



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



**FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
FACULTAD DE BIOLOGÍA**

Tesis

**EVALUACIÓN DEL DIÓXIDO DE TITANIO MODIFICADO CON PLATA (Ag-
TiO₂) SINTETIZADO MEDIANTE EL MÉTODO DE ANODIZADO, COMO
AGENTE ANTIMICROBIANO FRENTE A *Escherichia coli* y *Salmonella typhi*.**

PRESENTA

BIOL. ESTELA RUBI AVILA OJEDA

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA
AMBIENTAL.**

**DIRECTOR DE TESIS
Doctor en Ciencias de los Materiales
Rafael Huirache Acuña**

**CO-DIRECTOR DE TESIS
Doctor en Ciencias (Química)
Roberto Guerra González**

Morelia, Michoacán; Junio, 2023

Resumen

La fotocatalisis heterogénea ha despertado considerable interés en la última década, por características como abundancia y bajo costo, el dióxido de titanio (TiO₂) se encuentra entre los más estudiados, sin embargo, este material solo es fotoactivo bajo irradiación ultravioleta, lo que lo limita en la aplicación práctica de la tecnología basada en TiO₂. Para resolver este inconveniente se han explorado el modificar la superficie del TiO₂ con metales de transición, lo que disminuye el proceso de recombinación al formar hetero_estructuras y nuevas interfases que mejoran la eficiencia fotocatalítica. Por lo que en este trabajo se estudió el efecto de la incorporación de partículas de plata sobre TiO₂ sintetizado por el método de anodizado, obteniendo como resultado de los ensayos de síntesis del material probetas de nanotubos de TiO₂ impregnado con un 2.97 % en peso de Ag y soportados sobre Fe, los cuales se utilizaron en un ensayo de actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* y *Salmonella typhi*, en un proceso fotocatalítico empleando luz solar y luz UV, además de evaluar su eficiencia antimicrobiana en ausencia de tratamiento fotocatalítico, exhibiendo un efecto de reducción bacteriana bajo luz ultravioleta para *E.coli* en un 97.4% y para *Salmonella typhi* en un 96.5% y una tasa de muerte bacteriana en los experimentos realizados bajo luz solar para *E. coli* en un 86.5% y para *Salmonella typhi* en un 80.4%, concluyendo que el TiO₂-Ag es altamente eficiente frente a *E. coli* y *Salmonella typhi* en ambos procesos fotocatalíticos, empleando luz solar y luz UV, siendo el proceso de desinfección sin fotocatalizador menos eficiente.

Palabras clave: Desinfección, fotocatalisis, dióxido de titanio.

Abstract

EVALUATION OF TITANIUM DIOXIDE MODIFIED WITH SILVER (Ag-TiO₂) SYNTHESIZED BY THE ANODIZING METHOD, AS AN ANTIMICROBIAL AGENT AGAINST *Escherichia coli* AND *Salmonella typhi*.

Heterogeneous photocatalysis has aroused considerable interest in the last decade, due to characteristics such as abundance and low cost, titanium dioxide (TiO₂) is among the most studied, however, this material is only photoactive under ultraviolet irradiation, which limits it in the practical application of TiO₂ based technology. To solve this drawback, modification of the TiO₂ surface with transition metals has been explored, which decreases the recombination process by forming heterostructures and new interfaces that improve photocatalytic efficiency. Therefore, in this work the effect of the incorporation of silver particles on TiO₂ synthesized by the anodizing method was studied, obtaining as a result of the synthesis tests of the material TiO₂ nanotube specimens impregnated with 2.97% Wt of Ag and supported on Fe⁺², which were used in an antimicrobial activity test against *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*, in a photocatalytic process using sunlight and UV light, in addition to evaluating their antimicrobial efficiency in the absence of photocatalytic treatment, exhibiting a reduction effect bacterial under ultraviolet light for *E.coli* in 97.4% and for *Salmonella typhi* in 96.5% and a rate of bacterial death in the experiments carried out under sunlight for *E. coli* in 86.5% and for *Salmonella typhi* in 80.4%, concluding that TiO₂-Ag is highly efficient against *E. coli* and *Salmonella typhi* in both photocatalytic processes, using sunlight and UV light.

Keywords: Disinfection, photocatalysis, titanium dioxide.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. ANTECEDENTES | 4 |
| 2.1 El TiO₂ como material en los procesos de desinfección | 4 |
| 2.2 Eficiencia de desinfección del TiO₂ dopado con Ag a diferentes concentraciones de %Wt | 6 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 20 |
| 4. HIPÓTESIS | 21 |
| 5. OBJETIVOS | 22 |
| 5.1 OBJETIVO GENERAL | 22 |
| 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 22 |
| 6. MARCO TEÓRICO | 23 |
| 6.1 Aguas residuales y clasificación de sus fuentes | 23 |
| 6.2 Contaminantes de las aguas residuales | 23 |
| 6.3 Calidad del agua residual | 24 |
| 6.4 Bacterias | 25 |
| 6.4.1 Bacterias indicadoras de contaminación | 26 |
| 6.4.2 <i>Escherichia coli</i> | 27 |
| 6.4.3 <i>Salmonella typhi</i> | 32 |
| 6.5 Desinfección | 32 |
| 6.5.1 Clasificación de los agentes antimicrobianos | 32 |
| 6.5.2 Mecanismos de acción | 34 |
| 6.5.3 Agentes antimicrobianos inorgánicos | 36 |
| 6.6 Nanopartículas de plata | 37 |
| 6.7 Dióxido de titanio (TiO₂) | 37 |
| 6.8 Métodos de síntesis de Nanotubos de TiO₂ | 38 |
| 6.9 Anodización | 40 |
| 6.9.1 Nanotubos de TiO₂ por anodizado | 42 |
| 6.9.2 Parámetros de control en la morfología final del arreglo de nanotubos de TiO₂ | 42 |
| 6.10 Incorporación de impurezas y semiconductores tipo n | 47 |
| 6.11 Fotocatálisis heterogénea | 48 |
| 6.12 Breve discusión sobre las ventajas y desventajas generales del proyecto | 49 |

| | |
|--|----|
| 7. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL | 51 |
| 7.1 Síntesis de las probetas | 51 |
| 7.1.1 Depositación física de vapor (PVD) y anodizado electroquímico | 51 |
| 7.1.2 Anodización electroquímica | 52 |
| 7.1.3 Electrodeposición de Ag | 54 |
| 7.1.4 Tratamiento térmico | 56 |
| 7.1.5 Caracterización del material | 57 |
| 7.2. Anodizado e incorporación de Ag <i>in situ</i> | 59 |
| 7.3 Análisis de la actividad antimicrobiana | 60 |
| 7.3.1 Sitio de muestreo | 60 |
| 7.3.2 Toma y procesamiento de muestras | 61 |
| 7.3.3 Aislamiento de las cepas | 61 |
| 7.3.4 Identificación de las cepas | 61 |
| 7.3.5 Ensayo antimicrobiano; TiO₂-Ag frente <i>Salmonella typhi</i> y <i>E. coli</i> | 63 |
| 8. RESULTADOS | 67 |
| 8.1 Síntesis y caracterización del material | 67 |
| 8.1.1 Influencia del voltaje y la intensidad de corriente en la síntesis de nanotubos de TiO₂ por anodizado. | 67 |
| 8.1.2 Influencia de la variación del tiempo en la síntesis de los nanotubos de TiO₂ | 77 |
| 8.1.3 Tamaño de poro | 81 |
| 8.1.4 Análisis de composición química (EDS) | 82 |
| 8.1.5 Análisis mediante Difracción de Rayos X (XRD) | 84 |
| | 85 |
| 8.2 Efectos de la incorporación de Ag <i>in situ</i> | 86 |
| 8.3. Análisis de la actividad antimicrobiana | 89 |
| 8.3.1 Pruebas bioquímicas para la determinación familias de Enterobacteriaceae | 89 |
| 8.3.2 Análisis de la actividad antimicrobiana. | 90 |
| 9. CONCLUSIONES | 94 |
| 10. RECOMENDACIONES | 96 |
| 11. REFERENCIAS | 97 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Contaminantes biológicos. | 25 |
| Tabla 2. Clasificación de las cepas de <i>E. coli</i> causantes de cuadros de enfermedad gastrointestinal. | 27 |
| Tabla 3. Parámetros variables de anodizado. | 54 |
| Tabla 4. Parámetros variables de anodizado e impregnación in situ. | 59 |
| Tabla 5. Parámetros utilizados en el electrodepósito de Ag. | 55 |
| Tabla 6. Pruebas bioquímicas para la determinación familias de Enterobacteriaceae. | 62 |
| Tabla 7. Criterios para el conteo de colonias en placa de acuerdo a la NOM 092 SSA1 1994. | 64 |
| Tabla 8. Analisis de composición química probetas sintetizadas para el análisis antimicrobiano. | 83 |
| Tabla 9. Resultados de las pruebas de identificación de cepas de <i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella sp.</i> por pruebas bioquímicas. | 89 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Clasificación de las bacterias según su forma. | 26 |
| Figura 2. Pared celular de bacterias A) Gram positivas y B) Gram negativas. | 35 |
| Figura 3. Estructuras cristalinas del TiO ₂ : (A) Brookita, (B) Anatasa, (C) Rutilo. | 38 |
| Figura 4. Proceso de anodizado. | 41 |
| Figura 5. Tornamesa Struers modelo labosistem. | 51 |
| Figura 6. Equipo de ultrasonido X-tra. | 51 |
| Figura 7. A) DOMINO mini OERLIKON. B) Cámara de vacío. | 51 |
| Figura 8. Sistema planetario con rotación de tres ejes. | 52 |
| Figura 9. Sistema de anodizado. | 53 |
| Figura 10. Cronoamperograma obtenido para TiO ₂ -Ag. El pulso corresponde a E ₁ = -0.40 y t= 60 sg. | 55 |
| Figura 11. Horno de tubo para tratamiento térmico. | 56 |
| Figura 12. Mapa de Ciudad Universitaria, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Edificio R, Facultad de biología. | 60 |
| Figura 13. Microscopio electrónico de barrido. | 67 |
| Figura 14. Muestras montadas para analizar en el microscopio electrónico de barrido. | 67 |
| Figura 15. Micrografía de la superficie de acero recubierta de Ti a 2,000 x. | 67 |

