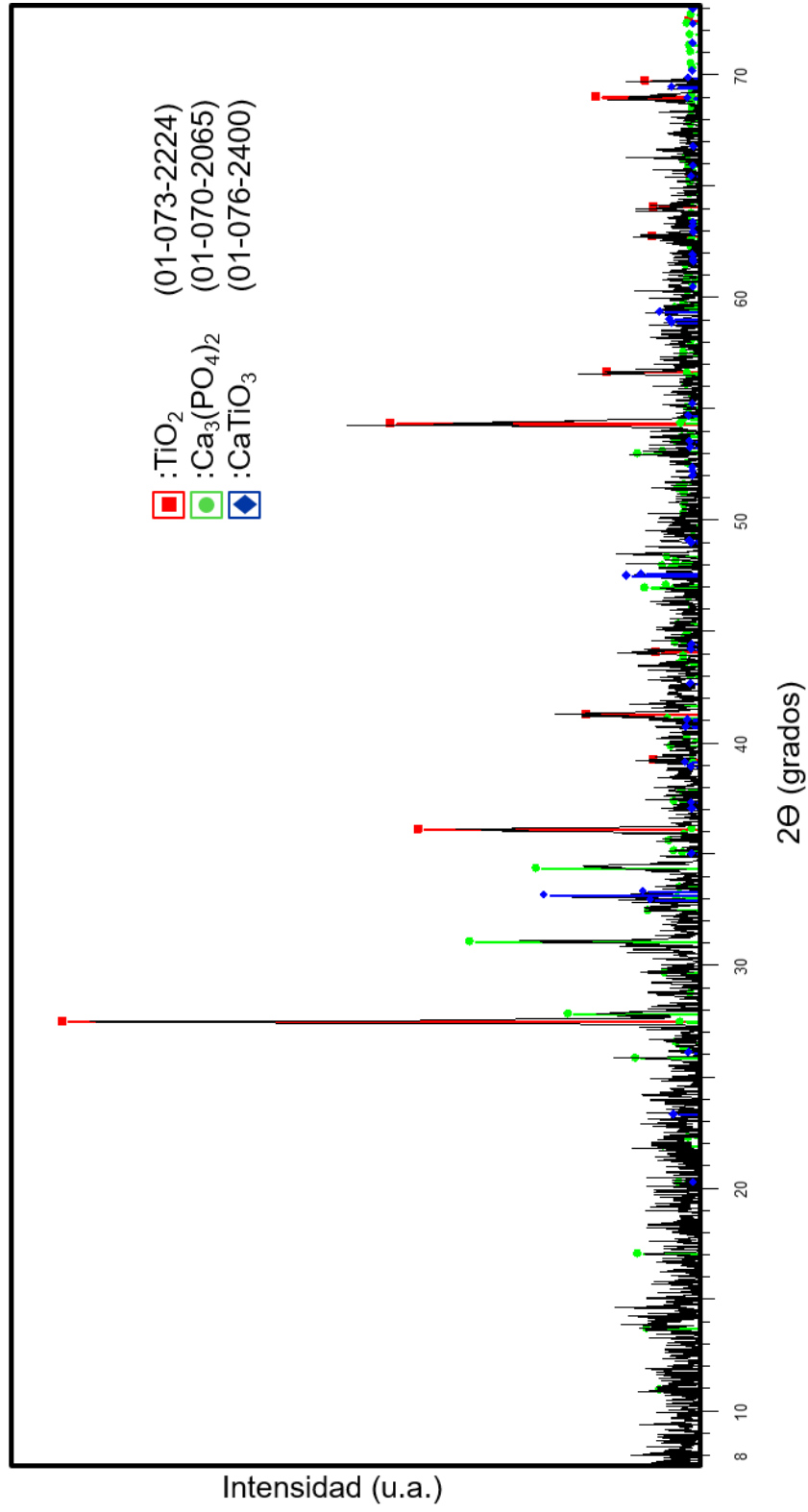


Figura 6. Difractograma de Rayos X de la mezcla HA:TiO₂ 1:1 sinterizada a 1200 °C durante 96 horas.

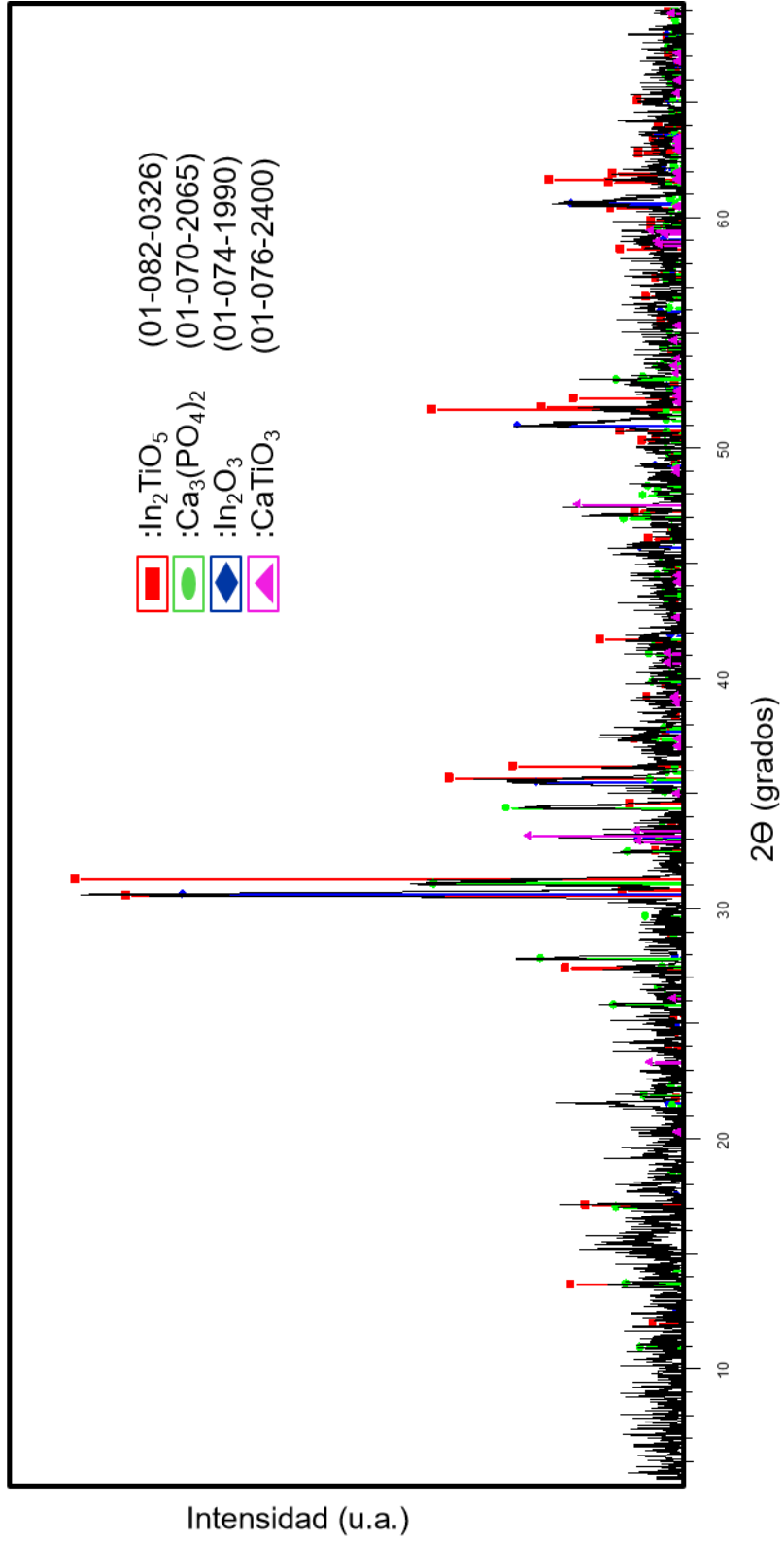


Figura 7. Difractograma de Rayos X de la mezcla HA:In₂TiO₅ 1:1 sinterizada a 1200 °C durante 48 horas.

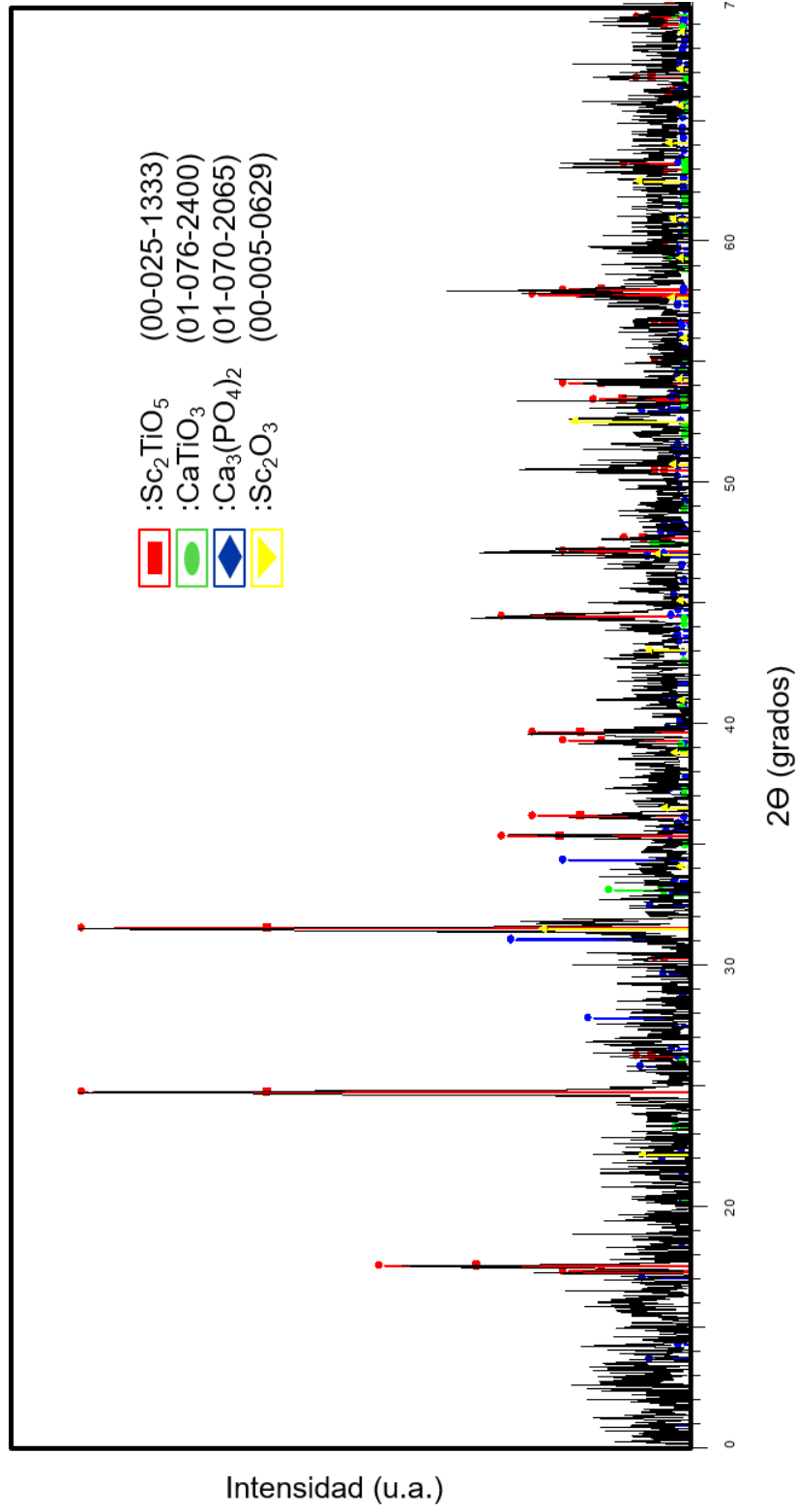


Figura 8. Difractograma de Rayos X de la mezcla HA:Sc₂TiO₅ 1:1 sinterizada a 1200 °C durante 48 horas.

En base a los resultados de la DRX realizada a los soportes de los diferentes materiales mismos que fueron sometidos a tratamiento térmico durante diferentes tiempos, se seleccionaron las condiciones de calentamiento de 48 horas a 1200 °C para los soportes de HA:TiO₂ y de 24 horas a 1200 °C para los soportes de HA:In₂TiO₅ y de HA:Sc₂TiO₅.

Una vez establecidas las condiciones para la obtención de soportes resistentes e insolubles se evaluó su resistencia al tratamiento de esterilización en autoclave a 121 °C y 15 libras de presión durante 20 minutos; todos los soportes resistieron el tratamiento de esterilización, lo que permitió que fueran utilizados en los ensayos en microplaca donde se requiere la descontaminación de los soportes antes de entrar en contacto con la bacteria.

Mediante MEB se obtuvieron las micrografías de los soportes de HA:TiO₂ en proporción 1:1 obtenidos a las condiciones de prensado y de temperatura de sinterizado establecidas para las mezclas (Figura 9 y 10). Se observó la formación de soportes porosos en la superficie y en su interior. Lo cual resulta de interés ya que favoreció el crecimiento de la bacteria sobre los soportes puesto que se ha relacionado de manera directa la porosidad de los materiales con el favorecimiento de la adhesión celular sobre la superficie de los mismos (Annaz y col., 2004).

Existen reportes sobre la relación entre porosidad y aumento en la densidad bacteriana en algunas superficies de titanatos (Annaz y col., 2008); sin embargo, la porosidad no es el único factor que podría contribuir o favorecer el crecimiento de la bacteria.

Con el objetivo de conocer la composición cualitativa del soporte observado por MEB se realizó un análisis de EDS. Fue necesario un tratamiento previo de los soportes embebiéndolos en resina epóxica para obtener una superficie más plana sobre la cual realizar el análisis.

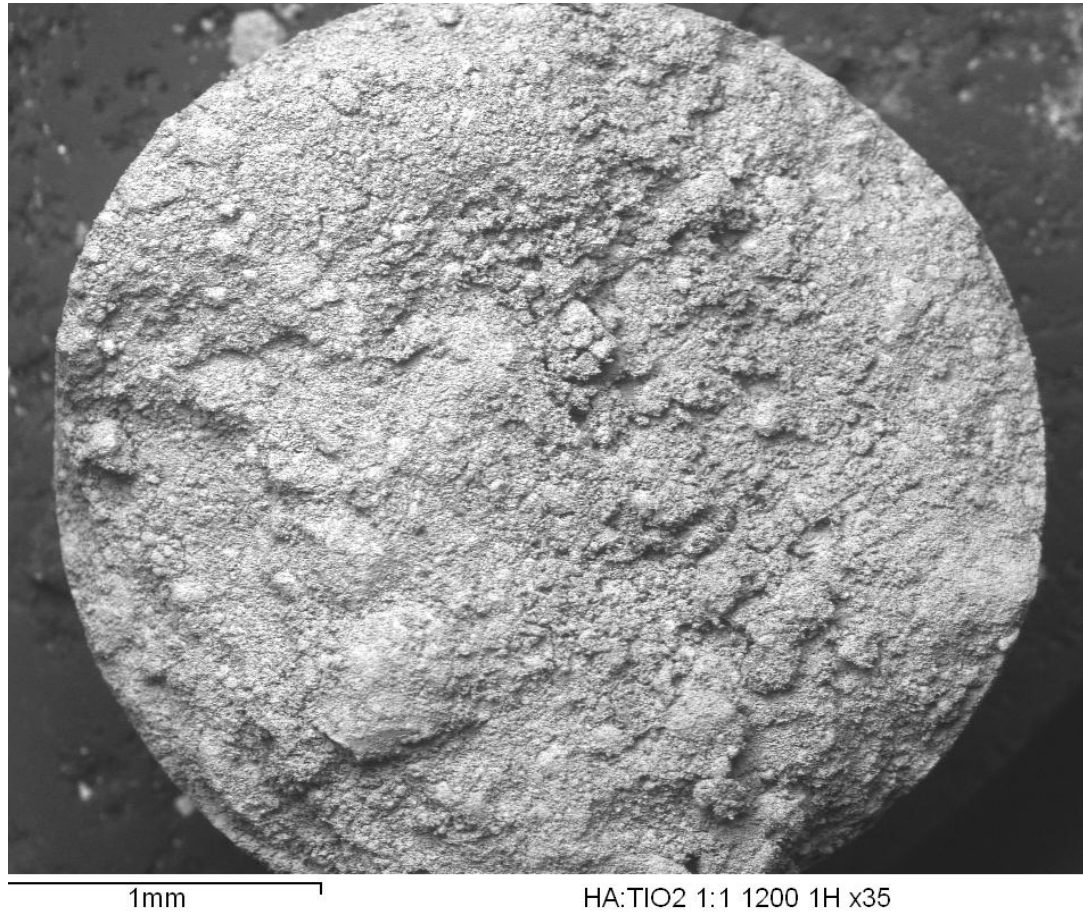


Figura 9. Micrografía de un soporte de HA:TiO₂ en proporción 1:1 sinterizado a 1200 °C.