| | |
|--|----|
| Figura 16. Micrografía de la superficie de acero recubierta de Ti a 5,000 x..... | 67 |
| Figura 17. Micrografía de la superficie de acero recubierta de Ti, donde se observa un “droplet” anodizado, en un proceso a 60V, 0.02 A, 60 min, 10,000 x y 20,000 x..... | 68 |
| Figura 18. Micrografía de la superficie de acero recubierta de Ti, de un proceso de anodizado a 60V, 0.02 A, 60 min, 70,000 x..... | 69 |
| Figura 19. Micrografía de la superficie de acero recubierta de Ti, de un proceso de anodizado; 30 V, 10,000 x, 0.02 A – 120 min..... | 74 |
| Figura 20. Micrografía de la superficie de acero recubierta de Ti, de un proceso de anodizado; 30V, 20,000 x, 0.02 A – 60 min..... | 75 |
| Figura 21. Micrografía de la superficie de acero recubierta de Ti, de un proceso de anodizado; 30V, 2,000 x, 0.04 A – 120 min..... | 76 |
| Figura 22. Micrografía de la superficie de acero recubierta de Ti, de un proceso de anodizado; 30V, 2,000 x, 0.04 A – 60 min..... | 77 |
| Figura 23. Micrografías de la superficie de acero recubierta de Ti de un proceso de anodizado a 30 V, 0.02 A y 10 min, A) 2,000 X y B) 5,000 x en la cuales se aprecia la formación de estructuras semejantes a la formación cristales o “nanograss”..... | 77 |
| Figura 24. Micrografías de la superficie de acero recubierta de Ti de un proceso de anodizado a 60 V, 0.02 A y 20 min, 50,000 X..... | 78 |
| Figura 25. Micrografías de la superficie de acero recubierta de Ti de un proceso de anodizado a 60 V, 0.02 A y 30 min, 20,000 X..... | 79 |
| Figura 26. Micrografías de la superficie de acero recubierta de Ti de un proceso de anodizado A) 60 V, 0.02 A y 40 min, 50,000 x, B)60 V, 0.02 A y 50 min, 10,000 x..... | 80 |
| Figura 27. Histograma de la distribución del tamaño de poro..... | 81 |
| Figura 28. Micrografía y espectro una probeta anodizada a 60 V, 0.02 A y 30 min, en la cual realizo un proceso de electrodeposición de Ag con tiempos de 5 minutos..... | 82 |
| Figura 29. Micrografía y espectro una probeta anodizada a 60 V, 0.02 A y 30 min, en la cual realizo un proceso de electrodeposición de Ag con tiempos de 5 minutos..... ¡Error! Marcador no definido. | |
| Figura 30. Micrografía y espectro una probeta anodizada a 60 V, 0.02 A y 30 min, en la cual realizo un proceso de electrodeposición de Ag con tiempos de 70 sg..... | 83 |
| Figura 31. Patrón de difracción de rayos X de TiO ₂ . Tratamiento térmico posterior al anodizado.. | 85 |
| Figura 32. Análisis de composición química (EDS): A) Imagen en capas, B) Mapa del espectro. Muestra sintetizada por 15 min..... | 86 |
| Figura 33. Microscopia electrónica de barrido: Muestra sintetizada por 7 min., (proceso de impregnación <i>in situ</i>)..... | 88 |
| Figura 34. Microscopia electrónica de barrido: Muestra sintetizada por 15 min., (proceso de impregnación <i>in situ</i>)..... | 88 |

| | |
|--|--------------------------------------|
| Figura 35. Análisis univariante del conteo de Unidades Formadoras de Colonias con respecto a los tratamientos utilizados frente a <i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella typhi</i> | 90 |
| Figura 36. UFC promedio para el Tratamiento “Luz solar-TiO ₂ Ag” frente a <i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella typhi</i> | ¡Error! Marcador no definido. |
| Figura 37. UFC promedio para el Tratamiento “Luz UV-TiO ₂ Ag” frente a <i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella typhi</i> | ¡Error! Marcador no definido. |
| Figura 38. UFC promedio contra el tiempo, sin tratamiento fotocatalítico frente <i>Salmonella tiphy</i> y <i>Escherichia coli</i> | 93 |

1. INTRODUCCIÓN

El agua es un recurso esencial para la vida y el desarrollo de la civilización humana, el hombre utiliza el agua en múltiples actividades, entre los cuales se encuentra la evacuación de vertidos y residuos variados (Marín, 2019). En países tropicales como América Latina y el Caribe, uno de los problemas sanitarios más críticos es la descarga incontrolada de aguas residuales domésticas sin tratamiento, las cuales contaminan los recursos hídricos superficiales, subterráneos y las zonas costeras (González *et al.*, 2003).

Un agua contaminada por agentes infecciosos y compuestos químicos tóxicos, expone a la población a enfermedades causadas por organismos entéricos y parasitarios de origen intestinal, tales como el cólera, la amebiasis, la hepatitis, la fiebre tifoidea y paratifoidea, entre otras, al consumir el agua contaminada o alimentos cosechados, irrigados, lavados o preparados con ellas (González *et al.*, 2003). Debido a esto su evaluación y tratamiento adecuados son aspectos fundamentales en la actualidad. La calidad microbiológica del agua suele medirse por medio de indicadores bacterianos de contaminación fecal como los coliformes y la posible presencia de microorganismos patógenos (bacterias, virus y quistes de amebas), que pueden causar enfermedades por transmisión hídrica (González *et al.*, 2003).

Los desinfectantes más utilizados en el tratamiento de las aguas residuales son los productos químicos oxidantes, de los cuales el cloro es el más empleado (Metcalf y Eddy, 1995), el agua sometida al proceso de desinfección puede contener precursores orgánicos como los ácidos húmicos y fúlvicos, estos precursores reaccionan con el cloro dando lugar a compuestos orgánicos clorados (Metcalf y Eddy, 1995).

La exposición a estos compuestos durante largos periodos de tiempo, da lugar a efectos adversos para la salud como; daño en las funciones reproductoras (disminución de la fertilidad, riesgo de aborto espontáneo, etc.), daños en el desarrollo fetal dentro del útero, daño a órganos como hígado y riñones, e incluso desarrollo de cáncer, sobre todo en la vejiga urinaria, de colon y recto y algunos con asociación menos significativa como cáncer de esófago (Olmedo, 2008). Por lo que se busca mejorar la eficiencia en los procesos de

desinfección existentes, e incluso explorar nuevas alternativas para llevar a cabo de forma segura la desinfección de aguas residuales.

La fotocatalisis heterogénea es un proceso de oxidación avanzado que incluye una gran variedad de reacciones como oxidaciones suaves o totales, deshidrogenación, transferencia de hidrógeno, depósito de metales, descontaminación de agua y acción bactericida, entre otras (Guarín y Mera, 2011). Esta técnica ha despertado interés por sus aplicaciones en los procesos de remediación ambiental, el procedimiento sustituye la activación térmica por una activación fotónica lo que la diferencia de la catálisis convencional (Herman, 1999).

El dióxido de titanio (TiO₂) es uno de los semiconductores más utilizados bajo radiación UV y UV-vis, en la degradación de contaminantes y la inactivación de bacterias y virus, debido a que presenta una elevada resistencia a la fotocorrosión. Es estable en soluciones acuosas, no es costoso, abunda en la naturaleza, es muy estable en el estado foto-excitado, su recombinación se lleva a cabo lentamente lo que lo hace un apropiado fotocatalizador, sobre todo bajo radiación ultravioleta (Vallejo *et al.*, 2016).

Cabe señalar que el TiO₂ es un material fotoactivo únicamente bajo irradiación ultravioleta, lo que limita su aplicación práctica, para resolver este inconveniente, se han explorado diferentes estrategias de síntesis que permitan optimizar su eficiencia fotocatalítica, modificando su superficie con metales de transición o algunos otros elementos como plata, platino, rutenio y paladio, lo que disminuye el proceso de recombinación al formar heteroestructuras y permite la formación de nuevas interfases que favorecen su eficiencia fotocatalítica (Vallejo *et al.*, 2016).

Su actividad antimicrobiana frente a bacterias, hongos y virus ha demostrado resultados favorables, principalmente cuando se encuentra en fase anatasa (octaédrica) y con tamaño nanométrico. Las nanopartículas de TiO₂ son utilizadas en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés), que causan daños específicos en el ADN, por lo que se ha empleado en la inhibición de bacterias como *Staphylococcus Aureus* y *Escherichia coli* (Vallejo *et al.*, 2016).

Así mismo la plata (Ag), se considera un agente microbiano de amplio espectro, que ha demostrado eficacia frente a microorganismos como *E. coli*, *Legionella*, *Pseudomonas*,

Salmonella, *Staphulococcus aureus* o *Aspergillus niger*, entre otros (Lin *et al.*, 2014; Vallejo *et al.*, 2016).

Por lo que en este trabajo se estudia el efecto de la incorporación superficial de partículas de plata sobre películas de TiO₂, para valorar sus propiedades antimicrobianas frente a *E. coli* y *Salmonella tiphy*, las cuales son bacterias causantes de enfermedades gastrointestinales en todo el mundo.

2. ANTECEDENTES

2.1 El TiO₂ como material en los procesos de desinfección

El proceso de desinfección utilizando TiO₂ como fotocatalizador fue inicialmente reportado por Matsunaga (1985), en un estudio en el cual, se utilizó un polvo semiconductor de óxido de titanio cargado de platino (TiO₂/Pt), en la inhibición de células microbianas de *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Escherichia coli*, demostrando que bajo incubación con TiO₂/Pt, utilizando partículas bajo irradiación de lámpara de halogenuros metálicos durante 60–120 min, se producía la inhibición de la actividad respiratoria, causando la muerte celular y una esterilización completa.

El TiO₂ es un semiconductor con una diferencia de energía (band gap) entre la banda de valencia y la de conducción de 3.2 eV, razón por la cual la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) se da únicamente bajo radiación UV. Se han documentado algunos procesos sobre la utilización de TiO₂ modificado en su superficie y activado por luz ultravioleta, utilizado como material de desinfección. Por ejemplo, Irie *et al.* (2003) y Premkumar (2004) encontraron que películas delgadas de TiO₂ dopadas con nitrógeno (N₂) depositadas sobre óxido de silicio (SiO₂) mostraron súper hidrofiliidad bajo luz visible, en ensayos frente a *E. coli* y *Staphylococcus aureus*, en un proceso de degradación en presencia de politetrafluoroetileno, encontrando que el rendimiento sinérgico de la propiedad fotocatalítica sensible a la luz visible solamente aparecía cuando la concentración de politetrafluoroetileno era mayor que el punto crítico sobre el que aparece la propiedad superhidrofóbica del material, ya que la superficie hidrófoba conduce a una baja energía libre superficial, lo que dificulta que las bacterias se adhieran a la superficie hidrófoba del compuesto. Incluso si las bacterias se anclan a la superficie se descomponen por el material fotocatalítico sensible a la luz visible. Además sugieren que la actividad mostrada con la luz visible sería causada por la disminución del valor del “band gap”, como fue descrito por Asahi *et al.* (2001).

Otros autores como Galarza *et al.* (2002) y López (2014), analizaron el efecto antimicrobiano del TiO₂ frente a *E. coli*, utilizando nanopartículas de TiO₂ comercial (P25-Degussa), en procedimientos simples para aplicaciones fotocatalíticas en el tratamiento de agua. Galarza *et al.* (2002), comparó su efectividad en dos tratamientos, el primero utilizando

nanopartículas de aproximadamente 50 µm de diámetro y con un área específica de 30 m²/g, y el segundo utilizando únicamente partículas de TiO₂ en suspensión, los cuales fueron irradiados bajo radiación ultravioleta (UV) y puestas en contacto con muestras de agua obtenidas de pozos artesanales ubicados en los alrededores de Huaycán, situado en la periferia de Lima, Perú. Llevando a cabo una prueba de número más probable de coliformes totales y fecales, antes y después del tratamiento con TiO₂ irradiado, además midieron los parámetros fisicoquímicos de radiación solar, temperatura, turbidez y pH, antes y después del tratamiento. Encontrando que a 100 horas de irradiación UV la transmitancia a 500 nm decrece del 85 % al 55 %, mientras que, en rango ultravioleta, a 370 nm, la transmitancia decrece del 75 % al 25 %. Además, se observó que un aumento en la temperatura de irradiación, arrojaba mejores resultados en el proceso de desinfección, observando con esto un aumento en el pH de la muestra. Con respecto al ensayo microbiológico se encontró que en el caso de las nanopartículas de TiO₂ depositadas sobre SiO₂, en 30 min de irradiación se disminuyó el 68% de la concentración inicial.

Por su parte López (2014), evaluó el efecto de inmovilización bacteriana y la capacidad de desinfección de *E. coli*, utilizando el TiO₂ sobre un soporte de bajo costo, para lo que caracterizó sus materiales, mediante DRX, Microscopía Electrónica, espectroscopías UV y EDS, comprobando que el tratamiento para la fijación del fotocatalizador no afectaba la estructura cristalina del TiO₂. Para el estudio se corroboró la capacidad de reutilización del soporte, ratificando su resistencia mecánica y la posibilidad de reutilización del TiO₂ soportado arcilla. Como resultado se encontró que el soporte no interfiere con el proceso de desinfección confirmándose como un buen sustrato, además se observó que el efecto de la concentración inicial de microorganismos influye sobre el tiempo en que se alcanza el límite máximo permisible por la normatividad ambiental para la descarga de aguas residuales (<103NMP/100mL). Respecto al efecto de la irradiación sobre la desinfección, se observó que, para el mismo número de capas material, que con la irradiación mínima (1.3-1.4 mW/cm²) disminuye la concentración inicial, alrededor de 10⁶ NMP/100mL) de aproximadamente un orden de magnitud; mientras que al incrementar la irradiación (2.4-2.5 mW/cm²) la disminución es de alrededor de 3-4 órdenes de magnitud a una hora de irradiación.

Existen resultados polémicos sobre la toxicidad de las partículas de TiO₂, por lo que Lin *et al.*, 2014 llevaron a cabo un estudio para dilucidar la nanotoxicidad y los mecanismos de acción bactericida en cinco tipos de nanopartículas de TiO₂, con tamaños de partícula entre los 10-50 nm, además de presentar distintas fases cristalinas, esto frente a *E. coli* como organismo de prueba. Además, examinaron el efecto de la química del agua en la nanotoxicidad. Encontrando que los efectos antibacterianos de las nanopartículas de TiO₂ disminuyeron con el aumento del tamaño de las partículas y en presencia de la fase rutilo. Sugieren que más bacterias podrían sobrevivir a un pH más alto (5,0–10,0) y a la fuerza iónica, la cual es afectada en la fase anatasa. Por lo que afirman que los nanotubos de TiO₂ con estructura cristalina de anatasa y menor tamaño de partícula produjeron un mayor contenido de especies de oxígeno reactivo intracelular y malondialdehído, que concuerda con su mayor efecto antibacteriano. Las observaciones mediante microscopía electrónica de transmisión revelaron la acumulación de nanopartículas de TiO₂ en su forma anatasa, especialmente aquellos con tamaños de partícula más pequeños en las superficies celulares, lo que llevó a daños en la membrana e internalización.

2.2 Eficiencia de desinfección del TiO₂ dopado con Ag a diferentes concentraciones de %Wt

Smoken *et al.*, (2001) llevaron a cabo la síntesis de catalizadores de TiO₂ puro y con una carga de plata al 1% en peso. Los cuales fueron evaluados bajo irradiación de una lámpara de mercurio a distintos tiempos y con un pH neutro, con la finalidad de explorar un sistema con catalizador TiO₂ modificado para la desinfección completa de *E. coli*, dentro de un tiempo de iluminación más corto y comparar la eficacia de los sistemas Ag-TiO₂/UV y TiO₂/UV. Para el estudio se determinó la dosis óptima de Ag-TiO₂ para una concentración celular dada y se llevó a cabo la formación y degradación del malondialdehído (MDA) con el mismo sistema catalítico, para lo que propusieron distintas vías de degradación. Para llevar a cabo la síntesis del material fotocatalítico se añadió 9.2 ml de una solución 0,1 M de AgNO₃ a 10 g de TiO₂ y Ca y 10 ml de una solución de 1,0% (w/v) de Na₂CO₃. Posteriormente la solución se secó y horneó durante 6 horas a 400°C, este fue finamente molido y guardado en un recipiente para evitar la humedad. Finalmente, se pesaron las cantidades necesarias de TiO₂ y Ag-TiO₂, y fueron colocadas en el recipiente de reacción Pyrex que contenía

suspensión *E. coli* con condensador. Las cepas de *E. coli* (ATCC 25922), se cultivaron previamente aeróbicamente en 100 ml de perfusión cerebro-corazón a 37°C durante 18 h, los microorganismos se cultivaron a 25°C. Acto seguido se prepararon muestras acuosas de 100 ml, las cuales contenían 1×10⁸ cfu/ml de concentración inicial de *E. coli* y se sometieron a la lámpara de mercurio (300W, 294 nm, intensidad de luz a 5,8 W/m² (cerca de la longitud de onda de 254 nm), situada a 10 cm de distancia. El análisis se realizó en triplicado y también se llevaron a cabo recorridos de control en las mismas condiciones. El número de células viables en las suspensiones de todos los materiales de TiO₂ o los tratamientos ligeros y las corridas de control de Ag-TiO₂ se determinaron mediante el chapado de 30-100 µl alícuotas de muestras retiradas en placas de agar de sangre. Las placas fueron incubadas a 30°C por 24 h y se contabilizó el número de colonias. Los resultados arrojaron que el sistema con el catalizador TiO₂-Ag 1% en peso eliminó por completo a la concentración inicial de *E.coli* (1×10⁸ cfu/ml) en un periodo de 30 minutos bajo irradiación de luz ultravioleta de 40 W de potencia, mientras que el sistema con TiO₂ puro sometido a irradiación de luz ultravioleta mostró un 100% de daño celular en un periodo de 15 minutos, ambos sistemas se consideraron igual de efectivos y se atribuyó la actividad antibacteriana al porcentaje de plata en el sistema TiO₂-Ag/UV. Con respecto a la producción de MDA, esta no difirió entre los sistemas de forma significativa. Sobre la influencia de la cantidad de TiO₂-Ag, consideran que altas concentraciones podrían provocar una disminución de la penetración de la luz ultravioleta, la cantidad de catalizador fue modificada entre 0.1 y 1.0 mg/ml, observando que una cantidad menor de catalizador TiO₂-Ag (0.1 mg/ml) en el sistema, sigue siendo eficaz frente a *E. coli* y mejora de forma significativa la degradación de MDA, liberando únicamente 50 ppb y una eficiencia del 100% en 15 minutos.