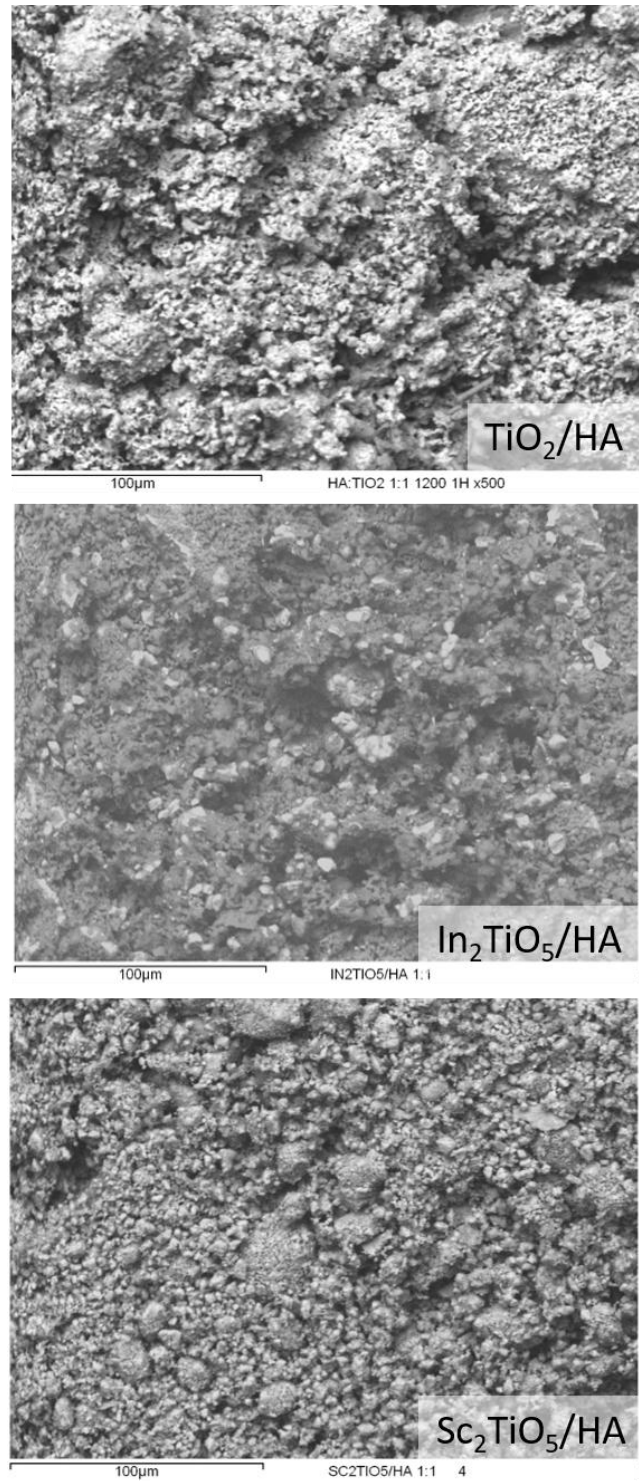


Figura 10. Imágenes obtenidas de MEB a varias magnificaciones para soportes de las diferentes mezclas en proporción 1:1 sinterizada a 1200 °C.

En la figura 11 se distinguen las áreas correspondientes a cada compuesto e identificadas mediante EDS. Se puede observar el efecto del sinterizado sobre la interacción de las partículas de los diferentes materiales que componen al soporte, contribuyendo a la mejor resistencia y compactación del mismo. Se observan también áreas correspondientes a CaTiO_3 de tipo perovskita, uno de los compuestos formados durante el tratamiento térmico. Se ha reportado que CaTiO_3 tiene actividad fotocatalítica aún mayor que la de algunos otros tipos de titanatos al utilizarse luz solar (Sudhir y col., 2012).

Se comprobó la insolubilidad de los soportes previamente sinterizados de la mezcla $\text{HA}:\text{TiO}_2$ 1:1 en tubos con 200 μL de agua o medio Middlebrook 7H9 (MDB). Sin embargo los soportes de $\text{HA}:\text{In}_2\text{TiO}_5$ 1:1 no mantuvieron su forma después de 2 horas de inmersión en formaldehído. Este solvente se utilizó en la preparación de los soportes para su observación mediante MEB, por lo cual los soportes fueron fijados con formaldehído durante una hora después de ser utilizados en los ensayos REMA con *M. smegmatis*, para su posterior observación en MEB.

Para cumplir con el objetivo principal del presente trabajo los soportes porosos, insolubles y resistentes a los tratamientos de esterilización fueron evaluados como soportes para crecimiento de *M. smegmatis* y como se mencionó anteriormente, el ensayo REMA, nos permitió evaluar en presencia y ausencia de los soportes la susceptibilidad de la bacteria a gentamicina, antibiótico al cual *M. smegmatis* es susceptible.

En el ensayo REMA es posible obtener la concentración mínima inhibitoria (CMI) a la cual un antibiótico, en este caso la gentamicina, logra impedir el crecimiento de la bacteria. La resazurina es un indicador de viabilidad celular, el cual al entrar en contacto con enzimas mitocondriales procedentes de la bacteria, se oxida cambiando de color el medio en el cual se encuentra, con lo que se evidencia el crecimiento de la bacteria.

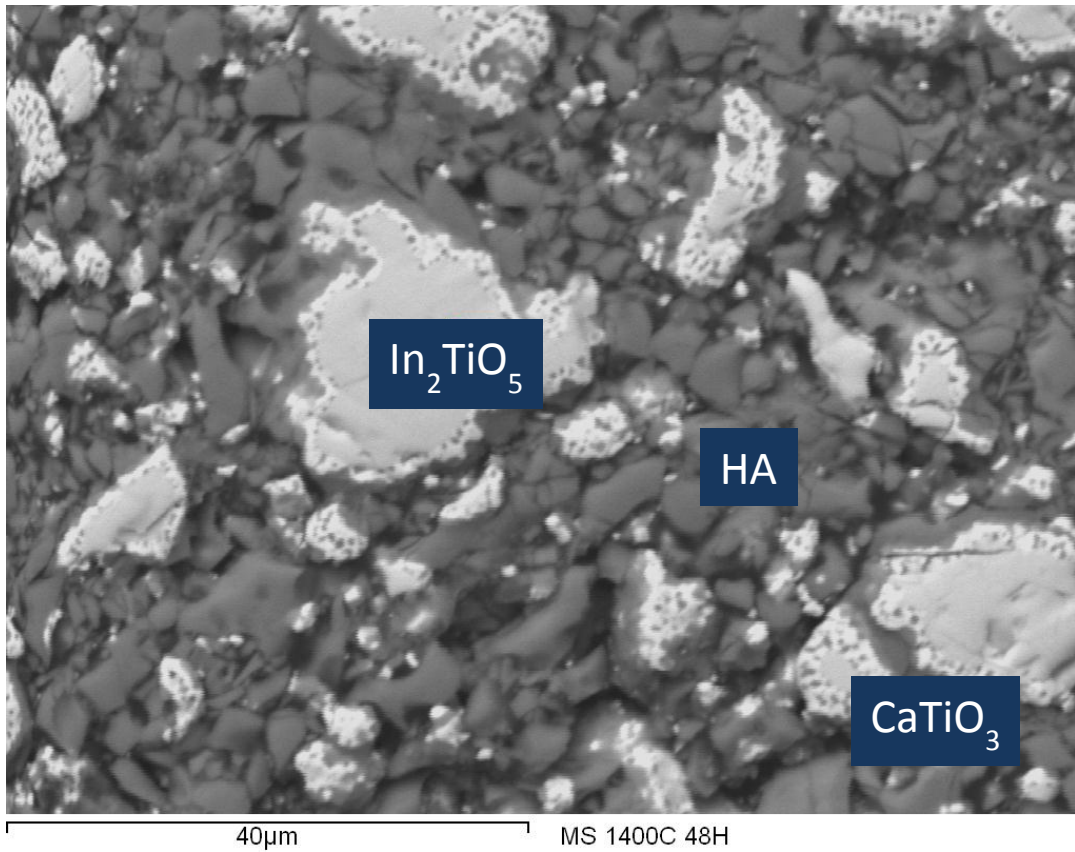


Figura 11. Fases identificadas mediante EDS realizado al soporte de $\text{HA}:\text{In}_2\text{TiO}_5$.

Mediante el ensayo REMA fue posible relacionar una CMI de gentamicina mayor para los ensayos donde se utilizaron los soportes, favoreciendo el crecimiento de la bacteria únicamente debido a la presencia de los soportes ya que se utilizaron controles de medio y del inóculo de *M. smegmatis*, de tal manera que al estar presente el soporte en el medio de cultivo y en presencia de la bacteria, la densidad celular aumenta requiriéndose una mayor concentración de antibiótico (CMI) para inhibir el crecimiento de la cantidad de bacterias presentes en comparación con la concentración que se requiere en los ensayos donde no se utilizaron los soportes.

En la figura 12 se representa el uso de una placa de 96 pozos donde se llevó a cabo el ensayo realizando diluciones seriadas de gentamicina en cada uno de los pozos a lo largo de una línea en la placa. Cada pozo contenía medio de cultivo y un inóculo de *M. smegmatis*; además, se representan aquellas líneas donde se colocaron los soportes y se muestra el cambio de color a rosa en aquellos pozos donde había crecimiento después de la incubación, permitiendo determinar la CMI en cada caso.

Se realizaron ensayos REMA donde, previo a la adición del inóculo de la bacteria a los pozos, las placas con medio de cultivo y antibiótico fueron expuestas a luz solar durante 30 y 60 minutos en presencia y ausencia de soportes, para evaluar el efecto fotocatalítico de los materiales sobre el crecimiento de la bacteria, interpretándose como favorable el aumento en la CMI.

Los resultados de los ensayos que se llevaron a cabo bajo diferentes condiciones por triplicado utilizando cada uno de los diferentes soportes se resumen en la Tabla I. La CMI obtenida al no utilizar soportes fue de 0.5 µg/mL de gentamicina, así que se esperaba obtener una CMI mayor al utilizar cada uno de los diferentes soportes según la hipótesis planteada. La CMI al utilizar HA como soporte fue de 1.0 µg/mL, como se ha mencionado este material es

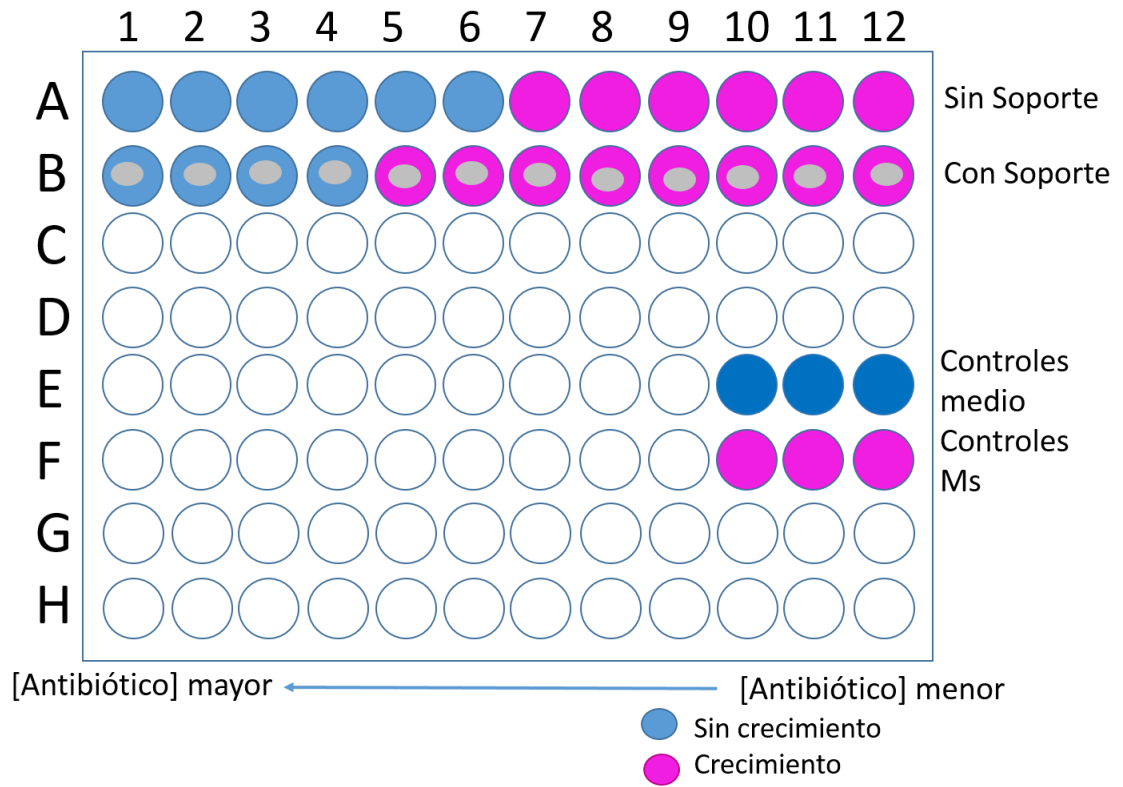


Figura 12. Representación del ensayo REMA. La concentración de antibiótico aumenta de derecha a izquierda.

uno de los constituyentes principales de los huesos humanos, tejido que puede ser infectado por la micobacteria.

Al utilizar los soportes de HA:TiO₂, HA:In₂TiO₅ y HA:Sc₂TiO₅ se esperaba obtener un aumento en la CMI en comparación con la obtenida al no utilizar soportes o al utilizar HA, sin embargo, al realizar ensayos con los soportes de HA:TiO₂ el resultado de la CMI fue menor que al utilizar HA, de hecho fue igual que sin utilizar soporte, lo anterior se podría explicar con base a reportes previos donde se encontró que los recubrimientos con TiO₂ en fase rutilo son termodinámicamente menos favorables al proceso de adhesión de bacterias en comparación a recubrimientos donde el TiO₂ está en fase anatasa; con base a los resultados de DRX obtenidos para los soportes que utilizamos en el ensayo el TiO₂ se encuentra presente en fase rutilo (Shuster y col., 2004).

Al comparar la CMI usando los soportes de HA:TiO₂ y sin usar soportes se encontró que el favorecimiento del crecimiento de la bacteria no depende del incremento de la superficie disponible para la formación de la biopelícula o el desarrollo de la bacteria. Los soportes de HA:In₂TiO₅ presentan la CMI más alta y los soportes de esta composición son los de menor tamaño después del sinterizado, que tiene un efecto de compactación del soporte. De hecho los soportes de HA poseen el mayor tamaño después del tratamiento térmico y sin embargo, no son los que presentan el más alto valor de CMI como se observa en la Tabla I.

Se requirió de una mayor concentración de antibiótico para inhibir el crecimiento de una mayor densidad de bacterias debido al favorecimiento del desarrollo de biopelícula de *M. smegmatis*. Al utilizar soportes de HA:In₂TiO₅ la CMI obtenida en este caso fue de cuatro veces mayor que en los ensayos donde no se empleó ningún soporte y del doble que las CMI obtenida al emplear soportes de HA:Sc₂TiO₅.

Tabla 1. Concentración mínima inhibitoria (CMI) en ensayos de susceptibilidad de *M. smegmatis* utilizando los diferentes soportes. Para su comparación se muestran los resultados de los soportes de HA:In₂TiO₅ expuestos a luz solar (LS) durante 30 y 60 minutos.

Soporte	CMI (µg/mL)
Sin soporte	0.5
HA	1.0
HA:TiO ₂	0.5
HA:Sc ₂ TiO ₅	1.0
HA:In ₂ TiO ₅	2.0
HA:In ₂ TiO ₅ + LS 30 min	4.0
HA:In ₂ TiO ₅ + LS 60 min	4.0

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

LS: Luz Solar

Debido al aumento considerable de la CMI al utilizar soportes de HA:In₂TiO₅, se seleccionó a dichos soportes para llevar a cabo ensayos en los cuales las placas fueron expuestas a luz solar (LS) antes de agregar el inóculo de *M. smegmatis* durante 30 minutos y 60 minutos. Con ello se esperaba cumplir con uno de los objetivos del presente trabajo, el de promover el incremento de la concentración de oxígeno en el medio para crecimiento de *Mycobacterium smegmatis*, mediante efecto fotocatalítico en las mezclas de HA:In₂TiO₅. Se ha comprobado la actividad fotocatalítica del In₂TiO₅ y que esta es mayor que la exhibida por el TiO₂ (Weng-Deng y col., 2007).

Se encontró que al utilizar luz solar la CMI fue de 4.0 µg/mL ocho veces mayor que la CMI de 0.5 µg/mL al no utilizar soportes. Es probable que la bacteria utilice para su metabolismo el oxígeno producido por fotocátalisis con lo cual se incrementa la densidad de bacterias en un menor tiempo. Con el fin de comprobar si la exposición a luz solar generó un aumento en la concentración de oxígeno se llevó a cabo la medición del porcentaje de oxígeno disuelto en medio de cultivo MDB 7H9 en botellas winkler utilizando pastillas de 1 gramo de HA:In₂TiO₅ y exposiciones a luz solar durante 30 y 60 minutos. Los resultados del porcentaje de oxígeno disuelto a diferentes tiempos después de la exposición a luz solar se muestran en la figura 13.

El experimento se llevó a cabo empleando 30 mL de medio MDB 7H9 y tres pastillas de 1 gr de la mezcla HA:In₂TiO₅ cantidades de medio y mezcla mucho mayores que las que se utilizaron en los ensayos REMA, lo anterior debido al volumen de las botellas winkler que el equipo utiliza para llevar a cabo las mediciones de oxígeno disuelto y a la sensibilidad del mismo. Los porcentajes fueron obtenidos comparando las concentraciones de oxígeno disuelto con una muestra aireada de medio MDB 7H9 considerada como el 100 % de oxígeno disuelto.

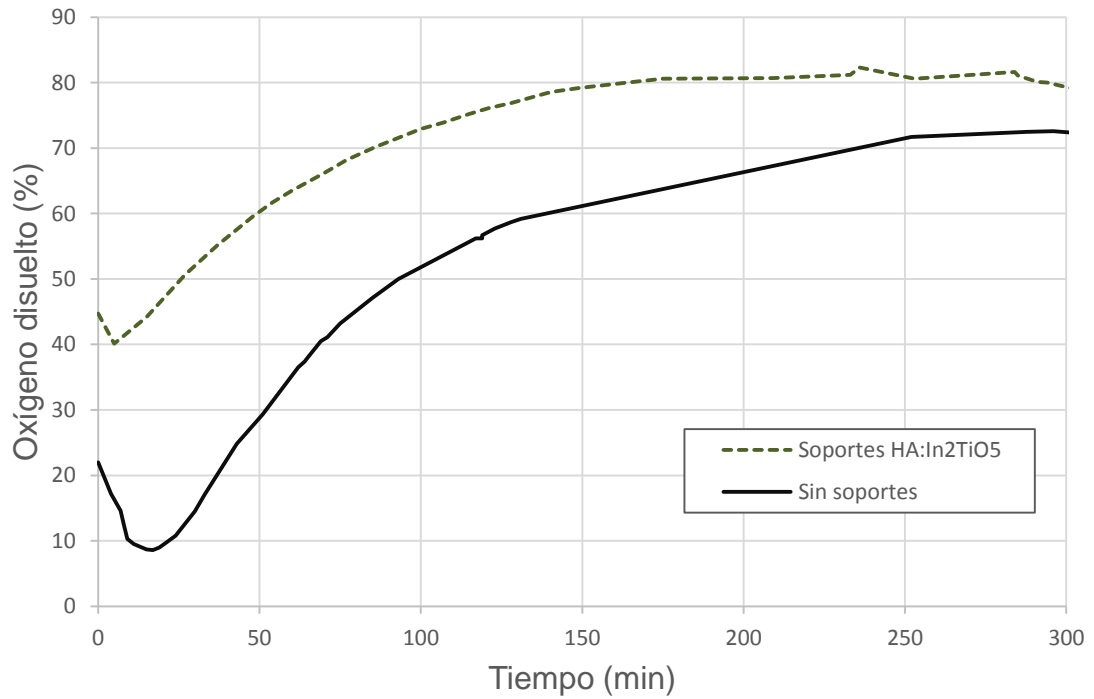


Figura 13. Porcentaje de oxígeno disuelto conforme pasa el tiempo después de 30 min de exposición a luz solar del medio de cultivo MDB 7H9 con pastillas de HA:In₂TiO₅.

El oxígeno disuelto en el medio MDB 7H9 en presencia del HA:In₂TiO₅ y con una exposición previa de 30 minutos a luz solar comienza a elevarse rápidamente después de la exposición, lo mismo sucede en el medio sin soportes pero hasta después de 25 minutos.

Como también se observa en el gráfico de la figura 13 el porcentaje máximo alcanzado de oxígeno disuelto al utilizar las pastillas de HA:In₂TiO₅ fue cercano a 83%, siendo alrededor de 20 % más alto que el máximo cercano a 63 % que se registró por el equipo al no estar presentes los soportes de HA:In₂TiO₅.

El tiempo requerido para registrar el porcentaje máximo de oxígeno disuelto a lo largo del experimento fue de 150 min, mucho menor que el que se requirió para el control sin soportes que fue de 250 min.

El experimento recién descrito permitió descubrir que la mezcla HA:In₂TiO₅ incrementa el oxígeno disuelto de manera más rápida y en una mayor proporción, lo cual atribuimos al efecto fotocatalítico de los materiales In₂TiO₅ y la perovskita CaTiO₃ constituyentes de los soportes inmersos en el medio de cultivo.

Está reportado en la literatura científica como producto de varias investigaciones la capacidad de materiales cerámicos del tipo titanatos de aumentar las concentraciones de oxígeno en diferentes sistemas, e inclusive, algunos de estos materiales sufren una modificación de su superficie después del efecto fotocatalítico lo cual incrementa la adhesión celular sobre ellos (Subrahmanyam y col., 2007; Scougall y col., 2011).

Como se mencionó en el apartado de Métodos, se llevaron a cabo ensayos REMA donde se utilizaron los diferentes tipos de soportes y los resultados obtenidos en los ensayos fueron comparados con las observaciones realizadas mediante MEB de los diferentes soportes, relacionando así el aumento en la densidad bacteriana en los ensayos con la formación de

biopelícula de *M. smegmatis*. Como se ha mencionado anteriormente la formación de biopelícula está estrechamente relacionada con el favorecimiento del crecimiento bacteriano sobre la superficie de diferentes tipos de materiales. Los materiales empleados en este trabajo como soportes, favorecen en diferente medida la formación de dicha biopelícula como se pudo observar en las micrografías obtenidas.

En la figura 14 se comparan las imágenes obtenidas mediante MEB de dos soportes uno de ellos utilizado en los ensayos REMA es decir, puesto en contacto con la bacteria, y otro sin bacteria. Para analizar bajo MEB, los soportes fueron sometidos a un tratamiento de fijación con formaldehído durante dos horas y una hora para los soportes de HA:In₂TiO₅. Se observan diferencias en la superficie de los soportes, en aquellos sin exposición previa a la bacteria sigue siendo posible apreciar la porosidad que presenta el soporte.

Magnificaciones mayores en MEB del soporte utilizado en ensayos REMA muestran estructuras muy similares a lo que anteriormente se ha reportado como “islas bacterianas” (Figura 15) (Monge 2014). Dichas estructuras se encuentran recubriendo toda la superficie del soporte como fue posible observar en las microscopías obtenidas de los laterales del soporte, probablemente siendo una capa o biopelícula producida por la bacteria.

La movilidad de *Mycobacterium* está relacionada con la formación de biopelícula (Tingyu Shi y Col, 2011). Debido a que es un microorganismo no flagelado, su movilidad se debe a las propiedades de la superficie de las bacterias y del substrato y su interacción con la biopelícula, gracias a la cual, se reduce la fricción entre las células y el substrato haciéndose posibles movimientos lentos de los bacilos sobre si mismo.

Existen reportes donde se caracteriza a *M. smegmatis* como una gran productora de biopelícula y algunos resultados en investigaciones con dicha bacteria se han extrapolado a *M. tuberculosis* (donde la biopelícula no está

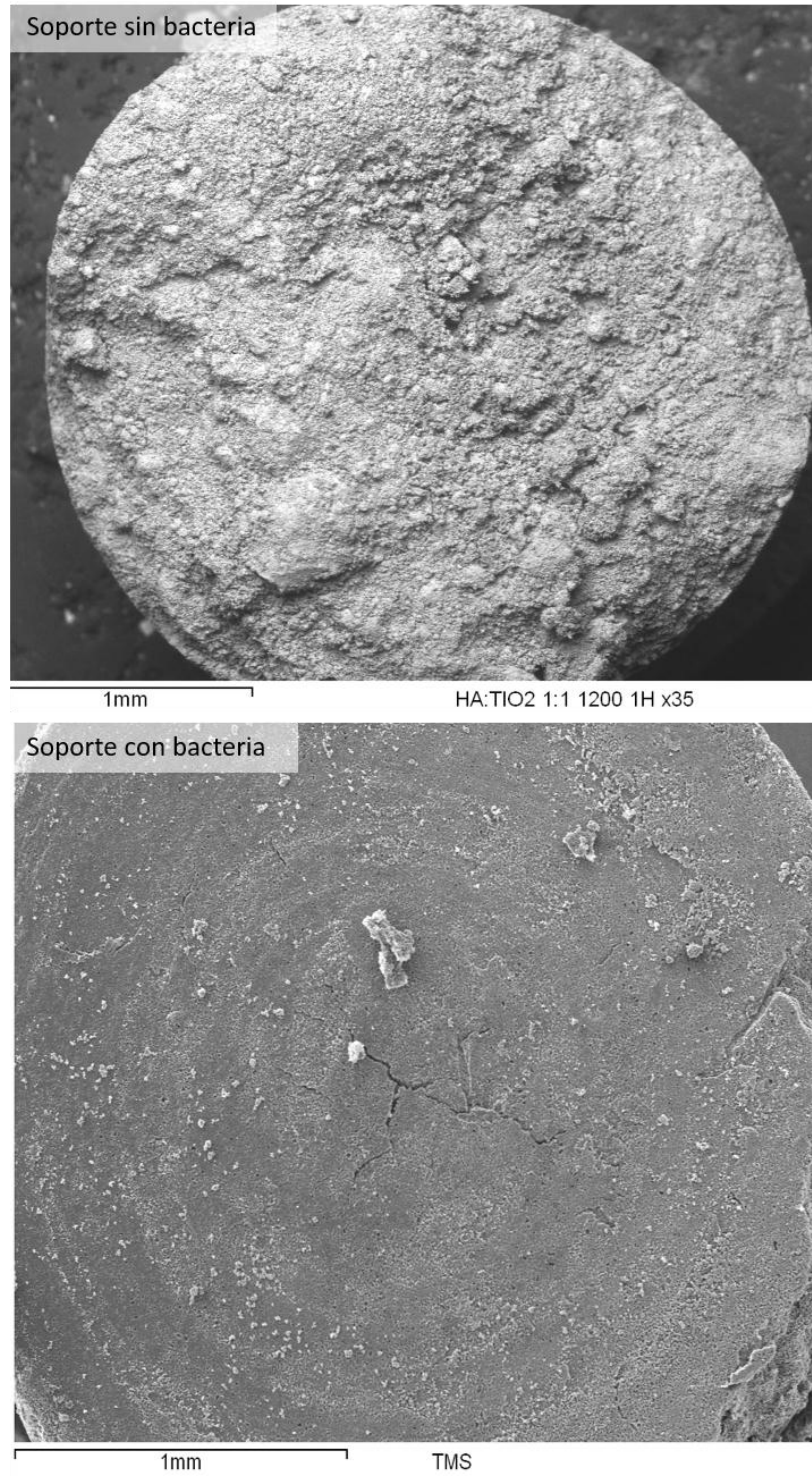


Figura 14. Comparación entre micrografías de soportes empleados y no empleados en ensayos REMA.

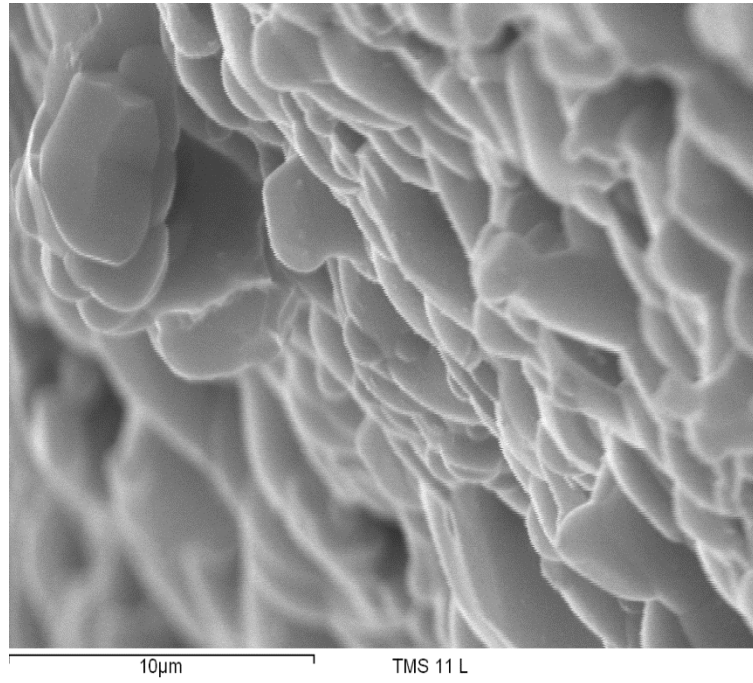


Figura 15. Micrografía obtenida de soportes de HA:TiO₂ empleados en ensayos REMA.

completamente descrita aún) (Syed y Col, 2014). Se ha reportado también que el principal componente de este tipo de biopelículas son ácidos grasos (glicopeptidolípidos) (Recht y Col, 2001). La obtención de biopelícula sobre el tipo de soportes empleados en el presente trabajo presenta la posibilidad de obtener biopelícula de *M. tuberculosis* sobre ellos con el fin de estudiar su formación y definir su composición.

El hecho de estar obteniendo y confirmando la posible formación de esta biopelícula sobre el soporte podría servir para extrapolar resultados a *M. tuberculosis* relacionando las características de la biopelícula con la susceptibilidad de *M. tuberculosis* y combatir la infección causada por la misma o por *M. smegmatis*, ya que también se ha reportado como agente causal de bacteremia asociada a catéter venoso (Syed y Col, 2014). De hecho en algunas investigaciones se utiliza a *M. smegmatis* como modelo de *M. tuberculosis* debido a la rápida formación de biopelícula en comparación con otras especies de *Mycobacterium* (Bonkat y col, 2012).

En las figuras 16, 17 y 18 se muestran las micrografías obtenidas mediante MEB donde se muestra la presencia de bacilos de *M. smegmatis* sobre la superficie de los soportes de HA:TiO₂, HA:In₂TiO₅ y HA:Sc₂TiO₅ respectivamente.

En investigaciones sobre la formación de biopelículas se ha encontrado que algunas de las células absorbidas reversiblemente permanecen inmovilizadas y son irreversiblemente absorbidas por la biopelícula (Garrett y Col. 2008). Lo anterior explica el que no sea posible observar a las bacterias sobre toda la superficie del soporte, ya que quizás se encuentren debajo de la capa observada. En las micrografías se observan algunos bacilos de *M. smegmatis* del cual se ha reportado exhibe fuerte agregación celular, lo que se puede apreciar en las figuras 19, 20 donde se observan agregados de *M. smegmatis* (Syed y Col, 2014).