Reddy *et al.*, (2007), sintetizaron una serie de catalizadores compuestos de hidroxiapatita (HAP), 1% en peso Ag-TiO₂ (AT1), 1% en peso Ag-HAP y 5% en peso de Ag, preparados mediante los métodos de impregnación incipiente y mezcla mecánica, con la finalidad de medir su eficiencia de desinfección frente organismos patógenos presentes en el agua para consumo (en este caso *E. Coli*). Para su preparación se utilizó dióxido de titanio Degussa (P-25, 80% anatasa y 20% rutilo, de un área específica = 50 m²/g) y una serie de sales precursoras activas; nitrato de calcio tetrahidratado, fosfato de dihidrógeno, hidróxido de

amonio, nitrato de plata, etanol y cloruro de sodio. Los catalizadores se caracterizaron mediante las técnicas de difracción de rayos X (XRD), espectroscopía FT-IR, SEM y ESCA y sus actividades bactericidas fotocatalíticas se midieron en suspensión utilizando caldo *E. coli*, agar *E. coli* y la bacteria *E. coli* suministrada por la Microbial Type Culture Collection (MTCC). En el estudio de la actividad fotocatalítica se utilizaron placas petriplas de capacidad de 50 ml en agitación constante (50 rpm) a temperatura ambiente y pH de 6.5, las cuales contenían aproximadamente 0.75 g/l de catalizador y 25 ml de suspensión bacteriana, estas fueron sometidas a irradiación bajo lámpara de mercurio (250 W) de modo que la circunferencia de radiación cubría todas las placas del estudio, bajo una radiación en un rango de longitud de onda entre los 320-240 nm. Durante el experimento se utilizó un ventilador de refrigeración por aire para reducir la temperatura debido a la irradiación. Un porcentaje en peso de Ag como dopante al 5% de TiO₂ y el 5% AT1, además de los catalizadores de Ag soportados en HAP (5% en peso). El análisis superficial reveló que la relación Ag/Ti se encuentra en el punto 0.0273 y también indicó que el titanio está presente en forma de Ti⁴⁺ y la plata está presente como plata metálica, la cual tuvo un papel importante en la actividad bactericida de los catalizadores. Las propiedades fotocatalíticas del sistema catalítico TiO₂-Ag 1% en peso resultaron en una reducción del 100% de la bacteria *E. coli* en 16 minutos.

Kubacka *et al.*, (2008), investigaron la capacidad del TiO₂ para eliminar microorganismos mediante la adición de plata. El TiO₂ fue preparado por el método Sol-gel/microemulsión, dando como resultado un sólido con fase cristalina anatasa, el cual fue calcinado a 450 °C durante 2 h y se le depositó un %Wt de plata de 0.5-2.5% por impregnación húmeda incipiente utilizando 0,6 ml/g de una solución acuosa de AgNO₃, como primer método. Para el segundo método utilizaron la fotodepositación a través de una suspensión acuosa de titanio (5 g/l) en presencia de 10 v/v% de etanol como agente de sacrificio, la cual fue irradiada (lámpara Hg, 400 W) durante 4 h bajo un flujo de nitrógeno. Las muestras fotodepositadas fueron posteriormente sometidas a filtración y secado nocturno a 110 °C. Las propiedades de los materiales sintetizados fueron analizadas por un enfoque multitécnico utilizando espectroscopias XRD, Raman, UV-vis y electrón paramagnetic resonance (EPR). Sus propiedades antimicrobianas fueron analizadas frente a *E. coli* (CECT 101) como microorganismos de referencia, para lo cual fue cultivado a 37°C sobre placas de Agar Luria-

Bertani y posteriormente utilizada para ensayos de viabilidad de células químicas fotográficas.

Para estudiar la actividad antimicrobiana de los catalizadores basados en TiO₂, prepararon dos suspensiones. La primera suspensión fue una solución acuosa del material a 1 mg/ml utilizando agua esterilizada y la segunda contenía 10 ml de células microbianas (10⁹ CFU/ml) suspendidas en solución de caldo de 1 ml. Las alícuotas de ambas suspensiones se añadieron a una celda cúbica de cuarzo de 4 ml (5 mm de longitud) que contenía 1 ml de agua esterilizada. Los purines de óxido-célula se colocaron en la cámara del espectrómetro UV la cual fue irradiada con una luz UV-B de 280 nm durante diferentes periodos de tiempo bajo agitación continua. Se midió una potencia de 0,5 W/m² en la muestra; esto representó una fluencia máxima de energía de radiación (tiempo de potencia) por debajo de 1 kJ/m² durante el experimento. Dicha dosis de radiación no mostró una influencia significativa en la viabilidad celular. Después de la irradiación y para diferentes intervalos de tiempo, las alícuotas de 100 ml se transfirieron a un tubo de ensayo de caldo de lisogenia de 10 ml. La pérdida de viabilidad después de cada tiempo de exposición fue determinada por el procedimiento de recuento viable en placas de agar LB (Miller) después de la dilución en serie, todas las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 h antes de la enumeración. El análisis antimicrobiano se llevó a cabo por triplicado. Las curvas de inactivación mostraron dos procesos de decaimiento correspondientes a la parte inicial y final de los experimentos que se modelaron mediante el uso de dos ecuaciones de decaimiento exponencial y se utilizaron las tasas de inactivación correspondientes para comparar el rendimiento de los catalizadores. Ambas series de muestras de Ag-TiO₂ muestran la actividad fotocatalítica máxima para una carga de plata del 1% en peso, pero se comportan de manera muy diferente para cargas de plata más altas.

Castro *et al.*, (2009), prepararon dos series de fotocatalizadores basados en TiO₂, esto con el objetivo de medir la degradación helio-fotocatalítica frente a *E. coli* en sistemas tipo SODI. La primera serie se preparó mediante el método de impregnación húmeda del TiO₂, utilizando una solución acuosa o alcohólica según la solubilidad de las sales precursoras utilizadas: AgNO₃ (Merck), FeNO₃ (Merck), (NH₄)₆Mo₇O₂₄ (Merck), C₄H₆O₄Pd (Sigma). A un volumen determinado de una suspensión de 100g/L de TiO₂ en agua desionizada se le agregó

la solución de la sal precursora. La cantidad de sal empleada fue aquella que condujera a un contenido nominal de metal de 0.1 o 0.5% en peso, según el caso. Esta serie se denominó M(x)-P25. La segunda serie de catalizadores, TiO₂ y TiO₂ modificado con Fe⁺² y/o Ag⁰, se preparó mediante el método sol-gel, a la mezcla inicial se le adicionó la solución de la sal precursora del metal (AgNO₃ o FeNO₃.9H₂O), en una proporción tal que el contenido nominal de cada metal fue de 0.1% en peso. Esta serie de fotocatalizadores se denominó M(x)-SG, el sistema de experimentación se mantuvo entre los 38-40°C y el experimento en periodo de oscuridad tuvo un tiempo de 24 h. Los investigadores encontraron que el sistema con el fotocatalizador con Ag (0.5 % en peso) alcanzó una desinfección total en 20 min. Sin embargo, existe un efecto mayor a la acción fotocatalítica, que es atribuible a las propiedades bacteriostáticas que por su naturaleza tiene la Ag⁰. En el control que se hizo en oscuridad con este fotocatalizador se observó una disminución del 90% en la concentración de *E. coli*, estos resultados se compararon con el comportamiento de otros fotocatalizadores entre ellos el fotocatalizador con Mo⁰ de la misma serie (0.5 % en peso) y se observó que la presencia de Mo⁰ disminuye la actividad bactericida y retarda la acción de la Ag⁰ en el fotocatalizador cuando se encuentran co-impregnados.

Posteriormente Castro *et al.*, (2011), llevaron a cabo la síntesis de material fotocatalítico TiO₂-Ag a diferentes concentraciones en peso de Ag, con el objetivo de medir la actividad bactericida frente a la cepa *E. coli* ATCC. Para lo cual el material a utilizar fue sintetizado, por el método hidrotérmico de la siguiente manera: 3.8 ml de butóxido de titanio (99,9%, Fluka) se añadió gota a gota a 19 ml de isopropanol (Suprasol reactivo de grado, Merck), una cantidad adecuada de AgNO₃ (Merck) y se diluyó en 2 ml de agua (pH = 1,5) ajustada con HNO₃ (65%, Merck). Ag en solución acuosa se añadió gota a gota a la solución isopropóxido-isopropanol con una concentración adecuada para obtener porcentajes en peso nominal Ag⁰ (% Wt), de 0,5, 2, 4 y 8. El gel formado se calentó en autoclave durante 3 h a 120°C y ~144 KPa. Los cristales húmedos obtenidos fueron molidos en mortero, se secaron en horno a 60°C durante 12 h, y se mantuvieron en la oscuridad para evitar la oxidación superficial. Las muestras fueron etiquetadas como Ag(x)-TiO₂, x = Ag⁰ % Wt. La actividad bactericida se midió mediante el muestreo de la cepa *E. coli* ATCC 11229 utilizando fotorreactores Pyrex con 50 ml de una suspensión de TiO₂ de 0.1 g/L. Antes de los experimentos, las bacterias fueron inoculadas en los medios de crecimiento de Luria Bertani y cultivadas durante 8 h a