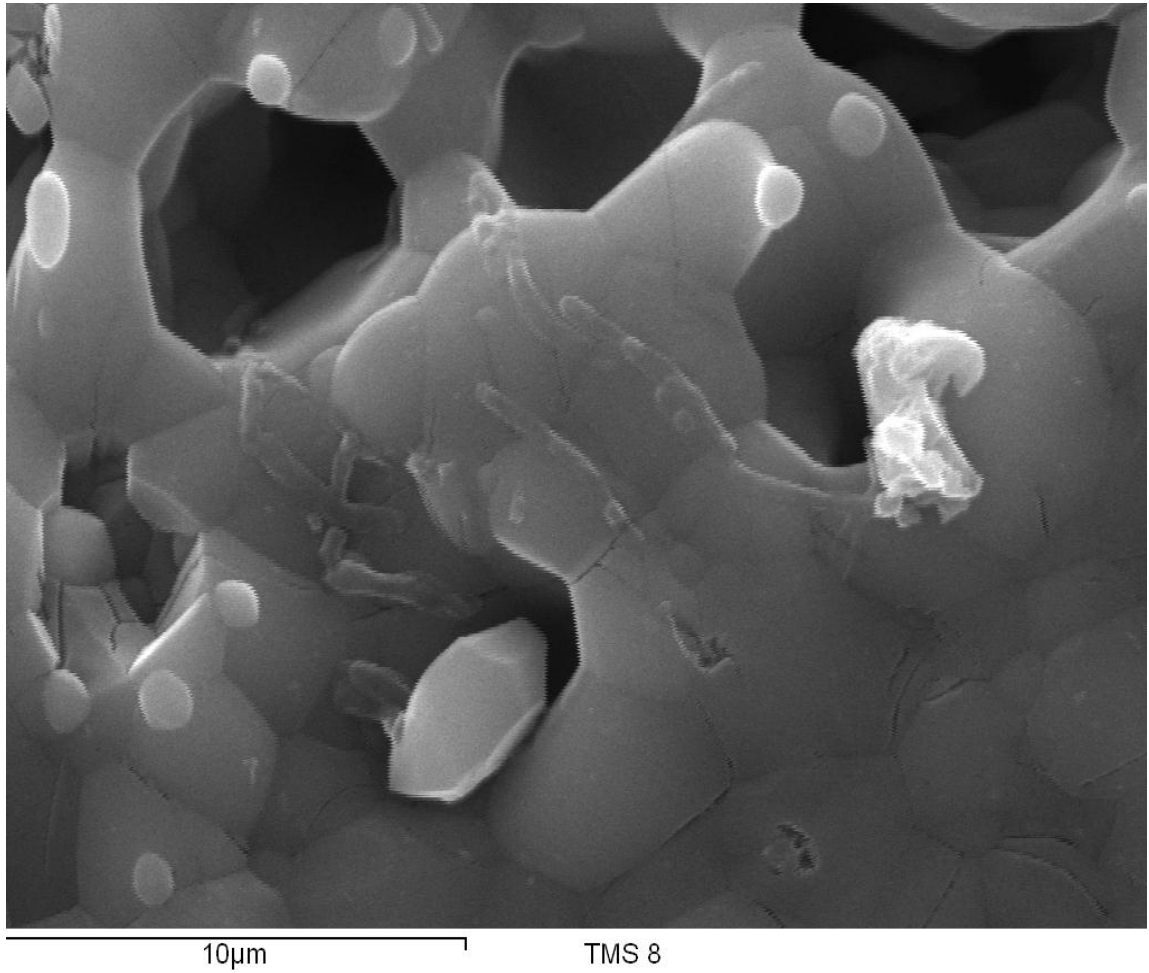


Figura 16. Bacilos de *M. smegmatis* sobre soportes de HA:TiO₂ utilizados en ensayos REMA.

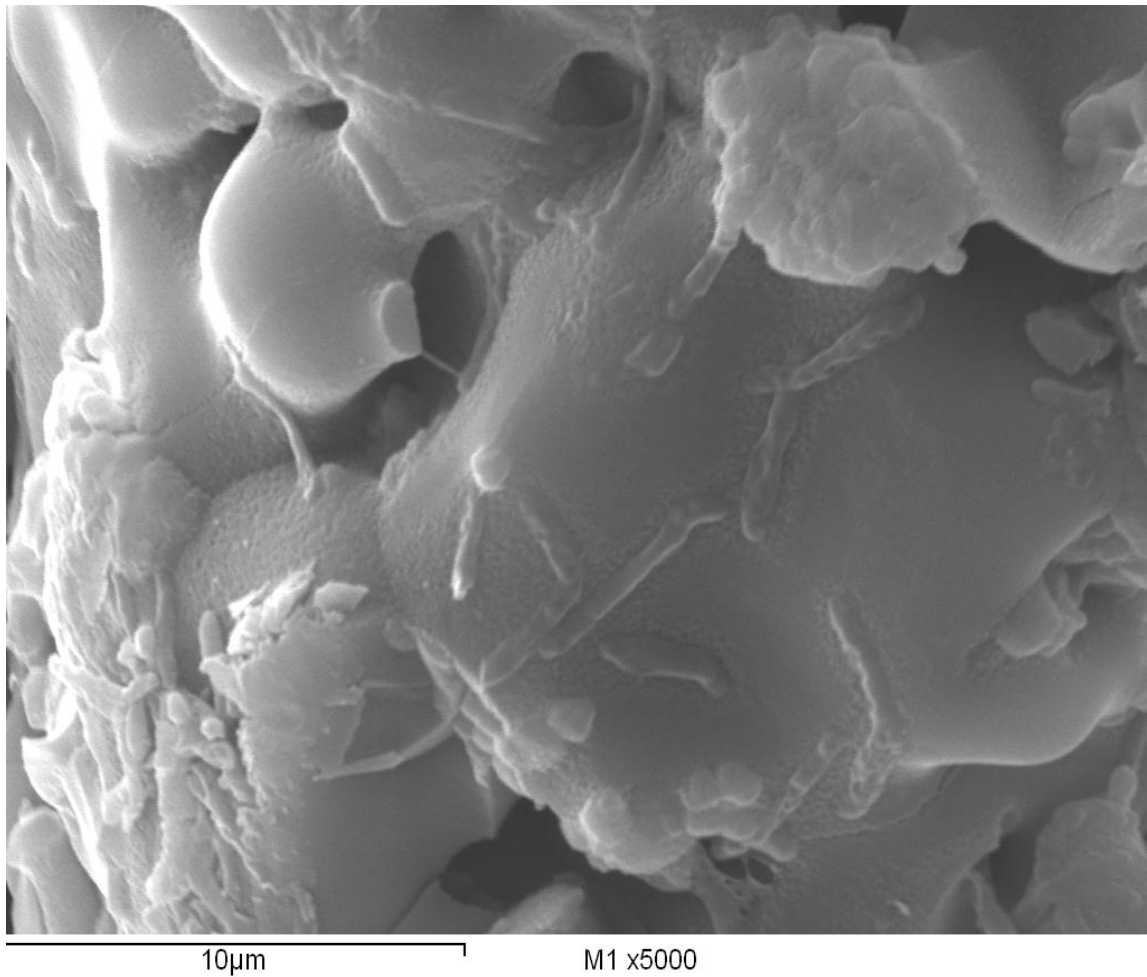


Figura 17. Bacilos de *M. smegmatis* sobre soportes de HA:In₂TiO₅ utilizados en ensayos REMA.

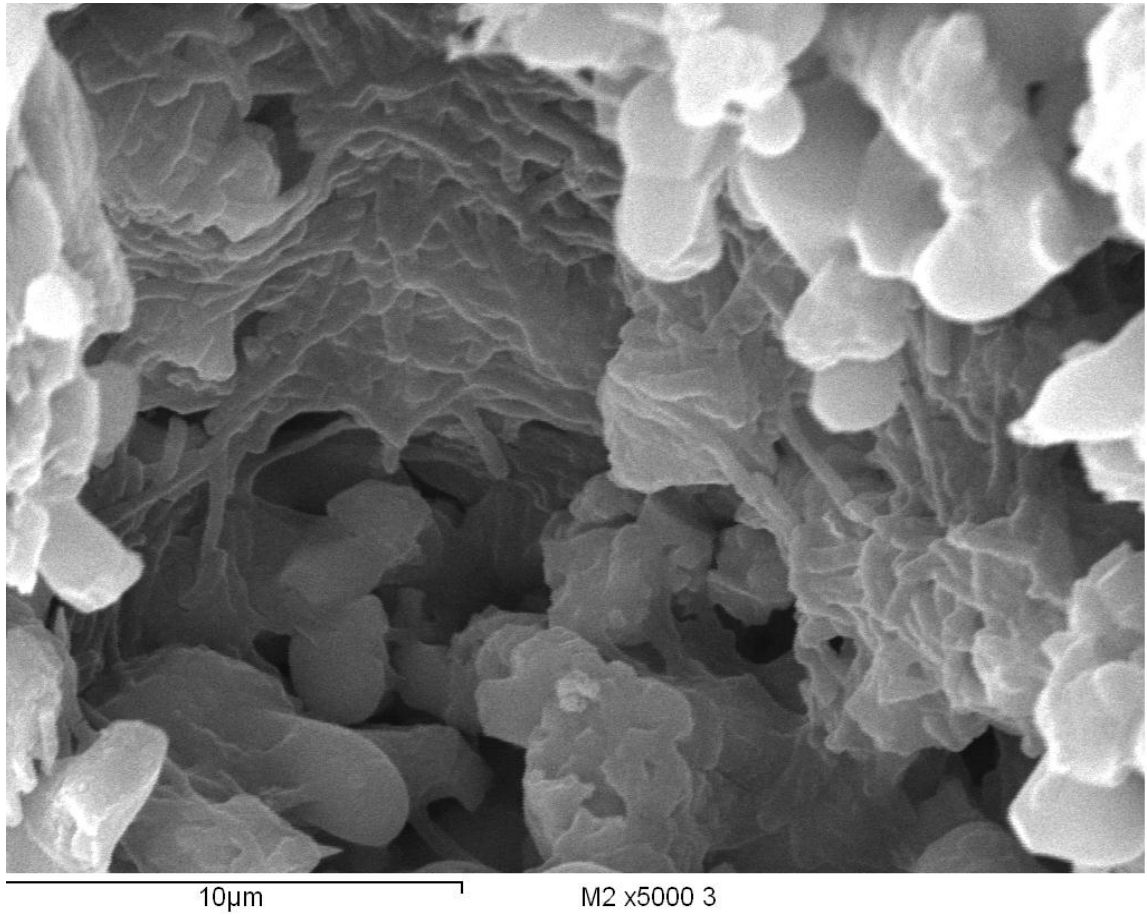


Figura 18. Bacilos de *M. smegmatis* sobre soportes de HA:Sc₂TiO₅ utilizados en ensayos REMA.

La cantidad de bacilos que se logran observar por encima de la capa de biopelícula, se relaciona con los resultados obtenidos en los ensayos REMA ya que es mayor en los soportes de HA:In₂TiO₅ y HA:Sc₂TiO₅.

En la figura 19 se muestra la formación de biopelícula sobre la superficie de un soporte de HA:Sc₂TiO₅, el área señalada es la zona sobre la que se hizo un acercamiento para obtener la micrografía mostrada en la figura 18, se trata de un ejemplo de cómo la bacteria es capaz de crecer dentro de los poros que presenta el material lo que brinda una mayor área sobre la cual la bacteria se desarrolle. Sin embargo, fue necesario comprobar que el aumento en la CMI en los ensayos REMA con estos materiales porosos no fue debido a que el antibiótico no era capaz de llegar a las bacterias que crecen dentro de los poros o cavidades, requiriéndose entonces concentraciones mayores de antibiótico para inhibir el crecimiento al estar presente el soporte.

Para comprobar el comportamiento recién descrito se llevó a cabo un seguimiento del crecimiento de *M. smegmatis* por día mediante un ensayo REMA pero sin agregar antibiótico a los pozos y revelando con resazurina un pozo por día conociendo el número de unidades formadoras de colonias (UFC) colocadas en los pozos; así fue posible conocer el tiempo en el que la bacteria es capaz de virar el indicador resazurina a rosa. Se esperaba que el ensayo donde se colocaron los soportes virara el indicador de crecimiento antes que los ensayos donde no se utilizaron soportes debido a la mayor densidad de bacterias en el primer caso.

Se eligieron las condiciones en las que la CMI fue la más alta en los ensayos REMA, las cuales fueron al utilizar los soportes de HA:In₂TiO₅ exponiendo a luz solar durante 30 min y se colocaron 3 UFC por pozo en medio de cultivo. Se encontró que al estar presentes los soportes, la densidad de bacterias es suficiente en las primeras 24 horas como para virar al indicador

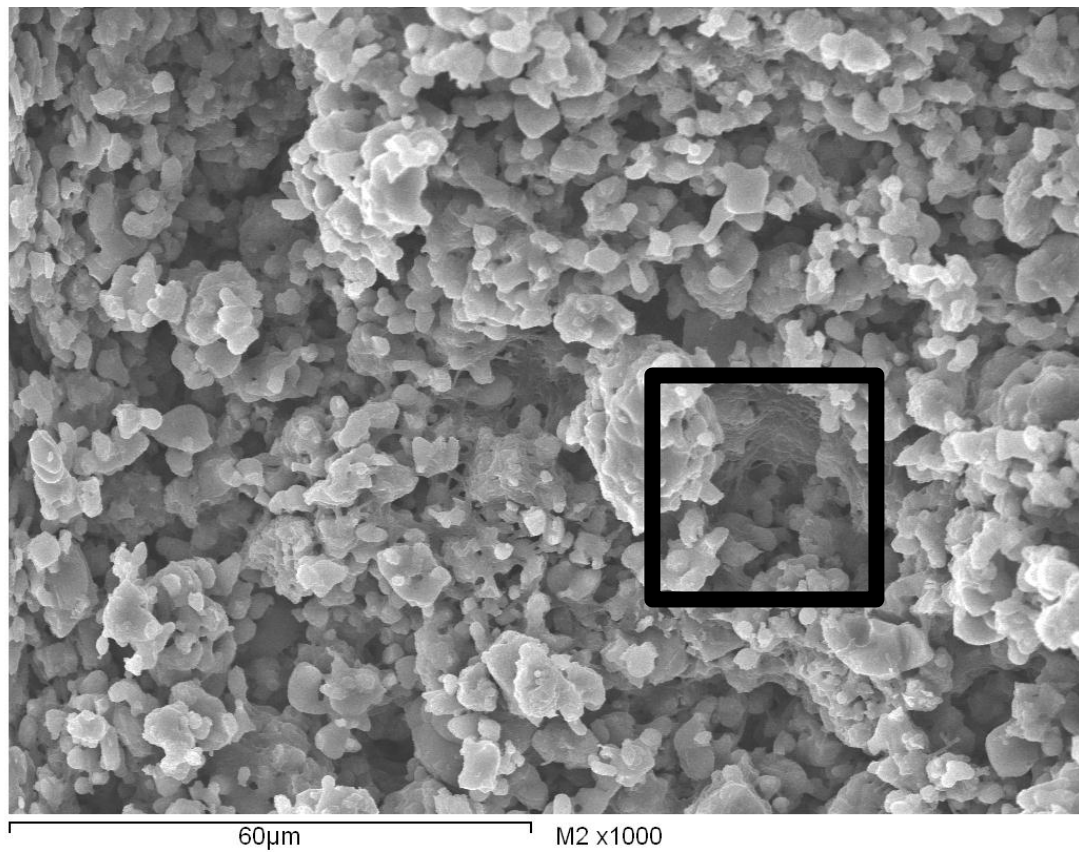


Figura 19. Micrografía de soportes de HA:Sc₂TiO₅ utilizados en ensayos REMA.

resazurina, mientras que al no estar presentes los soportes el indicador cambia hasta después de las 48 horas.

Lo anterior demuestra que el aumento en las CMI en los ensayos donde se utilizó antibiótico no es debido a la dificultad que tiene el antibiótico para penetrar en el soporte, sino a las propiedades físicas y químicas del soporte que favorecen la producción de la biopelícula por parte de las bacterias, la cual contribuye al aumento en la densidad de bacterias sobre el soporte favoreciendo su crecimiento.

Este último experimento permitió corroborar que las mezclas de HA:TiO₂, HA:In₂TiO₅ y HA:Sc₂TiO₅ como soportes favorecen el crecimiento de *M. smegmatis* y la producción de biopelícula sobre los mismos con base a los resultados obtenidos en los ensayos REMA. Además esta conclusión se apoya en las diferencias entre las CMI al utilizar gentamicina y en las observaciones mediante MEB de los diferentes tipos de soportes después de estar en contacto con la bacteria en los ensayos de susceptibilidad a gentamicina.

Destacan los resultados encontrados al utilizar la mezcla HA:In₂TiO₅ en los soportes, ya que la CMI se incrementa de 0.5 µg/mL al no usar soporte a una CMI de 4.0 µg/mL debido a un aumento en el crecimiento de la bacteria al estar presente el soporte lo que apoya la hipótesis planteada para este trabajo, Además el aumento en la CMI podría reflejarse en un aumento aún mayor en la CMI al utilizar *Mtb* debido a su crecimiento lento.

CONCLUSIONES

- Se establecieron las condiciones de compresión y sinterizado para obtener soportes a partir de las mezclas HA:X (X=TiO₂, In₂TiO₅, Sc₂TiO₅).
- Se encontró que la proporción adecuada para preparación de los soportes es de 1:1 para las mezclas HA:X (X=TiO₂, In₂TiO₅, Sc₂TiO₅), la cual proporciona soportes insolubles, porosos y resistentes a la esterilización por medios térmicos.
- Se atribuye a los soportes a partir de las mezclas de HA:Sc₂TiO₅ y de HA:In₂TiO₅ la capacidad de favorecer el crecimiento de *M. smegmatis* en el sistema de drogasusceptibilidad empleado en el presente trabajo.
- El ensayo REMA demostró que con los soportes preparados a partir de la mezcla HA:In₂TiO₅ se obtienen los mejores resultados para crecimiento de *M. smegmatis* ya que la CMI aumenta de 0.5 a 4.0.
- El efecto fotocatalítico favoreció el crecimiento de *M. smegmatis* en el ensayo REMA empleando soportes de HA:In₂TiO₅.
- Al dar un seguimiento al crecimiento de *M. smegmatis* por día, el soporte de HA:In₂TiO₅ hace posible evidenciar el crecimiento de la bacteria 24 horas antes con respecto al control sin soporte.

- De los materiales estudiados en este trabajo la mezcla de HA:In₂TiO₅ presenta las mejores características para ser utilizada como soportes para la obtención de biopelículas.
- La bacteria forma una capa de lípidos sobre los soportes y permanece sobre los mismos después de fijados, lo que se confirmó mediante MEB.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ábalos, C., 2005. Adhesión bacteriana a biomaterials. Avances en odontología. 21:347-353
2. Annaz, B., Hing, K. A., Kayser, M., Buckland, T. 2004. Porosity variation in hydroxyapatite and osteoblast morphology: a scanning electron microscopy study. Journal of Microscopy. 215:100-110.
3. Ausina, R. V., Moreno, S., 2006. Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina.
4. Bonkat, G., Bachmann A., 2012 "Growth of mycobacteria in urine determined by isothermal microcalorimetry: implications for urogenital tuberculosis and other mycobacterial infections." Urology 80(5): 1163, 1169-1112.
5. Burbano, S. Muñoz, C. 2003. Física general. 32ª edición. Tebar. Madrid, España.
6. Camargo-Amado, R.J. 2012. Efecto fotocatalítico del $\text{TiO}^{\wedge}\text{-Au}$ sobre células de cáncer de cuello uterino. Escuela de Ingeniería Química. Universidad del Valle, Cali, Colombia. Chemical Engineering.14:191-198.
7. Chih, Y., Chiang, S. H., Chiou, W. E., Yang, M. L., Hsu, M. C., Yung, M. L., Chen, L.K., Huang, H.H., 2009. Formation of TiO_2 nano-network on titanium surface increases the human cell growth, Dental materials. 25:1022–1029.
8. Chin J. 2001. El control de las enfermedades transmisibles. American Public Health Association. 581:646.
9. Cormack, A.N., Tilocca, A. 2012. Structure and biological activity of glasses and ceramics. Phil. Trans. R. Soc. A. 370:1271-1280.

10. Forbes, B., Sham, D.F., Weissfeld, A.S., 2009. Diagnóstico Microbiológico. 12ª edición. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina, p. 495.
11. Frances., R., Baxter, Irene, G., Turner, Christopher, R., Bowen, Jonathan, P. Gittings, Julian, B., Chaudhuri. 2009. An in vitro study of electrically active hydroxyapatite-barium titanate ceramics using Saos-2 cells. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20:1697-1708.
12. Frances., R., Baxter, Irene, G., Turner, Christopher, R., Bowen, Jonathan, P. Gittings, Julian, B., Chaudhuri. 2009. An in vitro study of electrically active hydroxyapatite-barium titanate ceramics using Saos-2 cells. Springer Science+Business.
13. Garrett, T. R., Bhakoo, M., Zhang, Z. 2008. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science*. 18: 1049-1056.
14. Haixin, Z., Wenjun, D., Yingying Z., Aiping L., Juming Y., Chaorong L., Weihua T., Benyong C., Ge W., Zhan S.. 2011. The structural and biological properties of hydroxyapatite-modified titanate nanowire scaffolds. *Biomaterials*. 32(25):5837-46.
15. Herrera, M. TT., 2004. El papel del biofilm en el proceso infeccioso y la Resistencia. *Nova*. 2:71-80.
16. Hertog, A.L., Visser, D.W., Ingham, C.J., Fey F.H., Anthony, R.M. 2010 Simplified Automated Image Analysis for Detection and Phenotyping of *Mycobacterium tuberculosis* on Porous Supports by Monitoring Growing Microcolonies, *Anil Kumar Tyagi*, 5(6):1008.
17. Hurtado, A., 2008. Actualización en el diagnóstico de tuberculosis. *Ed Cont Lab Clín* 2008: 12; 9-15.
18. Ingraham, J.L., Ingraham, C.A. 1998. Introducción a la microbiología. Ed. Reverte. Barcelona, España. 2:541.
19. Ito, J. 1971. Synthesis of Scandium Pseudobrookite, Sc_2TiO_5 , *Am. Mineral*. 56:1105-1108.

20. Jaramillo, C. A., Taborda, G., 2006. La fotocatalisis: Aspectos fundamentales para una buena remoción de contaminantes. Revista Universidad de Caldas. Enero – Diciembre 2006:71-88
21. Kittel, C. 1997. Introducción a la física del estado sólido. 3ª ed. Reverté. Barcelona España.
22. Linares, C., 2013. Estructura del "cord factor" de microbacterias atípicas y su relación con la capacidad de inducción de diversas citoquinas de relevancia en tuberculosis. PhD. Universidad de Murcia, España.
23. McKeever, S. W. S. 1985. Thermoluminescence of solids. Cambridge. Cambridge University Press. 63:204-206.
24. Monge, D.M. 2012. Evaluación y caracterización de materiales cerámicos como un soporte de crecimiento de Mycobacterium tuberculosis H37Rv en una prueba de susceptibilidad a rifampicina. Maestría. Universidad de Sonora. México.
25. Muñoz, I. C., Brown, F., Durán B., Cruz E., Durán, V. E., Alvarez, M., Thermoluminescence response and glow curve structure of Sc₂TiO₅ β-irradiated. 2014. Applied Radiation and Isotopes 90:58-61.
26. Narasaraju, T. S. B., Phebe, D. E. 1996; Some physico-chemical aspects of hydroxylapatite. Journal of Materials Science. 31:1-21
27. OMS, 2014. World Health Organization. Global tuberculosis control. Noviembre 2015. http://www.who.int/tb/publications/global_report/es/index.html.
28. Prats, G. 2005. Microbiología clínica. Ed. Panamericana. Madrid, España. 1:72-82.
29. Reytrat, J.M., Kahn, D. 2001. Mycobacterium smegmatis: an absurd model for tuberculosis?. Trends in microbiology, 9, 472-4.

30. Rodríguez, J., Candal, R. J., Solís, J., Estrada, W., Belsa, M. A. 2005. El fotocatalizador: síntesis, propiedades y limitaciones. Solar safe water Editorial Escuela de Postgrado UNSAM, Argentina.
31. Scheld, M. W., Scheld, M.D., Marra, C., Whitley, R. J. 2014. Infections of the Central Nervous System. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, EUA.
32. Schuster, J. M., Vera, L. M., Rosenberger, M. R., Schvezov, C. E. 2014. Predicción termodinámica de la adhesión de *Staphylococcus aureus* en nanopelículas de TiO₂. Congreso internacional de materiales y metalurgia. SAM CONAMET/IBEROMAT/MATERIA.
33. Scougall, R. J., García, R., Sakagami, H., Hibino, Y., Contreras, R., Adachi, K., Nakajima, H., Shimada, J. 2011 The effects of the ultraviolet irradiation of titanium plates on osteoblastic adhesion. LXVIII:175-182.
34. Sempere, M.A., Valero-Guillén, P.L., de Godos, A., Martín-Luengo, F. (1993). A triacyl trehalose containing 2-methyl branched unsaturated fatty acyl groups isolated from *Mycobacterium fortuitum*. *Journal of general microbiology*. 139, 585-590.
35. Senegas, J.P., Galy, J. 1975. Sur un Nouveau Type d'Oxydes Doubles M^{+IV} In₂O₅ (M = Ti, V): Etude Cristallographique". *Acta Crystallogr. Sect. B*. 31:1614.
36. Seunghan, O., Sungho, J. 2006. Titanium oxide nanotubes with controlled morphology for enhanced bone growth. *Materials Science and Engineering*. 26:1301-1306.
37. Shi, T., Fu, T., Xie, J. 2011. Polyphosphate Deficiency Affects the Sliding Motility and Biofilm Formation of *Mycobacterium smegmatis*. *Current Microbiology*. 63:470-476.
38. Smart, L., Moore, E. 1995. Química del Estado Sólido. Reverté. España.

39. Subrahmanyam, A., Arokiadoss, T., Ramesh, T.P. 2007. Studies on the oxygenation of human blood by photocatalytic action. *Artificial organs*. 31:819-825.
40. Sudhir, S., Hawaldar., Ranjit, R., Varma., Salil., Waghmode., Suresh, B. 2012. Synthesis and Characterization of $ATiO_3$ (A = Ca, Sr and Ba) Perovskites and Their Photocatalytic Activity Under Solar Irradiation. *Science of Advanced Materials*, 4:568-572.
41. Syed, A., Khalid, A., Sikander, K. Sherwani, Nazia, B., Shahana, U. K. 2014. Detection of Mycobacterium Smegmatis Biofilm and its Control by Natural Agents. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*. 3:801-812.
42. Syed, H., Abidi., Ahmed, K., Sikander, K., Sherwani., Nazia, B., Shahana, U. K., 2014. Detection of Mycobacterium Smegmatis Biofilm and its Control by Natural Agents. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci* 3(4): 801-812.
43. Wen-Deng, Fu-Qiang, Cun-Ming, Xin-Ping, Jian-Lin. 2007. Preparation, electronic structure and photocatalytic activity of the In_2TiO_5 photocatalyst. *Materials Science & Engineering B*. 139:74-80.

ANEXOS

Publicaciones relacionadas con la Tesis de Maestría

ANEXOS

Correo de aceptación para publicar el artículo: Termoluminiscencia de titanato de indio activado con europio.

Termoluminiscencia de titanato de indio activado con europio.

Artículo que será enviado a la revista Biomaterials:

Supports of Hydroxiapatite:Indium titanate for biofilm growth of *Mycobacterium smegmatis*

De: "Revista Científica Electrónica" <nova_scientia@delasalle.edu.mx>
Fecha: dic. 2, 2015 3:18 PM
Asunto: [NS] Decisión del editor/a

Estimado ILIANA CELINA INFANTA MUÑOZ PALMA:

Hemos tomado una decisión sobre su envío a Nova Scientia,
"Termoluminiscencia de titanato de indio activado con europio".

Nuestra decisión es: Que se publique en Nova Scientia.

Fecha de Aceptación: 2 de diciembre de 2015.

Le agradecemos su valiosa contribución y estamos en el compromiso de
informar a usted en cuanto su artículo sea publicado en nuestro siguiente
número.

José Luis Álvarez Espinosa

Nova Scientia ISSN 2007 - 0705

Indizada en: CONACyT

<http://www.conacyt.mx/index.php/comunicacion/indice-de-revistas-mexicanas-de-investigacion/category/multidisciplinaria>

http://nova_scientia.delasalle.edu.mx/

Tel. 01 477 7 10 85 00 ext. 356

Nova Scientia ISSN 2007 - 0705

<http://novascientia.delasalle.edu.mx/>

Thermoluminescence of indium titanate
europium activated
Termoluminiscencia de titanato de indio
activado con europio

**I.C. Muñoz^{1*}, F. Brown², F. M. Vazquez-Paz¹, J.
Marcazzó³ and E. Cruz-Zaragoza⁴**

¹Departamento de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad de Sonora,
Hermosillo, Sonora, México.

²Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales, Universidad
de Sonora, Hermosillo, Sonora, México.

³IFAS - CIFICEN (CONICET - UNCPBA), Tandil, Argentina.

⁴Instituto de Ciencias Nucleares, Universidad Nacional Autónoma de
México, México D.F., México.

México

I. C. Muñoz. A. P. 106. E-mail: imunoz@polimeros.uson.mx

© Universidad De La Salle Bajío (México)

Resumen

El titanato de indio, In_2TiO_5 , es un buen aislante a temperatura ambiente debido a su ancho de banda prohibida que es de 3.2 eV. En este trabajo se reportan las propiedades termoluminiscentes de In_2TiO_5 activado con europio que fue sintetizado mediante reacción de estado sólido. El material fue caracterizado con microscopia electrónica de barrido, espectroscopia de dispersión de energía y por difracción de rayos X. La intensidad termoluminiscente del In_2TiO_5 activado con europio se incrementó cerca de seis veces respecto a la observada para In_2TiO_5 sin ion activador. La curva de brillo de $\text{In}_2\text{TiO}_5:\text{Eu}$, es una banda ancha y con un máximo en 382 K. Se realizó análisis de deconvolución a las curvas de brillo asumiendo el modelo de cinética de orden general. Se determinaron cinco picos con máximos en 372, 382, 432, 488 y 556 K, los cuales coinciden con los datos experimentales obtenidos con el método de blanqueo térmico T_m - T_{stop} . La respuesta termoluminiscente respecto a la dosis gama fue lineal entre 31 y 1200 Gy, seguido de una región de saturación a partir de 1400 Gy. La reproducibilidad de la señal termoluminiscente fue 5.7 % en su desviación estándar. El desvanecimiento de la señal TL a temperatura ambiente, fue significativamente influenciado por el pico de baja temperatura (382 K). Los resultados obtenidos sugieren que $\text{In}_2\text{TiO}_5:\text{Eu}$ podría ser considerado como un fósforo para dosimetría de alta radiación gamma.

Palabras Clave: Titanato de Indio, radiación gamma, termoluminiscencia, dosimetría

Abstract

In_2TiO_5 is a good insulator at room temperature because it has a band gap of 3.2 eV. The thermoluminescent properties of europium activated In_2TiO_5 are reported in this work. This material was prepared by conventional solid state reaction, and its characterization was carried out by scanning electronic microscopy, energy dispersive spectroscopy and X-ray diffraction. The thermoluminescent intensity of the europium activated In_2TiO_5 increased nearly six times in comparison to In_2TiO_5 pure phosphor. The glow curve of $\text{In}_2\text{TiO}_5:\text{Eu}$ was a broad band and it shows a maximum at 382 K. Five peaks centered at 372, 382, 432, 488 and 556 K were obtained by deconvolution method assuming the general order kinetics model. These peaks are in agreement with those obtained by the thermal bleaching named T_M - T_{STOP} method. A linear dose-response was obtained between 31 to 1200 Gy followed by a saturation stage at 1400 Gy dose gamma radiation. The standard deviation of the thermoluminescent signal reproducibility was 5.7 %. The fading at room temperature was significantly influenced by the low temperature peak (382 K). Therefore, this material could be taken into account as a phosphor for high dose gamma dosimetry.

Keywords: Indium titanate, gamma radiation, thermoluminescence, dosimetry

Introducción

Existen reportes del uso de algunos óxidos y sus mezclas como sensores de radiación gamma. Por ejemplo, se han probado películas delgadas de TeO_2/MnO y $\text{In}_2\text{O}_3/\text{SiO}$ en aplicaciones de dosimetría de radiación gamma, resultando prometedoras particularmente para dosimetría personal, por su comportamiento estable de la dosis-respuesta (Arshak, Korostynska 2003, 48; Horowitz et al. 2003, 84). Varios grupos de investigación han probado con éxito algunos óxidos termoluminiscentes tales como los óxidos de aluminio, berilio y magnesio principalmente (Rieke, Daniels 1957, 629; Mehta, Sengupta 1976, 955; Moore 1957, 636; Kortov et al. 1993, 267; Thomas, Houston 1964, 953; Kirsh et al. 1977, 653). Otros óxidos metálicos tales como NiO , LaFeO_3 , CeO_2 , TeO_2 , In_2O_3 , SiO y MnO se han usado como el componente de activación en la preparación de sensores de alta sensibilidad a la radiación gamma (Arshak et al. 2004, 2250). Recientemente, nuestro grupo de investigación ha reportado la termoluminiscencia (TL) del óxido Sc_2O_3 (Brown et al. 2014, 820) y de los titanatos de magnesio $\text{Mg}_{1.5}\text{InTi}_{0.5}\text{O}_4$ (Brown et al. 2015, 126) y de escandio, Sc_2TiO_5 (Muñoz et al. 2015, 58) los cuales mostraron respuesta termoluminiscente adecuada a la exposición con radiación beta. El In_2TiO_5 , es un óxido ternario con una estructura cristalina abierta que ha sido ampliamente estudiada, debido a su resistencia al ambiente. Sus aplicaciones son principalmente como filtro, microcapacitor, cerámico refractario y como fotocatalizador (Pai et al. 2012, 1458; Weng-Deng et al. 2007, 74). El In_2TiO_5 es buen aislante a temperatura ambiente debido a su ancho de banda prohibida de 3.2 eV (Pai et al. 2012, 1458). Sin embargo, en la literatura científica no se encuentran reportes de sus propiedades termoluminiscentes. Cuando a la red cristalina se le introducen iones impurezas, se generan defectos tales como vacancias además de los posibles defectos puntuales como los iones intersticiales y los pares impureza-vacancia que pueden existir en la red (McKeever. 1985, 1). También se generan defectos electrónicos provocados por la radiación ionizante, que formarán pares electrón-hueco, y los electrones pueden atraparse en las vacancias que tienen un papel relevante en la emisión termoluminiscente. En general, esos defectos puntuales principalmente impureza-

vacancias y pares electron-hueco, al ser estimulados por calor, se recombinan para la emisión de luz del material previamente irradiado.