37°C. Durante la fase de crecimiento estacionario, las bacterias fueron cosechadas por centrifugación a 5000 rpm durante 10 minutos a 4°C, el pellet bacteriano obtenido fue lavado tres veces con solución salina. Una concentración celular adecuada (10⁷ CFU por ml) fue inoculada a las suspensiones de los reactores. Las suspensiones se iluminaron durante 2 h, y se tomaron muestras de 1 ml a intervalos de tiempo diferentes. Las diluciones en serie se realizaron en solución salina y se inocularon 10 muestras, 4 veces en el agar de recuento de placas. El número de colonias se contabilizó después de 24 h de incubación a 37°C. La concentración de bacterias también fue seguida en la oscuridad, Ag-TiO₂ y TiO₂ para analizar la muerte celular, inducida por la toxicidad de los materiales. Además, para analizar la posible lixiviación de Ag⁰ a Ag⁺², la suspensión se agitó bajo la oscuridad durante 10 h y luego se filtró. Dado que *E. coli* es inactivada por iones de Ag⁰ en solución es posible entonces determinar si hay lixivado. Además, se tomó una determinación adicional de la concentración de *E. coli* para analizar el tiempo necesario para una desinfección efectiva. En este caso una muestra de cada reactor con Ag-TiO₂ fue tomada después de 1 h de irradiación y mantenida bajo la oscuridad durante 24 h. Después de este período las muestras fueron sometidas a chapado e incubación, y finalmente, las colonias se contaron con placas de agar. El tiempo efectivo de irradiación (EDT) para la inactivación se asignó a la muestra con cero bacterias contando después de 24 h bajo la oscuridad y fue etiquetado como EDT₂₄. Respecto a la caracterización del material se encontró que existía una respuesta de luz interesante para las muestras cargadas de Ag⁰. Sugieren que un aumento de la concentración Ag⁰ induce un cambio en la absorción de luz al rango visible para longitudes de onda de hasta 800 nm. En muestras cargadas de Ag⁰ al 0.5% en peso, no se mostró un aumento significativo en la capacidad de absorción visible del material. Además, la muestra de 8% muestra un pico similar a un hombro a ~460 nm que se ha propuesto para Ag⁰ nanopartículas que inducen a la absorción de luz, esto se conoce como efecto de resonancia de plásmón superficial que en este caso se cree pudo inducir fotoactividad de TiO₂ bajo irradiación visible. La fase anatasa se identificó como la fase cristalina primaria en ambas muestras, además se identificó un pico ligero asignado a la fase brookita para todas las muestras, cabe señalar que las fases relacionadas con Ag no se identificaron en ninguna de las muestras debido a bajas concentraciones. Por otra parte, las propiedades texturales evidencian materiales mesoporosos con área alta, se sugiere que la carga de Ag⁰ causó una disminución significativa

de S⁻² probablemente debido a la depositación de agregados de Ag en la superficie de TiO₂, que conduce así a la obstrucción de los poros. Con respecto al análisis de la actividad antimicrobiana los resultados no mostraron toxicidad del TiO₂ puro, mientras que el TiO₂ dopado con Ag al 2% y 4% en peso disminuyeron totalmente la población de *E. coli*, en 180 y 60 minutos de contacto, respectivamente.

A diferencia Ubonchonlakate *et al.*, (2012), incorpora las películas puras y modificadas con la impureza de plata sobre laminillas de fibra de vidrio, mediante el método sol-gel, midiendo su actividad antimicrobiana frente a *Pseudomonas aeruginosa* bajo radiación UV. Para ello prepararon una solución que contenía: 10 ml de isopropóxido de titanio (IV) y 2g de PEG (polietilenglicol) 4000 en 100 ml de etanol al 95%, mezclado con una solución gota a gota de nitrato de plata (AgNO₃) en 50 ml de etanol, la mezcla se mantuvo en agitación vigorosa y temperatura ambiente durante 1 hora hasta que se formó un sol. Las muestras de fibra de vidrio se revistieron con sol-gel, preparado por inmersión y secado en horno a 100°C durante 12h, antes de la calcinación a 500°C durante 1 h. Para llevar a cabo el análisis de la actividad antibacteriana cultivaron *Pseudomonas aeruginosa* aeróbicamente, en 4 ml de caldo tripticasa de soya a 35°C durante 24 h, las unidades formadoras de colonias se determinaron extendiendo sobre agar MacConkey en placa, las cuales se incubaron durante 24 h a 35°C. Para llevar a cabo el conteo del número de colonias bacterianas para determinar las tasas de inhibición de crecimiento. Estos encontraron que la eficiencia de desinfección era del 100% y 99% en un periodo de 15 minutos en las películas puras y dopadas con Ag⁰, respectivamente. Mientras que en las películas sin impureza era de un 57% y 93% aproximadamente. Por los resultados concluyeron que la adición de PEG parece tener un ligero efecto en la fotoactividad debido a su estructura porosa. Las películas con la impureza de plata presentaron tamaños mayores de cristales y una mejor eficiencia de desinfección. Esto se lo atribuyen a las especies de plata que coexisten (Ag⁺ y Ag⁰), y el metal Ag⁰ actuando a través de electrones fotogenerados que ocupan sitios que impiden que los pares de electrones se recombinen rápidamente después de la excitación, esto conduciría a la mejora de la actividad fotocatalítica, debido a la producción de más radicales hidroxilos. Además, la plata en sí es un buen agente antibacteriano. Los mecanismos de plata en las películas de TiO₂ son debido a la interacción de enzimas dañadas por óxido de plata o plata y daños en la membrana celular por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), cuando las

células se contactan con superficies de las película de Ag-TiO₂. Se demostró además que los iones de Ag⁰ evitan la replicación, modificando la estructura del ADN, lo que conduce al daño de la membrana celular. Durante el estudio los iones de plata fueron fotoactivos en las irradiaciones UV-A y también UV-C, lo que llevó a la mejora de la inactivación de bacterias.

Suri *et al.*, (2012), llevaron a cabo desinfección fotocatalítica heterogénea usando Ag⁰ y Pt⁴⁺, incorporado sobre TiO₂, bajo luz cercana a la radiación UV y la irradiación de luz solar. Los investigadores realizaron experimentos de desinfección en reactores de lodos con *E. coli*, bajo luz artificial y luz solar. Durante el estudio examinaron la influencia de varias cantidades de carga de Pt y Ag (0.5% a 5%) en la inactivación de *E. coli*. Los resultados indicaron que para los materiales al 5% de Pt-TiO₂ y 0.5% Ag-TiO₂ se observó la inactivación fotocatalítica más alta de *E. coli*. Además se estudió la influencia de parámetros experimentales usando varios fotocatalizadores, concentración de fotocatalizador, efecto de geometría del reactor, pH y temperatura en la desinfección fotocatalítica. Los resultados experimentales muestran que la luz solar o la luz con longitud de onda cercana al UV con TiO₂ como fotocatalizador, inactiva fuertemente *E. coli*.

De igual manera Pam y Lee, (2014), prepararon TiO₂ sobre fibras de vidrio dopado con Ag⁰ con la finalidad de utilizarlo en un proceso de desinfección fotocatalítica frente a *Escherichia coli*. Para llevar a cabo la síntesis del material se disolvieron tetra isopropil orto titanato (TIOT) y ácido nítrico (HNO₃), en agitación constante durante 8 h en agua destilada para obtener una solución transparente de TiO₂, posteriormente, la solución se mantuvo a 60 °C durante 8 h para preparar una solución coloidal de óxido titanio, que se utilizó para el recubrimiento de TiO₂ en la fibra de vidrio, esta se sumergió en la solución coloidal, después de lo cual el TiO₂-fibra de vidrio recubierta fue sacada y secada a 100 °C durante 8 h. El proceso de secado por inmersión se repitió varias veces para producir el espesor de la capa de TiO₂. La fracción en peso de TiO₂ en el TiO₂/GF utilizado para el estudio fue del 3%. Para preparar el catalizador Ag-TiO₂/GF, se incorporó una solución de AgNO₃ de 0.05 Mg, en el material de TiO₂/GF. Obteniendo una fracción en peso de Ag⁰ en el Ag/TiO₂ del 1%, 2,5%, 5%, 7,5% y 10%. Todos los materiales fotocatalíticos fueron calcinados a 200 °C durante 2 h antes de ser utilizados para el proceso de desinfección bacteriana. El análisis se realizó en un ambiente de aire utilizando tres condiciones de

humedad ($40 \pm 5\%$, $60 \pm 5\%$, $80 \pm 5\%$), el contenido de plata en Ag/TiO₂ fue alterado al 1% y 10%, para investigar la proporción óptima de dopado de Ag en el material para la desinfección fotocatalítica. Durante el estudio se observó que el dopado con plata mejoró la separación de electrones y huecos, así como la eficiencia de la transferencia de carga entre la banda de valencia y la banda de conducción de TiO₂. La actividad de desinfección fotocatalítica bajo luz visible aumentó con el incremento en el contenido de Ag hasta un 7.5% y luego disminuyó ligeramente con un aumento aún mayor de contenido de Ag⁰. La mayor relación de desinfección y capacidad de desinfección frente a *E. coli*, se encontraron bajo el 7.5% de Ag-TiO₂/GF y el nivel intermedio de humedad ($60 \pm 5\%$), con valores de 93.53% y 26 (CFU/s cm²), respectivamente.