Método

La síntesis de $\text{In}_2\text{TiO}_5\text{:Eu}$ se realizó en dos etapas. En principio, se utilizaron los reactivos In_2O_3 (99.9%) y TiO_2 (99.9%) comercialmente disponibles y en relación molar 1:1 para sintetizar el In_2TiO_5 . Los óxidos se colocaron en un mortero de ágata y se pulverizaron hasta obtener un polvo fino. Posteriormente, se moldeó en una pastilla de 1 g usando una prensa hidráulica de la marca Carver. La pastilla obtenida, se sinterizó a 1523 K durante 48 h en un horno calibrado Thermolyne modelo 1300. Así, el In_2TiO_5 se obtuvo mediante el método convencional de estado sólido (Senegas et al. 1975, 1614). Se prepararon seis lotes del titanato de indio puro. Para lograr el material activado con europio, se mezclaron In_2TiO_5 con Eu_2O_3 (99.99 %) en concentración de 10 % molar. Se colocaron 0.4611 g de In_2TiO_5 y 0.03519 g de Eu_2O_3 en un mortero de ágata y se mezclaron mediante molienda fina de la cual el polvo se preparó en forma de pastilla y posteriormente se sinterizó a 1373 K durante 24 h. Los patrones de difracción se obtuvieron en un difractómetro de rayos X de polvos (Bruker Mod. D8 Advance) el cual consta de un ánodo de Cu y un monocromador de grafito. Las micrografías y los espectros de dispersión de energía se obtuvieron en un microscopio electrónico de barrido (MEB) marca JEOL modelo JSM-5410LV y equipado con un analizador Oxford X-ray Energy Dispersive Spectroscopy (EDS) que opera a 15 keV. Las muestras utilizadas en el estudio TL se prepararon como pastillas de 60 mg de peso y se trataron térmicamente a 1373 K durante 2 h antes de ser utilizadas en los experimentos. Las curvas de brillo de las muestras se obtuvieron inmediatamente después de haber sido expuestas a la radiación gamma, para tal propósito, se usó un equipo TL Harshaw modelo 3500 con una razón de calentamiento de 2 °C/s y bajo un flujo constante de nitrógeno para evitar señales TL espurias. Las curvas de brillo de In_2TiO_5 y $\text{In}_2\text{TiO}_5\text{:Eu}$ se registraron desde 303 a 673 K. Se utilizaron dos pastillas en cada uno de los

experimentos realizados. Para analizar el comportamiento de la respuesta TL a la dosis de exposición, las muestras fueron irradiadas a 31, 100, 200, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800 y 1900 Gy. La reproducibilidad de las curvas TL de $\text{In}_2\text{TiO}_5\text{:Eu}$, se obtuvo irradiando las muestras a la dosis de 1200 Gy en diez ciclos consecutivos de irradiación-lectura. El desvanecimiento de la señal TL del titanato activado con europio se realizó a 1200 Gy y posteriormente se almacenaron por tiempos definidos en oscuridad y a temperatura ambiente. Periódicamente, entre 0 a 336 h, se fueron realizando medidas TL para analizar las señales. Se realizó un blanqueo térmico paulatino usando el método $T_M\text{-}T_{\text{STOP}}$ (McKeever 1980, 331), las muestras se irradiaron a 300 Gy. El calentamiento se inició a la temperatura de 333 K con incrementos de 10 K en cada paso hasta alcanzar 673 K. Los valores de temperatura de los máximos obtenidos en cada curva de brillo T_M , se graficaron contra la temperatura T_{STOP} , para generar una curva en forma de escalera. Cada escalón en la curva se asoció a la posición de cada pico de brillo bajo la envolvente. Las posiciones de los picos de brillo (T_M), obtenidas con el método $T_M\text{-}T_{\text{STOP}}$ también se usaron como datos de entrada para calcular los valores de los parámetros cinéticos (E , s y b). Debido a la forma compleja de las curvas de brillo, se realizó el análisis de deconvolución utilizando el programa Mathcad 14® y del mismo se usó la función Minerr para las soluciones y valores que minimicen la diferencia entre la función teórica para la intensidad y su correspondiente curva de brillo. En la deconvolución se asumió el modelo de Cinética de Orden General (General Order Kinetic, GOK) (Horowitz, Yossian 1995, 1) modificado por Rasheedy (Rasheedy 1993, 663) en donde la ecuación para la intensidad TL incluye la relación n_0/N la cual tiene en cuenta la fracción de trampas ocupadas, esta ecuación es:

$$I(T) = n_0^b S \exp\left(-\frac{E}{kT}\right) / N^{b-1} \left[1 + \frac{S(b-1)(n_0/N)^{(b-1)}}{R} \int_{T_0}^T \exp\left(-\frac{E}{kT'}\right) dT' \right]^{b-1}$$

(1)

donde n_0 es la concentración inicial de cargas atrapadas, b es el orden de la cinética entre primer y segundo orden, S es el factor de frecuencia (s^{-1}), E es la energía de

activación (eV), N es la concentración de trampas, y R es la razón de calentamiento (2 K/s). La exactitud del ajuste a la curva experimental de datos TL puede verificarse por la figura de mérito (FOM) (Balian, Eddy 1977, 145):

$$FOM = \sum_{j_i}^{j_f} \frac{100|y_j - y(x_j)|}{A} \quad (2)$$

donde j_i y j_f son el primer y último valor, respectivamente, de la región de interés. Los términos y_j y $y(x_j)$ son respectivamente, la emisión TL y la correspondiente función del valor j , A es la integral de la curva TL en toda la región de interés. El valor del FOM menor a 5 % significa que es un ajuste preciso y aceptable (Horowitz, Yossian 1995,1).

Todas las muestras fueron irradiadas con rayos gamma en un irradiador de tipo alberca Gammabeam 651PT que aloja fuentes de ^{60}Co que se encuentra instalado en el Instituto de Ciencias Nucleares de la UNAM.

Resultados

El análisis de difracción de rayos X de polvos mostró el patrón de difracción de In_2TiO_5 obtenido en monofase. La ausencia de reflexiones provenientes de los materiales de inicio (Ti_2O_3 y In_2O_3) indicó que la reacción fue completa. Las micrografías obtenidas por MEB de muestras de In_2TiO_5 y $\text{In}_2\text{TiO}_5:\text{Eu}$ al 10 % molar, presentan granos polimórficos con bordes redondeados cuyo tamaño varía de 5 a 80 μm . El análisis de dispersión de energía de rayos X mostró los elementos esperados: Ti, O, In para In_2TiO_5 y además de estos elementos se encontró europio para las muestras de $\text{In}_2\text{TiO}_5:\text{Eu}$. En la figura 1 se presenta una comparación entre la curva de brillo de In_2TiO_5 sin activadores y de $\text{In}_2\text{TiO}_5:\text{Eu}$, ambas fueron expuestas a 1200 Gy con radiación gamma.

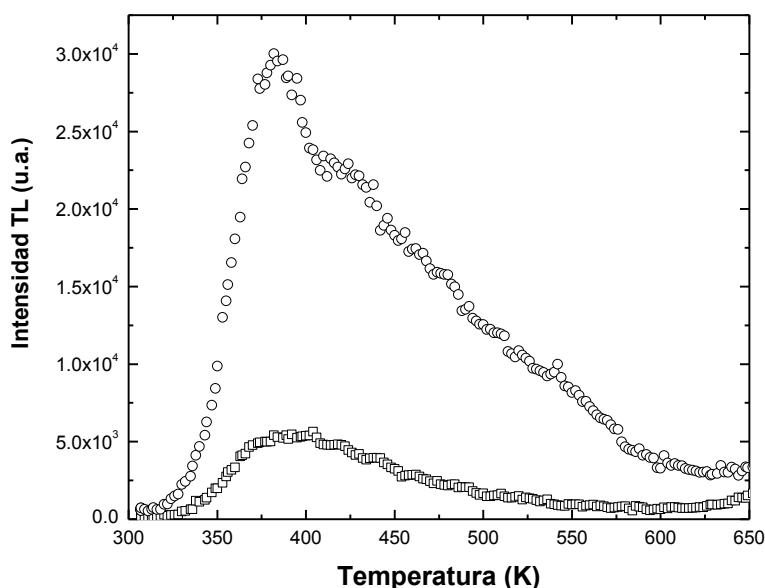


Figura 1. Curvas de brillo de In_2TiO_5 (\square) sin impureza activadora y $\text{In}_2\text{TiO}_5:\text{Eu}$ (\circ), expuestas a la dosis de 1200 Gy de radiación gamma.

La intensidad TL se incrementó casi seis veces para $\text{In}_2\text{TiO}_5:\text{Eu}$ con respecto a In_2TiO_5 . Éste último, material puro, mostró una curva de brillo de menor intensidad TL con una banda ancha y sin definición del máximo del pico de brillo. El material al que se le han agregado impurezas con europio muestra en su curva de brillo la influencia de la impureza en la definición del máximo TL con alta intensidad. Así, resultó de mayor interés continuar la caracterización TL del titanato activado con europio. $\text{In}_2\text{TiO}_5:\text{Eu}$ exhibió una curva de brillo compleja, con un máximo centrado en 382 K y muy ancha hacia el lado de alta temperatura, este comportamiento fue muy similar para todas las dosis impartidas, como se muestra en la figura 2. El máximo en 382 K, no exhibe desplazamiento de su posición en el intervalo de dosis estudiado, pero incrementa su intensidad conforme aumenta la dosis de exposición, lo cual se asocia a una cinética de primer orden para el fenómeno TL observado. Después del pico máximo ubicado en 382 K, la banda TL incrementa su intensidad con el aumento de la dosis definiendo mejor su estructura compleja, típico de traslapes de picos bajo la curva TL envolvente, que puede relacionarse a una distribución de trampas casi continuas (Gómez-Ros et al. 2006, 727) que todavía está

en proceso de análisis. La estructura compleja de las curvas quedó evidenciada por la deconvolución de la curva de brillo donde se determinaron cinco picos con máximos en 372, 382, 432, 488 y 556 K. Al graficar T_M en función de T_{STOP} se obtuvo una curva con forma de escalera con cinco escalones que corresponden con valores de T_M en 383, 453, 526, 548 y 563 K, lo cual indica que las curvas de brillo se componen de picos traslapados.

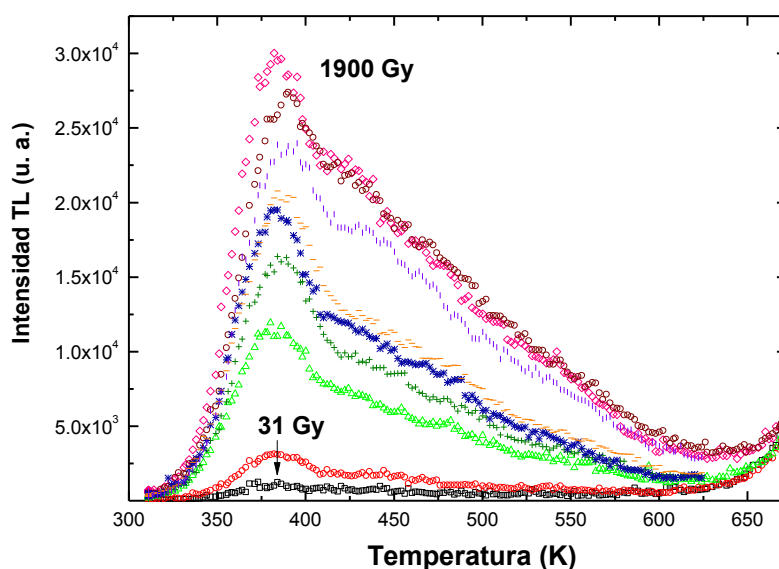


Figura 2. Curvas de brillo de la respuesta TL de $\text{In}_2\text{TiO}_5:\text{Eu}$ desde 31 a 1900 Gy.

Una característica importante del material, es que presentó linealidad en la dosis-respuesta entre 31 y 1200 Gy, como se muestra en la figura 3, iniciándose una región de saturación en 1400 Gy. Un comportamiento similar ha sido observado en el titanato Sc_2TiO_5 cuyo intervalo lineal abarca dosis de 50 a 500 Gy y a dosis mayores inicia la saturación de la señal TL (Muñoz et al. 2014, 58).

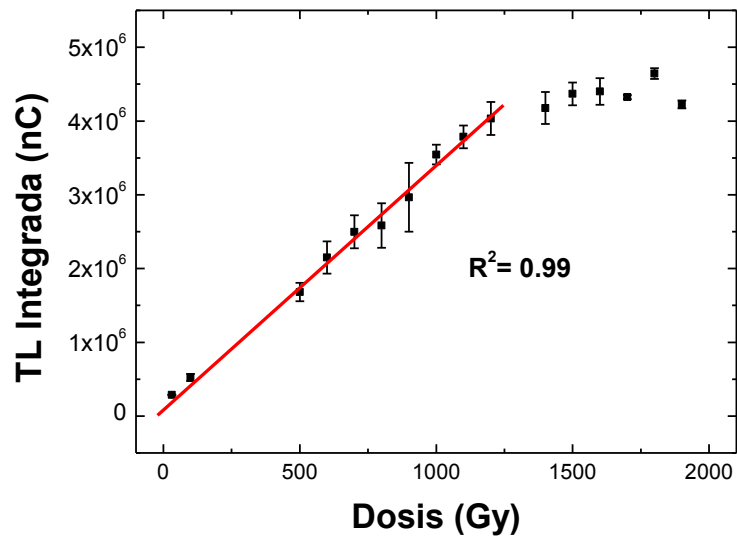


Figura 3. Respuesta TL integrada de $\text{In}_2\text{TiO}_5:\text{Eu}$ en el intervalo lineal desde 31 hasta 1200 Gy.

La figura 4 presenta las curvas de brillo del desvanecimiento de la señal TL, se puede apreciar como la curva de brillo exhibe un hombro del lado de alta temperatura cuyos máximos se desplazan hacia mayor temperatura conforme pasa el tiempo de almacenamiento y también la intensidad de las curvas de brillo disminuye. La figura insertada muestra el decaimiento de las curvas TL integradas desde 0 h hasta 336 h. Se observa la marcada disminución de la señal TL integrada que se ve muy influenciada en su decaimiento por el pico centrado a 382 K. Este pico desaparece transcurridas 2 h y después de 4 h el decaimiento es más lento. La pérdida del pico a 382 K es atribuida a la recombinación de los defectos superficiales cercanos a la banda de conducción. La señal TL se reduce 40 % en 24 h, después de este tiempo y hasta 336 h de almacenamiento la intensidad de la curva de brillo decrece más lentamente y se observa solo 15 % de decaimiento.

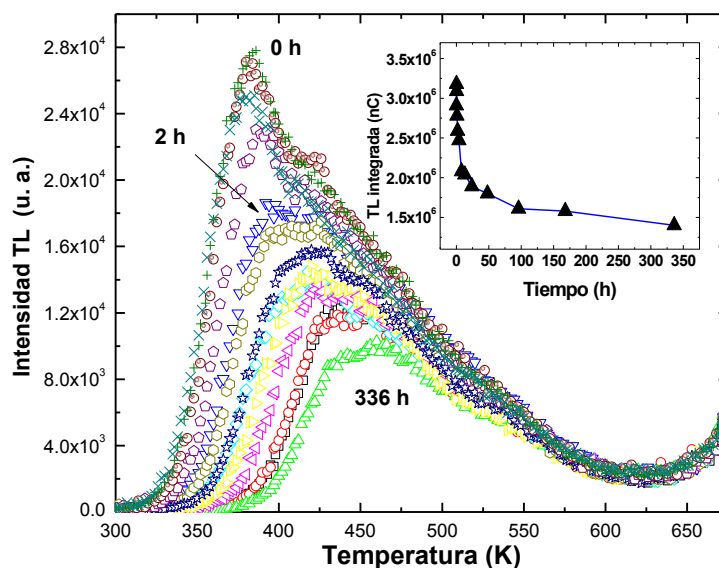


Figura 4. Curvas de brillo de desvanecimiento de la señal TL de $\text{In}_2\text{TiO}_5:\text{Eu}$ expuesto a 1200 Gy.

Adicionalmente, la reproducibilidad de la señal TL fue de 5.7% de desviación estándar, calculada a partir del promedio de dos lecturas para cada ciclo de irradiación-lectura de un total de diez ciclos.