Brugnera *et al.*, (2014), sintetizaron electrodos auto organizados de nanotubos de TiO₂ impregnados con entre el 0% y el 16% de las nanopartículas Ag, analizando su eficiencia de desinfección frente a *Mycobacterium smegmatis*, los tubos fueron sintetizados por la técnica de anodizado, para lo cual se prepararon láminas de titanio (Goodfellow Cambridge Ltd., 0,5 mm de espesor, 99,6%) como sustrato para el crecimiento de los nanotubos de óxido de titanio. Las tiras (5 cm × 5 cm y 1 cm × 1 cm) fueron cortadas y pulidas mecánicamente usando abrasivos de rugosidad sucesivamente más fina (400, 600 y 1200) y limpiadas usando tres pasos que implica el uso de ultrasonido en acetona, etanol y agua ultra pura, durante 15 minutos cada una seguida de secado en flujo de N₂. Las tiras limpiadas se utilizaron inmediatamente. La anodización se realizó en una configuración de celda de dos electrodos, donde la lámina de Ti tratada se utilizó como ánodo y una lámina de platino (Pt) como cátodo. Ambos fueron colocados en una solución de mezcla de 0.25% (w/w), NH₄F con glicerol y agua (relación 90:10 vol%). La anodización se realizó a un voltaje constante de 30 V durante 50 h. A continuación, se enjuagaron los nanotubos de Ti/TiO₂ recién generados en agua destilada y se secaron utilizando aire. Finalmente, se realizaron la impregnación de nanopartículas de Ag, de tres formas distintas; reducción fotoquímica de Ag depositado en nanotubos de Ti/ TiO₂ con luz ultravioleta, electrorreducción de Ag⁺ y reducción química de Ag⁺ por ácido gálico y borohidruro de sodio depositado en nanotubos de TiO₂. Los electrodos se caracterizaron por difracción de rayos X (XRD), microscopía electrónica de barrido (SEM), espectroscopia de energía dispersiva de rayos X (EDS). Los mejores resultados se obtuvieron mediante reducción fotoquímica, después de la inmersión en una solución de

AgNO₃ 0.05 M (pH 8). Además, el comportamiento antimicrobiano de los electrodos Ti/TiO₂-Ag aplicados en fotoelectrocatalisis presentó desinfección del 100% en 3 minutos mediante el uso de irradiación UV y el 99,6% en 30 min con irradiación visible. Además, el análisis de la plata en solución a lo largo de la reacción muestra una lixiviación insignificante y una alta estabilidad de los depósitos de plata superficial.

Wong *et al.*, (2015), Reportaron con anterioridad que una de las limitaciones más importantes a tratar respecto a las películas de TiO₂ modificado con plata era la durabilidad, por lo que para llevar a cabo el estudio desarrollaron películas tipo “sandwich” de TiO₂(N)/Ag/TiO₂(N) en las que la plata se encontraba incrustada entre dos capas de TiO₂(N). Para llevar a cabo la síntesis del material se preparó TiO₂ puro o TiO₂(N) y Ag, mediante el uso de plasma se limpió el sustrato durante 10 minutos para eliminar partículas residuales en la superficie. El soporte del sustrato se giró a una velocidad de 5 rpm. La potencia se determinó de 250 W para el Ti⁺⁴ y de 20 W para la Ag, respectivamente. Para las películas de TiO₂(N), el gas contenía Ar⁰, O₂ y N₂ con flujos de 20, 5-2 y 8 sccm, respectivamente, mientras que para la película de Ag⁰, el gas utilizado contenía sólo Ar con un caudal de 20 sccm sin añadir otros gases, para formar una capa de Ag, TiO₂ y TiO₂(N), se utilizaron dos series de TiO₂(N) Ag/TiO₂(N) para preparar las películas. En la primera serie, la cantidad de Ag⁰ se reguló cambiando el tiempo de depositación de 30 s a 60, 90 y 120 s. En la segunda serie, la cantidad de Ag⁰ se fijó con el tiempo de depositación de 120 s y el contenido de nitrógeno en el TiO₂(N), las películas fueron modificadas reduciendo los caudales de oxígeno de 5 sccm a 4, 3 y luego 2 sccm. Las películas depositadas fueron calentadas a 500 °C por 1 h en atmósfera de nitrógeno mediante el uso de un horno de vacío convencional. Compararon entonces la efectividad de las películas delgadas de una sola capa con multicapas, en un ensayo antimicrobiano utilizando el método de chapado estándar o a partir de lecturas de densidad óptica a 595 nm, las muestras fueron colocadas en una habitación oscura o expuesto bajo la luz visible y a temperatura ambiente. La fuente de luz visible fue una lámpara incandescente (lámpara incandescente Classicstone, 60 W, Philips Taiwán; Taipei, Taiwán) y la densidad de iluminación se registró utilizando un medidor de luz (modelo LX-102; Lutron Electronic Enterprises, Taipei, Taiwán). En la reacción fotocatalítica, la distancia de iluminación entre la muestra y la lámpara fue de aproximadamente 10 cm, que estuvo expuesta durante 30 min y la intensidad de la luz en la superficie de la muestra fue de casi 1,2 × 10³ lux (lumen/m²)

(30 mW/cm²). Después de la iluminación, se recuperaron 100 µL de la solución bacteriana de la muestra. Finalmente, la concentración bacteriana se determinó utilizando métodos estándar de dilución y chapado y se calculó el porcentaje de bacterias sobrevivientes, esto frente a *S. pyogenes* (cepa M29588), *Acinetobacter baumannii* resistente al pandrug (cepa M36788) y *S. aureus* (cepa SA02). Para examinar los materiales, se centraron en características entre las que se encontraban las cantidades de plata y nitrógeno, a través de varios análisis incluyendo microscopía electrónica, EDS, DRX y espectroscopía de absorción ultravioleta visible y análisis de la tasa de degradación del azul de metileno. Además, investigaron las propiedades antibacterianas de los materiales compuestos, lo que reveló que la durabilidad antibacteriana de estas películas delgadas se mejora sustancialmente tras el tratamiento de multicapas, tanto en la luz oscura como visible, concluyendo que bacterias, como *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Acinetobacter baumannii*, podrían eliminarse eficientemente.

Estudios como el realizado por Vallejo *et al.*, (2016) y Ubonchonlakate *et al.*, (2012), han explorado la actividad antimicrobiana del TiO₂ como un material fotocatalítico apostando como alternativa la incorporación de impurezas durante la síntesis del material. Siendo una de las alternativas más utilizadas la incorporación de Ag (plata). Ambos autores realizaron estudios con la finalidad de medir la efectividad antimicrobiana de las películas de TiO₂ puro y modificado con plata, frente a bacterias causantes de enfermedades en el tracto respiratorio. El estudio realizado por Vallejo *et al.*, (2016), demostró en la realización del ensayo preliminar de la actividad antimicrobiana que la incorporación de la impureza de Ag⁰, aumento en 2.18 veces la eficiencia de desinfección del proceso frente a *Staphylococcus aureus* y los análisis del material por espectroscopia Raman mostraron que los agregados de plata depositados sobre las películas de TiO₂ podrían presentar el fenómeno de resonancia de plasmones superficiales localizada, lo que concuerda con investigaciones como la realizada por Castro *et al.*, (2011), en relación a que las partículas de plata se aglomeraban sobre la superficie de TiO₂ generando agregados del orden de los 200 nm. La metodología que permitió llegar a estas conclusiones describe el proceso de síntesis de películas delgadas de dióxido de titanio (TiO₂ Degussa P-25), por el método Doctor -Blade, utilizando para la incorporación de la impureza 0.025 g de AgNO₃ en 5 ml de agua desionizada, bajo fotorreducción química en irradiación UV. Durante el análisis antimicrobiano se inocularon

cepas SARM en 30 ml de caldo nutritivo estéril utilizando tubos Falcon, los cuales se mantuvieron en incubación y agitación durante más de 12 horas. Posteriormente se introdujo en cada tubo una película del material, por triplicado, los tubos Falcon se sometieron a irradiación UV durante 30 min con una lámpara de 360 nm de longitud de onda máxima, posteriormente los tubos se sometieron a incubación y agitación durante 12 horas y nuevamente se hizo la dilución y el conteo en placa. Por último, se hizo un conteo electrónico de las UFC encontradas en las placas.

Rodríguez, (2016), llevó a cabo la síntesis de nanoestructuras de dióxido de titanio dopadas con plata, utilizando el método sol-gel, asistido por microondas. Evaluó la concentración de plata en la muestra y el efecto de una mezcla de fases anatasa y rutilo, además evaluó la incorporación de microondas en el proceso. El material sintetizado fue caracterizado mediante TEM, fisisorción de N₂, Reflectancia difusa (UV-vis), XRD, espectroscopía Raman, y XPS. El ensayo antimicrobiano se realizó empleando una fuente de radiación solar, se determinó la carga óptima del catalizador y se realizaron pruebas biológicas empleando como medio de cultivo caldo lactosado y lauril sulfato, con base en la técnica del número más probable de acuerdo a la NOM-112-SSA1-1994. Para el experimento, se llevaron a cabo dos ensayos, el primero utilizando el material sintetizado solo y el segundo con el material bajo el efecto de las microondas, además se determinó la mejor concentración de Ag en el material, utilizando porcentajes en peso de 0.1%, 1% y 10%. En la determinación de la concentración de coliformes fecales, los resultados mostraron que el agua con una concentración inicial mayor a 2400 NMP, disminuye después de la fotocatalisis, arrojando concentraciones de coliformes fecales de 3 NMP; obteniendo mejores resultados para la muestra sintetizada por microondas. Se puede observar que los mejores resultados se obtienen empleando la muestra de Ag-TiO₂ al 1% en peso de plata. En una segunda serie de síntesis, que fue realizada para encontrar una concentración óptima de dióxido de titanio se evaluaron las muestras con una concentración de plata de 2, 5 y 7% en peso. Los resultados de las pruebas con caldo lactosado obtenidos en la segunda evaluación de la mejor concentración de plata, permite concluir que el decremento de la capacidad de desinfección de Ag-TiO₂ al aumentar la concentración de plata se puede deber a la reducción del área superficial del material. Es por esto que, a pesar de que la presencia de plata favorece el proceso de desinfección y por ello la muestra al 1% en peso de plata muestra valores

superiores que la muestra al 0.1% en peso, un excedente de plata en el material ocasiona una disminución en su capacidad fotocatalítica.

Yang *et al.*, (2017), prepararon un material híbrido fotocatalítico a partir de TiO₂-N/Ag a través de un proceso solvotérmico en etanol, en el cual la reducción de iones de Ag⁰ y el dopaje de TiO₂ con N en una solución de un complejo de nitrato de plata amoniacal se dieron al mismo tiempo, lo que permitió una distribución uniforme de las nanopartículas de Ag al combinarse de forma estable con la superficie del sustrato TiO₂-N. Este material se utilizó en la inactivación fotocatalítica bajo luz visible, de *Acinetobacter baumannii*. Para llevar a cabo la síntesis del material se disolvieron 10 ml de tetrabutil titanato en 30 ml de etanol absoluto, la solución se mantuvo en agitación a 25°C durante 30 minutos, posteriormente la solución precursora se transfirió a un autoclave, la cual contenía 170 ml de etanol absoluto. Luego, se calentó hasta el punto supercrítico de etanol (243 °C y 6,4 MPa) a una velocidad de 2°C/min, que se determinó como las condiciones óptimas para el proceso antibacteriano fotocatalítico. Después de ser tratado bajo esta condición supercrítica durante 70 minutos, el sistema se enfrió lentamente hasta temperatura ambiente. El precipitado fue centrifugado, lavado con agua destilada y etanol durante 3 veces, y se secó a 80 °C durante 24 h para obtener las muestras puras de TiO₂. Luego, se dispersó 0.5280 g de polvo TiO₂ en 50 ml de etanol durante 1 h para formar una suspensión. La cantidad deseada de AgNO₃ se disolvió en agua ultra-pura de 10 ml, después de añadir 0.8 ml de amoníaco acuoso para formar el complejo diaminado de plata. Después de añadir la solución con el complejo en la suspensión de TiO₂, se transfirió nuevamente a la autoclave bajo las mismas condiciones y se calentó a la condición supercrítica de nuevo. Después de ser tratado durante 70 minutos, se permitió que el sistema se enfriara lentamente a temperatura ambiente. El precipitado fue centrifugado, lavado con agua destilada y etanol 3 veces, y finalmente se secó a 80°C durante 24 h para obtener las muestras Ag/TiO₂-N. Para llevar a cabo una comparación se prepararon otras muestras de referencia de la siguiente manera: (1) TiO₂-N sin AgNO₃ como el proceso anterior, (2) se obtuvo una muestra de 4,0% Ag/TiO₂ sin amoníaco acuoso durante el proceso de reacción anterior, (3) 4,0% Ag/TiO₂-N(I) se obtuvo mediante el proceso solvotérmico supercrítico *in situ*, (4) 4.0%Ag/TiO₂-N(P) fue preparado por ruta de reducción de fotonica, (5) 4.0%Ag/TiO₂-N(S) fue preparado por la ruta solvotérmica y (6) 4.0%Pd/TiO₂-N fue preparado por el método solvotermal a condiciones supercríticas. El material fue

caracterizado por difracción de rayos X, microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía electrónica de barrido. Además, se obtuvieron las isotermas de adsorción a través de un análisis termogravimétrico y diferencial (TG-DTA), los espectros de reflectancia difusa a través de un análisis UV-vis y los espectros de luminiscencia, así como las concentraciones de iones metálicos. El estudio de la actividad antimicrobiana se realizó con *A. baumannii*, la cual fue cultivada en agar sangre a 37°C de 18 a 24 horas, utilizando un aproximado de 10⁸ CFU/mL, posteriormente las bacterias fueron centrifugadas y re-suspendidas en una solución salina de fosfato. Los catalizadores se añadieron a una solución de contenido bacteriano de 15 ml, la mezcla obtenida se agitó a 800 rpm, irradiadas bajo una lámpara de Xe a 300 W, con una distancia de 10 cm a 25 °C. La concentración de bacterias fue medida por conteo directo de placas. La solución bacteriana de 100 uL fue aspirada y diluida con una solución salina de fosfato, esterilizado, el conteo final fue de 10⁴ CFU/mL. Luego, 100 uL de mezcla diluidos se extendió en un medio de agar nutritivo, y se determinó el número de colonias, posterior a una incubación a 37 °C durante 18 a 24 h. Después de llevar a cabo el experimento antibacteriano durante 24 h, se encontró que ninguna bacteria podría sobrevivir en contacto con el catalizador 4.0% Ag/TiO₂-N, en comparación con la tasa de crecimiento del 7% de bacterias en TiO₂-N y 20% en nanopartículas Ag⁰. El material 4.0% Ag/TiO₂-N eliminó por completo la bacteria a través de células fragmentadas, y por lo tanto se hace mención que las células perdieron su capacidad para sintetizar ATP. Las nanopartículas TiO₂-N y Ag sólo fueron capaces de inducir la muerte celular en lugar de mineralizar la célula bacteriana y bloquear la síntesis de ATP. En comparación, la actividad bactericida de las nanopartículas de Ag y TiO₂-N bajo irradiación de luz UV se debió a la eficiencia intrínseca y la alta cosecha de luz, respectivamente. Además, el fotocatalizador Ag/TiO₂-N jugó un gran efecto bactericida para tipos de bacterias, lo que implica el futuro aplicable a la desinfección médica.

Esquivel *et al.*, (2018), llevaron a cabo la síntesis del material TiO₂/AgNO₃, con la finalidad de medir su eficiencia de desinfección frente a *Clostridium spp* ATCC (2877), *E. coli* (ATCC 5435) y *Salmonella ATCC* (2275), la síntesis del material se llevó a cabo utilizando la técnica sol-gel. Para las pruebas bactericidas se utilizó el método de micro dilución en placa NCCLS-CLSI N7 RA7, con el propósito de identificar la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida de las nanopartículas metálicas del compuesto. Los

ensayos microbiológicos se evaluaron con las siguientes cepas: *E. coli* (ATCC 5435) y *Salmonella* spp (ATCC 2275) y *Clostridium* spp (ATCC 2877). Una vez que se culminó con las evaluaciones a las distintas cepas control y se corroboró su pureza, utilizaron la técnica de vertido en placa o microdilución con tres repeticiones. Los ensayos se llevaron a cabo utilizando tres concentraciones de TiO₂/AgNO₃ (1, 5 y 10 %), para esto utilizaron un testigo, el cual estuvo integrado de la siguiente manera: agua estéril + patógeno + TiO₂/AgNO₃ con tres repeticiones. A su vez se efectuaron ensayos con irradiación ultravioleta donde se manejaron tres tiempos: 30 min, 45 min y 60 min con 3 repeticiones, debido a que en recientes trabajos (incluir referencia), se ha descrito que, a partir de 30 min de irradiación artificial ante el compósito, este comienza a manifestar sus propiedades de inhibición ante microorganismos patógenos. Con respecto a la caracterización del material se encontró que el tratamiento térmico favoreció al tamaño de partícula, la morfología presentó aglomerados del material, los cuales no presentan un tamaño de grano homogéneo. Respecto al estudio de la actividad antimicrobiana se encontró que el mejor resultado se obtuvo con los tratamientos a 5 y 10%, dado que se manifestó una inhibición de entre 5 y 7 logaritmos. Para la evaluación ante *Salmonella* ATCC (2275) la cuenta inicial de UFC fue de: 6.2×10^7 , en el tiempo cero se manifestó incluso una reproducción del agente patógeno, pero con el transcurso del tiempo los mejores resultados fueron los obtenidos por el tratamiento al 10%, debido a que la inhibición a los 60 minutos fue de hasta 6 logaritmos. La evaluación ante *Clostridium* spp ATCC (2877) partió de una cuenta inicial de UFC de: 6.1×10^7 , para las tres concentraciones en el tiempo cero, se manifestó una reproducción por parte de la bacteria alcanzando concentraciones de hasta 8 logaritmos, pero al llegar al minuto 45, con el uso de radiación UV (y sin el uso de ella), se manifestó un descenso de 3 logaritmos.

4.3. JUSTIFICACIÓN

La transmisión y propagación de enfermedades gastrointestinales por microorganismos entéricos, contenidos en las aguas residuales, se ha convertido en un problema a nivel mundial. Al día de hoy el cloro es la forma más conocida de desinfección química utilizada en el tratamiento de las aguas, sin embargo, presenta como desventajas, ser corrosivo y en

algunos casos generar subproductos posiblemente peligrosos para la salud, como los subproductos organoclorados y trihalometanos, que dan lugar a efectos adversos para la salud como; daño en las funciones reproductoras, en el desarrollo fetal dentro del útero, daño a órganos como hígado y riñones, e incluso desarrollo de cáncer, sobre todo en la vejiga urinaria, de colon y recto. Por lo que se ha despertado el interés en el estudio de nuevos procesos de desinfección, como la fotocatalisis heterogénea con materiales semiconductores, la cual es eficiente frente a una gran cantidad de agentes contaminantes.