Los parámetros cinéticos se calcularon para las curvas de brillo obtenidas a las dosis de 1000 Gy y 1200 Gy, y se analizaron considerando el modelo de cinética de orden general. El FOM de ajuste fue menor a 3 %, el cual es considerado como buen valor respecto al 5 % como límite aceptable (Balian, Eddy 1977, 145). La figura 5 presenta la deconvolución de las curvas de brillo de las muestras irradiadas del $\text{In}_2\text{TiO}_5:\text{Eu}$. En ambos casos, se resolvieron cinco picos de brillo con cinéticas de primer y segundo orden. Estos resultados coinciden con los que exhibe el método T_M-T_{STOP} en el que se encontró un evidente traslape entre los picos de brillo, principalmente entre los dos centrados en 383 y 453 K. Los valores de energía de activación E , se obtuvieron en el intervalo de 0.76 a 0.92 eV (tabla 1). Sin embargo, los valores de la energía de activación no corresponden a valores que crecen con el aumento de la temperatura de los picos, muy probablemente debido a la distribución de trampas que producen el traslape de los picos que conforman a la curva de brillo TL.

Tabla 1. Parámetros cinéticos de $\text{In}_2\text{TiO}_5:\text{Eu}$.

Pico	$T_{max}[\text{K}]$	E [eV]	$s[\text{s}^{-1}]$	B	FOM
1200Gy					3.1%
1	372	0.90	2.8×10^{11}	1.0	
2	382	0.76	1.3×10^{13}	2.0	
3	432	0.78	2.1×10^{12}	2.0	
4	488	0.84	8.9×10^{11}	2.0	
5	556	0.92	4.0×10^{11}	2.0	
1000Gy					2.7%
1	370	0.90	3.3×10^{11}	1.0	
2	388	0.76	9.7×10^{12}	2.0	
3	444	0.78	1.2×10^{12}	2.0	
4	506	0.84	5.5×10^{11}	2.0	
5	568	0.92	3.9×10^{11}	2.0	

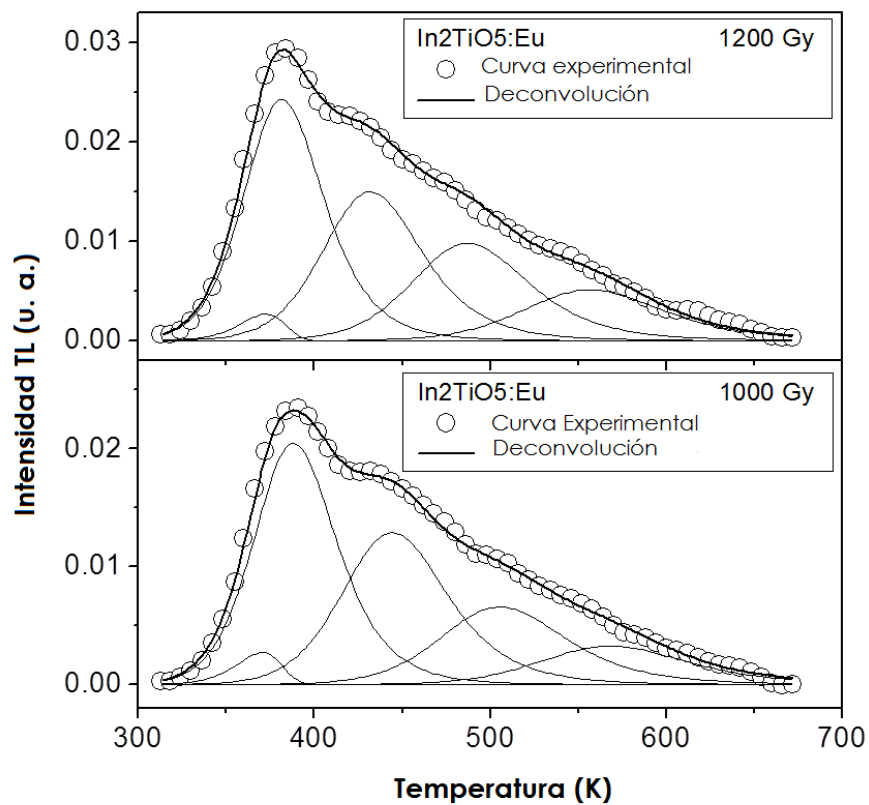


Figura 5. Deconvolución de las curvas de brillo asumiendo el modelo de cinética de orden general para $\text{In}_2\text{TiO}_5\text{:Eu}$ expuesto a dosis de 1200 y 1000 Gy de radiación gamma.

Conclusiones

El $\text{In}_2\text{TiO}_5\text{:Eu}$ fue sintetizado por reacción de estado sólido y mostró una respuesta TL seis veces mayor que el In_2TiO_5 puro. La respuesta en función de la dosis presentó buena linealidad desde 31 hasta 1200 Gy, seguido por la saturación de la señal TL a partir de 1400 Gy de dosis de radiación gamma. El desvanecimiento de la señal TL a temperatura ambiente fue significativamente influenciado por el pico de baja temperatura (382 K), éste desaparece al transcurrir 2 h. El máximo en la curva de brillo decrece muy lentamente a partir de 24 h y al final de 336 h (14 días) se reduce en 15 %. La reproducibilidad de la señal TL presentó 5.7% de desviación estándar en diez ciclos de irradiación-lectura. Los parámetros cinéticos obtenidos asumiendo el modelo de cinética de orden general para dos distintas dosis, 1000 Gy y 1200 Gy, son muy similares lo que evidencia la exactitud en la predicción del proceso TL descrito.

El $\text{In}_2\text{TiO}_5\text{:Eu}$ mostró características TL que lo hacen un material interesante para continuar estudiándose y una de sus aplicaciones puede ser en dosimetría de dosis altas de radiación gamma.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo de la Oficina de Colaboración Interinstitucional de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), y de la Dirección de Desarrollo Académico e Innovación Educativa de la Universidad de Sonora (UNISON) con el proyecto de colaboración anual UNAM-UNISON 2012 y CONACYT (México) proyecto número CB-2008-106041.

Referencias

Arshak, K.I., Korostynska, O. (2003). Thin films of (TeO)(InO) as gamma radiation sensors. *Sens. Rev.* 23 (1), 48-54.

Arshak, K., Arshak, A. Zleetni, S., Korostynska, O. (2004). Thin and thick films of metal oxides and metal phthalocyanines as gamma radiation dosimeters. *IEEE Trans. on Nucl. Sci.* 51 (5), 2250-2255.

Balian, H. G. Eddy, N. W. (1977). Figure-of-merit (FOM), an improved criterion over the normalized chi-squared test for assessing goodness-of-fit of gamma rayspectral peak. *Nucl. Instrum. Methods.* 145, 389.

Brown, F., Alvarez, V.E., Bernal, R., Cruz Vazquez, C., BorbónNuñez, H., Muñoz, I.C., Castaño V.M. (2014). Thermoluminescence of Sc₂O₃ exposed to beta-particle irradiation. *Optical Materials.* (36) 820-822.

Brown, F., Hernandez-Perez, T.C., Muñoz, I.C., Alvarez-Montaña, V.E., Cruz-Vazquez, C., Bernal, R. (2015). Synthesis and thermoluminescence of a spinel-type oxide exposed to beta-particle irradiation. *Res. Soc. Symp. Proc. Vol 1769.* 2015 DOI.10.1557./opl.2015.126.

Fahim, F.K., Arshak, K.I., Korostynska, O. (2003). Hybrid oxide mixtures as γ -radiation sensors. *Sensors Proceedings of IEEE.*1, 84-87.

Gómez-Ros, J. M., Furetta, C., Cruz-Zaragoza, E., Lis, M., Torres, A., Monsivais, G. (2006). Dose dependence and thermal stability of the thermoluminescence emission in inorganic dust from mint and chamomile. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A.* 566, 727-732.

Horowitz, Y.S., Yossian, D. (1995). Computerised glow curve deconvolution: application to thermoluminescence dosimetry. *Radiat. Prot. Dosim.* 60, 1–114.

Kirsh, Y., Kristianpoller, N., Chen, R. (1977). Vacuum ultra-violet induced thermoluminescence in γ -irradiated and non-irradiated MgO powder. *Phil. Mag.* 35 (3), 653-661.

Kortov, V.S., Milman, I.I., Slesarev, A.I., Kijko, V.S. (1993). New BeO ceramics for TL ESR dosimetry. *Radiat. Prot. Dosim.* 47, 267-270.

McKeever SWS. (1980) On the analysis of complex thermoluminescence glow-curves: resolution in to individual peaks. *Phys. Status Solidi A.* (62), 331-339.

McKeever S. W. S. (1985) Thermoluminescence of solids. Cambridge. Chapter I, II. pp. 1-63.

Mehta, S.K., Sengupta, S. (1976). Gamma dosimetry with Al_2O_3 thermoluminescent phosphor. *Phys. Med. Biol.* 21 (6), 955-964.

Moore, L.E. (1957). Thermoluminescence of sodium sulfate and lead sulfate and miscellaneous sulfates, carbonates and oxides. *J. Phys. Chem.* 61 (5), 636-639.

Muñoz, I.C., Brown, F., Durán-Muñoz, H., Cruz-Zaragoza, E., Durán-Torres, B., V.E. Alvarez-Montaña, V.E. (2014). Thermoluminescence response and glow curve structure of Sc_2TiO_5 β -irradiated. *Appl. Rad. Isot.* (90) 58-61.

Pai R., Majeed J., Banerjee, A. M., Arya, A., Bhattacharya S., Rao, R., Bharadwaj, S. R. (2012). Role of Nd^{3+} ions in modifying the band structure and photocatalytic properties of substituted indium titanates, $\text{In}_{2(1-x)}\text{Nd}_{2x}\text{TiO}_5$ oxides. *J. Phys. Chem. C.* 116, 1458-1471.

Rasheedy, M.S. (1993). On the general-order kinetics of the thermoluminescence glow peak. *J. Phys. Condens. Matter* 5, 633–636.

Rieke, J.K., Daniels, F. (1957). Thermoluminescence studies of aluminum oxide. *J. Phys. Chem.* 61 (5), 629-633.

Senegas, P.J., Manaud, J.P., Galy, J. (1975). Sur un nouveau type d'oxides doubles $\text{M}^{+IV}\text{In}_2\text{O}_5(\text{M}=\text{Ti},\text{V})$: Etude Cristalochimique. *Acta Cryst.* B31, 1614-1618.

Thomas, B., Houston, E. (1964). Correlation of optical absorption and thermoluminescence curves for single crystals of magnesium oxide. *Br. J. Appl. Phys.* 15 (8), 953-958.

Wen-Deng Wang, Fu-Qiang Huang, Cun-Ming Liu, Xin-Ping Lin, Jian-Lin Shi.
(2007). Preparation, electronic structure and photocatalytic activity of the In_2TiO_5
photocatalyst. Mat. Sci. & Eng. B. 139, 74-80.

Supports of Hydroxiapatite:Indium titanate for biofilm growth of *Mycobacterium smegmatis*

F.M. Vazquez-Paz^a, F. Brown^b, A. Garibay-Escobar^a, M. Avilés-Acosta^c . and I.C. Muñoz^{a*}

^a*Departamento de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad de Sonora, A.P.130, Hermosillo, Sonora, C.P. 83000, México.* ^b*Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales, Universidad de Sonora, A.P.130, Hermosillo, Sonora, México.*

^c*Laboratorio Estatal de Salud Pública, C.P. 83249, Hermosillo, Sonora, México.*

Abstract

The tuberculosis is considered a public health problem for WHO. In 2013 were reported 9 million of new cases and 1.5 million of deaths. *Mycobacterium tuberculosis (Mt)* is the causal agent of that disease and *Mycobacterium smegmatis (Ms)*, with its short generation time and low biosafety requirements, serves as an appropriate model to study *Mycobacteria* in general. Recently, ceramic materials has been used in biomedical applications as a substrates for biofilm generation. The aim of this work was to evaluate the capacity of biofilm generation by *Ms* over supports prepared with HA:In₂TiO₅ exposed to sunlight. The chemical composition of the supports was analyzed by EDS and DRX. The results shown an increase on the oxygen concentration by photocatalytic effect promoted by the sunlight exposition of supports containing *Ms* and MDB 7H9. In₂TiO₅ on the ceramics mixture, was apparently responsible of the oxygen increase and consequently of the increase of eight times on the MIC in rezasurine assays on microplate. The biofilm formation was confirmed by SEM.

1. Introduction

Growth in communities appears to be a preferred survival strategy of microbes, and is achieved through genetic components that regulate surface attachment, intercellular communications, and synthesis of extracellular polymeric substances (O'Toole et. al., 1998; Henke et. al., 2004; Syed et. al. 2014). The biofilms are one of the most successful via for colonization of m.o. and they are responsible for wide variety of diseases. Biofilms may contribute in therapeutic failure by protecting the bacteria from effective penetration and action of antimicrobial agents, dynamic environments and immune factors and consequently leading to inefficient clearance of pathogens, relapse of infection, and selection and propagation of drug-resistant Mycobacteria (Kulka et. al. 2012; Syed et. al. 2014).

Mycobacterium tuberculosis (*Mt*) which biofilm is not completely characterized, it is the principal cause agent of tuberculosis, considered as a public health problem on the world for word health organization (WHO, 2014; Syed et. al. 2014). Biofilms formation it is related with some bacterium capacity to infect surfaces and as a cause of medical infections. For instance, *Mycobacterium smegmatis* (*Ms*) has been reported as a causal venous-catheter bacteremia agent (Syed et. al. 2014). While the ability of *Mycobacterium tuberculosis* to form biofilms remains obscure, many other species of mycobacteria, including *M. avium*, *M. fortuitum*, *M. marinum*, and *M. smegmatis*, are well-documented biofilm producers. (Syed et. al. 2014). Studies about biofilms are focused over bacteria that synthesized polysacharides biofilms; however the glycopeptidolipids (GPLs) are present in the outermost layer of the lipid-rich cell walls of some mycobacterial species (Sempere et. al. 1993). That topic it is important because to obtain a biofilm of *Mt* it's an opportunity to characterize it about its synthesis and composition. *Ms* with its short generation time and low biosafety requirements serves as an appropriate model to study *Mycobacteria* in general (Reyrat et. al., 2001) and also for assays of anti-tuberculosis agents. Some materials can work as a surface of growth because them physical and chemical characteristics. TiO₂ and hydroxyapatite for

example, they have been identified as a promotor of cell proliferation (Frances et. al. 2011). Recently, *Mt* growing over Al_2O_3 and CaSiO_3 porous supports has been reported (Hertog et. al. 2010). For another side, has been reported previously photocatalytic effects of TiO_2 and In_2TiO_5 UV irradiated over human blood, increasing the oxygen concentration, this element is necessary for *Mycobacterium* growth (Subrahmanyam y col., 2007). Also, it is known that In_2TiO_5 has highest photocatalytic activity than, for example, TiO_2 (Weng-Deng et al, 2007). The aim of this work is to show the results about biofilm developing by *Ms* over porous supports of HA: In_2TiO_5 synthesized and characterized in our laboratories. Do not exist previous reports about the growing of biofilm from *Mycobacterium* by that materials, and we were using it in this work basically because them photocatalytic properties which can produce oxygen from water and promote the growth of *Ms*.

2. Experimental

2.1 Synthesis of supports

The highest purity reagents In_2O_3 (99.9%) and TiO_2 (99.9%) commercially available, were mixed in 1:1 molar relation to obtain In_2TiO_5 by conventional solid state reaction [Senegas et al., 1975]. Mixtures of 50 mg of hydroxyapatite: In_2TiO_5 in 1:1 proportion were prepared as a supports in a hydraulic press Carver model C using 0.5 Tn for 10 sec, after that, supports were synthesized at 1200 °C during 48 h obtaining a rigid supports.

2.2 Apparatus

The XRD patterns were recorded on an X-ray powder diffractometer (Bruker Mod. D8 Advance) with a Cu anode and a graphite monochromator. Scanning electron microscope images and energy dispersive spectra were acquired using a JEOL JSM-5410LV scanning electron microscope, equipped with an Oxford X-ray Energy Dispersive Spectroscopy (EDS) analyzer operating at 15 KeV. The SDT 2960 simultaneous DSC-TGA TA instruments was employed for thermal gravimetric analysis (ramp rate, 10°C/min, 25 to 1400 °C) The oxygen concentration was analyzed in

samples immersed in Middlebrook 7H9 exposed to sunlight during 30 min in a Fisher Scientific Oxygen Metter using aerated Middlebrook (MDB) 7H9 medium for 1 hour as control.

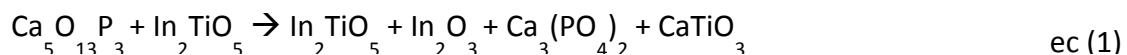
2.3 Resazurin Microtiter Assay Plate (REMA)

The resazurin reduction and the *M. smegmatis* growth was determined as a previously described (Khalifa et. al, 2013), with modification; the final drug concentrations tested was 64 µg/mL for gentamicin. After 2 days of incubation, 30 µL of resazurin solution was added to each well, and the plate was re-incubated overnight. A change from blue to pink indicates reduction of resazurin and therefore bacterial growth, and the minimal inhibitory concentration (MIC) was defined as the lowest concentration of the drug that prevented this change in color. The assays were performed using HA:In₂TiO₅ supports and solar light exposition during 30 min prior the contact with *M. smegmatis*.

3. Results

3.1 Supports characterization

Pellets of the HA:In₂TiO₅ mixtures were prepared using samples of 50 mg and compressed at 0.5 T during 10 sec. All the samples resisted the immersion in culture media and sterilization at 121 °C / 15 lb. In the figure 1 the TGA analysis are showed. The lost weight observed from 1200 °C suggested a chemical reaction it was happened. For another side, the XRD of samples syntherized at 1200 °C during 48 h were obtained. In figure 2 diffraction peaks corresponding with In₂TiO₅, CaTiO₃, In₂O₃ and Ca₃(PO₄)₂ are showed. That results confirmed the reaction between hydroxyapatite and In₂TiO₅.



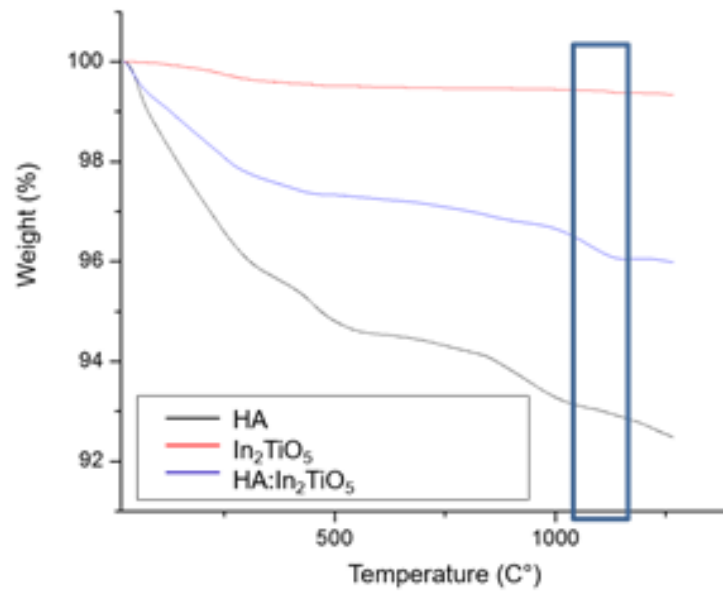


Figure 1. TGA of HA:In₂TiO₅.

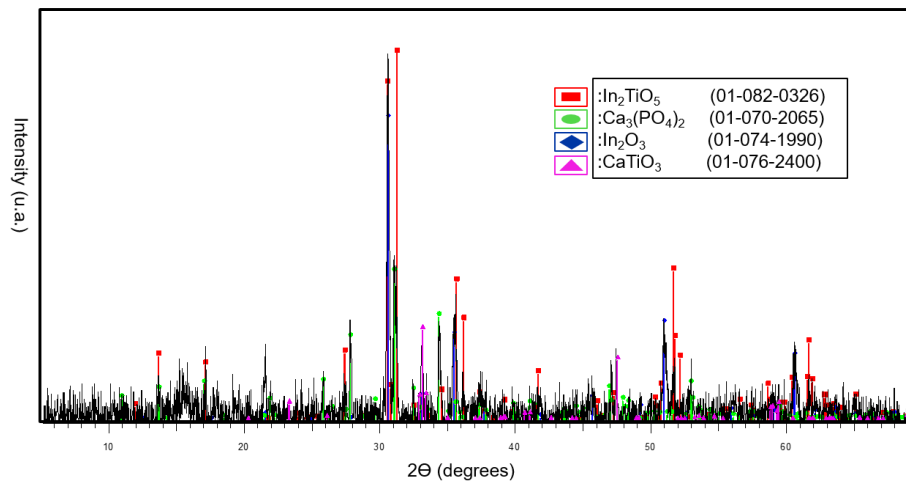


Figure 2. X-ray diffraction of HA:In₂TiO₅.

3.2 Biofilm formation on HA:In₂TiO₅ supports

The HA:In₂TiO₅ supports were put in each well of a sterile flat-bottom 96-well plate with 100 µL of Middlebrook 7H9 broth supplemented with OADC (oleic acid, albumin, dextrose, and catalase) (7H9-S) as culture media and 100 µl of bacterial inoculum adjusted using the turbidity McFarland standard 1 (3X10⁸ CFU/mL) and further diluted 1:50 in 7H9-S broth for the test. The plate was covered, sealed in a plastic bag, and incubated at 37 °C under a normal atmosphere. After 2 days of incubation the supports were fixed with formaldehyde at 10% for 2 hours and then were analyzed by SEM; the micrographs were compared with micrographs of HA:In₂TiO₅ after the sinterized process and without the addition of bacterial inoculum. The formation of porous surface was observed (Figure 3a); the porosity has been reported as a promotor of bacteria growth and cell adhesion to HA surface (Annaz et. al., 2004).

The micrographs obtained of supports after the incubation and *M. smegmatis* growth revealed the biofilm formation in which bacteria are embedded in a matrix of extracellular polymeric compounds attached to the surface of the support (Figure 3b,c). The bacterial conglomerates were observed inside the pores and through the surface of the support (Figure 3d).

3.3 Resazurin Microtiter Assay Plate (REMA)

Isolates of *M. smegmatis* were assessed in REMA by growth on supports of HA:In₂TiO₅ for resistance to Gentamicin on Middlebrook 7H9 broth by cultivation on plates containing serial dilutions of Gentamicin. The MICs obtained were compared between REMA assays with or without supports of HA:In₂TiO₅ and assays with HA supports (tabla 1). An increment on the lowest concentration of Gentamicin that inhibit *M. smegmatis* is related with a favorable growth impact attributed to the support and the biofilm formation over them. The MIC with supports of HA:In₂TiO₅ (2.0 µg/mL) was four fold higher than the MIC without supports of HA:In₂TiO₅ (0.5 µg/mL) and two

fold higher than the MIC with supports of HA; the MIC obtained using HA:In₂TiO₅ supports was higher than the MIC using HA supports.

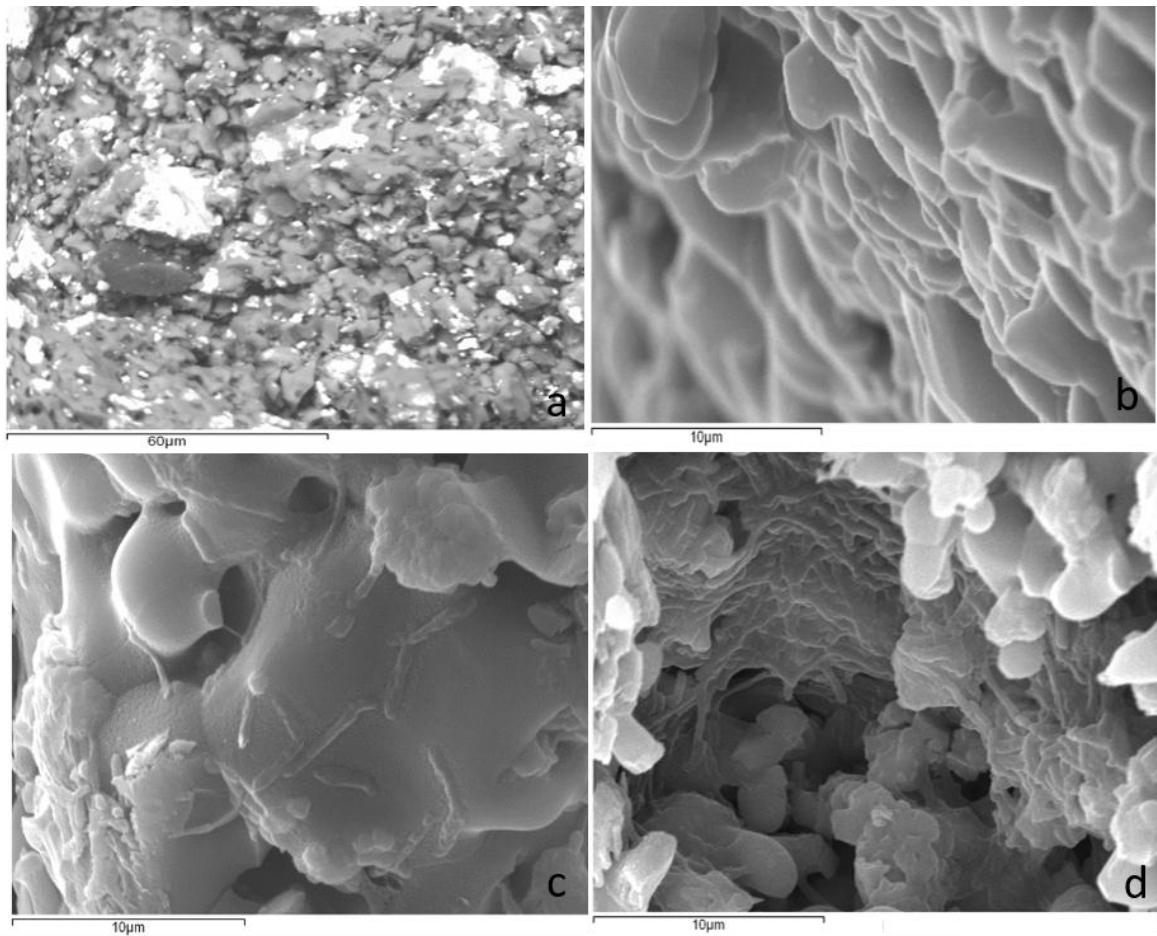


Figure 3. Micrographs of HA:In₂TiO₅ support without bacteria (a); the biofilm of *M. smegmatis* over HA:In₂TiO₅ support (b); *M. smegmatis* bacillus embedded in the biofilm (c); the bacterial conglomerates and biofilm formation of *M. smegmatis* over HA:In₂TiO₅ support (d).

Table 1. Minimum inhibitory concentration (MIC) of *M. smegmatis* on susceptibility to Gentamicin using HA:In₂TiO₅ supports exposed to sun light (SL).

Support	MIC (µg/mL)
Without supports	0.5
HA	1.0
HA:In ₂ TiO ₅	2.0
HA:In ₂ TiO ₅ + LS 30 min	4.0
HA:In ₂ TiO ₅ + LS 60 min	4.0

3.4 Photocatalysis Induced by Sunlight

In order to evaluate the photocatalytic effect of the materials on the *M. smegmatis* growth, REMA assays were performed with 30 and 60 min of exposition to solar light prior to the bacterial inoculum. The MIC was the same regardless of the exposition time and was 8 fold higher than the MIC obtained without supports (Table 1). It has been reported an increase of oxygen concentration on different systems where, the titanium derivatives materials as In₂TiO₅, had a photocatalytic effect. Mycobacteria are strictly aerobic organisms and the oxygen generated by the material might have been used by the bacteria and favored the growth and biofilm formation.

The determination of oxygen dissolved in MDB 7H9 was carried out using Winkler bottles and HA:In₂TiO₅ pills, after the sunlight exposition, the dissolved oxygen was measured by oxygen meter equipment calibrated with aerated MDB 7H9 with 100% air saturation as a maximum dissolved oxygen concentration. The experiment demonstrated a rise in oxygen dissolved more quickly in the medium exposed to sunlight with HA:In₂TiO₅ then in medium without the material; the maximum point of dissolved oxygen was 20% higher by the photocatalytic effect of In₂TiO₅ and CaTiO₃ perovskite materials, both components of supports immersed in the culture medium (Figure 4).

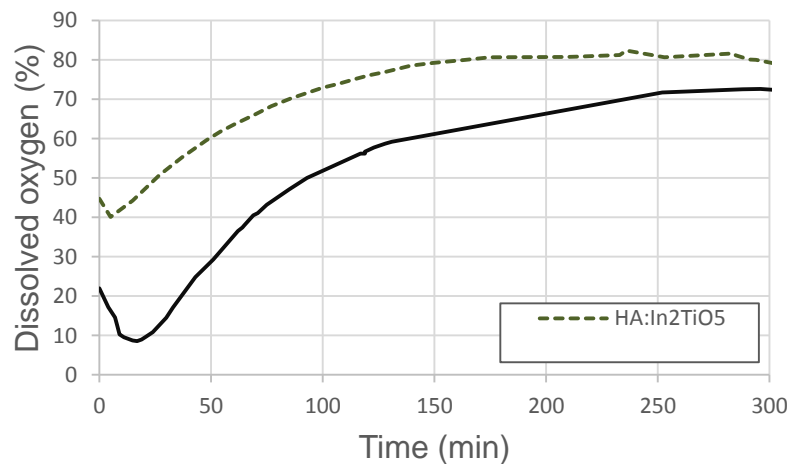


Figure 4. Dissolved oxygen versus time after 30 minutes of sun light exposition of HA:In₂TiO₅ samples on MDB 7H9 culture.

4. Conclusions

The growth and biofilm production were 8 times higher when the material was exposed to sunlight. This is attributed to the increase of oxygen on the culture medium via photocatalysis by In₂TiO₅ and probably by CaTiO₃ present on the support. Also, it is possible that HA properties can have a marked effect on bacterial growth.

An additional advantage is that the bacteria can be manipulated after culture and processed by imaging or microscopy methods. The material could be incorporated into an agar plate and be used with others microbial pathogens to study the effect of any drug or bacteriostatic agents. A significant additional advantage is in waste disposal and safety. HA:In₂TiO₅ can be used as a microarray platform for molecular assays, offering the prospect of coupling bacterial culture with molecular testing.

References

1. Annaz, B., Hing, K. A., Kayser, M., Buckland, T. (2004). Porosity variation in hydroxyapatite and osteoblast morphology: a scanning electron microscopy study. *Journal of Microscopy*, 215, 100-110.
2. Frances, R., Baxter, Irene, G., Turner, Christopher, R., Bowen, Jonathan, P. Gittings, Julian, B., Chaudhuri. (2009). An in vitro study of electrically active hydroxyapatite-barium titanate ceramics using Saos-2 cells. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20, 1697-1708.
3. Henke, J.M., Bassler, B.L. (2004). Bacterial social engagements. *Trends in cell biology*, 14, 648-56.
4. Hertog, A.L., Visser, D.W., Ingham, C.J., Fey F.H., Anthony, R.M. (2010). Simplified Automated Image Analysis for Detection and Phenotyping of *Mycobacterium tuberculosis* on Porous Supports by Monitoring Growing Microcolonies, *Anil Kumar Tyagi*, 5, 1008.
5. Khalifa, R.A., Nasser, M.S., Goma, A.A., Osman, N.M. (2013). Resazurin Microtiter Assay Plate method for detection of susceptibility of multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* second-line anti-tuberculous drugs. *Egyptian Journal of Chest Diseases and Tuberculosis*, 62, 241-247.
6. Kulka, K., Hatfull, G., Ojha, A.K. (2012). Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilms. *Journal of Visualized Experiments*, 60, 3820.
7. O'Toole, G.A., Kolter, R. (1998). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Molecular microbiology*, 28, 449-61.
8. Reyrat, J.M., Kahn, D. (2001). *Mycobacterium smegmatis*: an absurd model for tuberculosis?. *Trends in microbiology*, 9, 472-4.

9. Sempere, M.A., Valero-Guillén, P.L., de Godos, A., Martín-Luengo, F. (1993). A triacyl trehalose containing 2-methyl branched unsaturated fatty acyl groups isolated from *Mycobacterium fortuitum*. *Journal of general microbiology*. 139, 585-590.
10. Senegas, J.P., Galy, J. (1975). Sur un Nouveau Type d'Oxydes Doubles $M^{+IV} In_2O_5$ (M = Ti, V): Etude Cristallographique". *Acta Crystallogr. Sect. B*, 31, 1614.
11. Subrahmanyam, A., Arokiadoss, T., Ramesh, T.P. (2007). Studies on the oxygenation of human blood by photocatalytic action. *Artificial organs*, 31, 819-825.
12. Syed, A., Khalid, A., Sikander, K. Sherwani, Nazia, B., Shahana, U. K. (2014). Detection of Mycobacterium Smegmatis Biofilm and its Control by Natural Agents. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3, 801-812.
13. Wen-Deng, Fu-Qiang, Cun-Ming, Xin-Ping, Jian-Lin. (2007). Preparation, electronic structure and photocatalytic activity of the In_2TiO_5 photocatalyst. *Materials Science & Engineering B*, 139, 74-80.
14. WHO, World Health Organization. Global tuberculosis report. (2014). http://www.who.int/tb/publications/global_report/es/. Dic 08 2015.