5.4. HIPÓTESIS

La incorporación de la impureza de plata, en los nanotubos de TiO₂ obtenidos por el método de anodizado electroquímico, le conferirá mejores propiedades fotocatalíticas al material, aumentando su efectividad antimicrobiana bajo radiación UV frente a *E. coli* y *Salmonella typhi*.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antimicrobiana de los nanotubos de TiO₂ modificados con plata, frente a microorganismos como *Escherichia coli* y *Salmonella typhi*.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudiar el efecto de los parámetros de síntesis (voltaje, tiempo y %Wt Ag incorporado como impureza) en la técnica de anodizado que permitan la obtención de nanotubos de TiO₂ modificados con plata y obtener información de la estructura y morfología de los materiales mediante diferentes técnicas analíticas: difracción de rayos X y microscopía electrónica de barrido, con la finalidad de encontrar diferencias en sus propiedades.
- Estudiar la actividad antimicrobiana de los nanotubos de TiO₂-Ag con la finalidad de medir su efectividad en el proceso de desinfección de *Salmonella typhi* y *Escherichia coli*.

6. MARCO TEÓRICO

6.1 Aguas residuales y clasificación de sus fuentes

Por aguas residuales se refiere a aquellas aguas que por acción del hombre se le introducen materias contaminantes, que implican alteraciones perjudiciales de su calidad, con relación a sus usos posteriores o su función ecológica. Estas deben ser desechadas y tratadas, debido a la cantidad de sustancias dañinas y microorganismos que contienen, representando un peligro para el bienestar y la salud humana, así como para el medio ambiente (Díaz-Cuenca *et al.*, 2012).

Existen cuatro fuentes principales de aguas residuales:

- (1) Aguas domésticas o urbanas que proceden de actividades del aseo personal, cocina y limpieza de la casa, de los desechos sanitarios (heces y orina humanas), que suelen contener una gran cantidad de microorganismos y materia orgánica, así como restos de jabones, detergentes, lejía y grasas o aceites.
- (2) Aguas residuales industriales que proceden como su nombre lo indica de la actividad de las industrias y procesos realizados en fábricas, pueden contener aceites, detergentes, ácidos y grasas, antibióticos y subproductos de origen químico, mineral, vegetal o animal, dependiendo de la actividad industrial de su origen.
- (3) Escorrentías de aguas de uso agrícola que proceden de las labores agrícolas en zonas rurales, estas pueden arrastrar fertilizantes y pesticidas contribuyendo a la eutrofización de los cuerpos de agua,
- (4) Aguas pluviales de origen atmosférico ya sea en forma de lluvia, nieve o hielo, además se les consideran aguas blancas cuando proceden del riego y limpieza de calles parques y lugares públicos. Se considera que en zonas urbanizadas las aguas pluviales pueden tener efectos contaminantes significativos y en caso de ser abundantes, pueden ser evacuadas por separado, para no saturar los sistemas de depuración (Espigares *et al.*, 2012).

6.2 Contaminantes de las aguas residuales

Los contaminantes de las aguas residuales normalmente son una mezcla de compuestos orgánicos e inorgánicos y no suele ser práctico obtener una caracterización completa de estas, por lo que se evalúan de acuerdo a un uso y función determinados.

En función de su calidad y características los contaminantes del agua se clasifican en físicos, químicos y biológicos. Los contaminantes químicos comprenden tanto compuestos orgánicos como inorgánicos, la contaminación por compuestos orgánicos se ve reflejada en una disminución del oxígeno disuelto, ya que es utilizado en el proceso de degradación de estos compuestos. Por otro lado, la contaminación por compuestos inorgánicos es preocupante debido a su posible efecto tóxico.

Algunos de los contaminantes físicos incluyen contaminación térmica, cambios en el color del agua, un aumento en la turbidez originada por la descarga de aguas que contengan sólidos en suspensión, contaminación por detergentes (espumas) y radiactividad.

Mientras que los contaminantes biológicos son los responsables de la transmisión y/o propagación de enfermedades, difundiendo agentes infecciosos, en su mayoría procedentes de las excretas, por lo que se convierten en un problema de interés sanitario (Ramalho, 1996).

6.3 Calidad del agua residual

Las aguas residuales se encuentran contaminadas por microorganismos entéricos provenientes de la materia fecal contenida en las aguas domésticas o urbanas, en general un agua que se considere apta para la realización de actividades humanas debe encontrarse exenta de la presencia de microorganismos entéricos y parasitarios de origen intestinal. Ya que estos transmiten enfermedades tales como la salmonelosis (*Salmonella*), shigelosis (*Shigella*), cólera (*Vibrio Cholerae*), amebiasis (*Entamoeba histolytica*), alteraciones gastrointestinales (*Aeromonas mesófitas*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter*); giardiasis (*Giardia lamblia*), criptosporidiosis (*Cryptosporidium*), esquistosomiasis (*Schistosoma*), desórdenes hepáticos (virus de hepatitis), entre otros (Lin *et al.*, 2014).

El riesgo de presencia de microorganismos patógenos incrementa en zonas con alta densidad poblacional o sin disponibilidad de agua potable. Puesto que un agua contaminada es causal de enfermedades, se ha visto la necesidad de controlar la calidad microbiológica en aguas de diferentes orígenes. Sin embargo, resulta difícil llevar a cabo un control de la totalidad de microorganismos presentes debido a su gran variedad, que incluye tanto células eucariotas (algas, protozoos, hongos) como células procariotas (bacterias) y virus que se consideran microorganismos con una capacidad de síntesis nula, por lo que se apuesta por la

determinación de organismos indicadores de contaminación por materia fecal o cuantificación de coliformes (Ramalho, 1996; Raffo y Ruiz, 2014).

Tabla1. Contaminantes biológicos.

| | | |
|------------|-----------|---|
| Biológicos | Hongos | <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Candida albicans</i> . |
| | Helmintos | <i>Ascaris lumbricoides</i> , <i>Fasciola hepatica</i> , <i>Taenia saginata</i> , <i>Trichuris trichura</i> . |
| | Bacterias | <i>Salmonella typhi</i> , <i>Leptospira</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Yersinia</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Shigella</i> . |
| | Virus | Adenovirus, rotavirus |

6.4 Bacterias

Una bacteria es un organismo procariota unicelular que no posee un núcleo bien definido, ni orgánulos con membrana en el citoplasma, pueden variar en forma y tamaño, entre 0.5 y 5 µm, algunas de ellas poseen flagelos para su desplazamiento, por lo tanto, son organismos móviles.

De acuerdo a su forma las bacterias se clasifican en tres tipos fundamentales: cocos (esferas), bacilos (varilla), vibrios y espirilos (helicoidal).

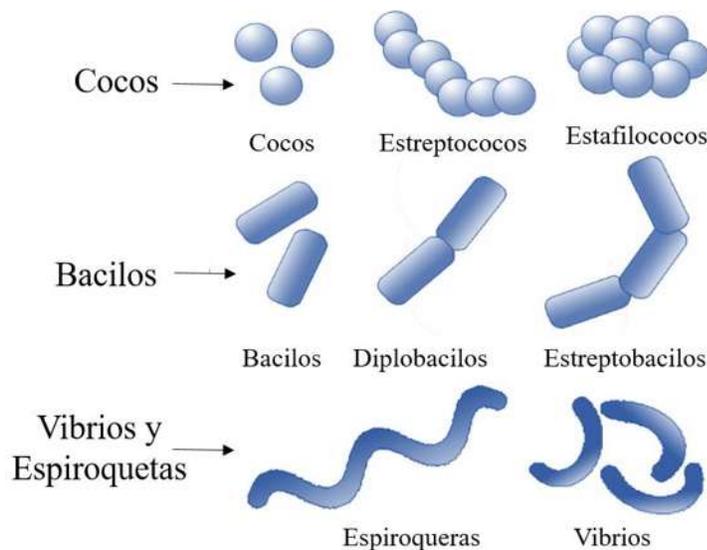


Figura 1. Clasificación de las bacterias según su forma.

Nota. Adaptada de (*Tipos de bacterias* - Imagui, s. f.)

Los procariontes patógenos representan una pequeña porción de las bacterias, estos pueden producir exotoxinas o endotoxinas, que se encuentran asociadas a la composición de la pared celular, cabe señalar que de acuerdo a la técnica de tinción Gram, las bacterias se diferencian de acuerdo a su respuesta de tinción en: bacterias Gram positivas (tiñen a color morado-azulado) y Gram negativas (tiñen en color rojo) (Apella y Araujo, 2011).

6.4.1 Bacterias indicadoras de contaminación

Los microorganismos indicadores de contaminación deben cumplir con ciertos requisitos; deben ser fáciles de aislar y crecer en condiciones de laboratorio, ser relativamente inocuos para el hombre y animales, así como encontrarse presentes en el agua, en relación cuali y cuantitativa con otros organismos patógenos de aislamiento más difícil.

Tres tipos de bacterias califican para tal fin, desde el punto de vista bacteriológico del agua;

- Coliformes fecales: indican contaminación fecal.

- Bacterias aerobias mesófilas: determinan la efectividad del tratamiento de aguas.
- Pseudomonas: señalan deterioro en la calidad del agua o una recontaminación (Raffo y Ruiz, 2014).

6.4.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo, anaerobio o facultativo de la familia *Enterobacteriaceae*, tribu *Escherichia*, que coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento, se le considera un microorganismo de la flora normal (Rodríguez-Ángeles, 2002), sin embargo, existen cepas enteropatógenas como agente causal de diarrea humana (Lopardo, 2017), con base a su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico, las cepas de *E. coli* causantes de diarrea se clasifican en seis grupos.

Tabla 2. Clasificación de las cepas de *E. coli* causantes de cuadros de enfermedad gastrointestinal.

| Nombre | | Características | Fuente de infección |
|-------------|------------------|--|--|
| ETEC | Enterotoxigénica | Coloniza la mucosa del intestino delgado por medio de pilis o fimbrias de distintas formas, llamadas antígenos del factor de colonización (CFA por sus siglas en inglés), siendo su principal mecanismo de patogenicidad la síntesis de enterotoxinas llamadas toxina termolábil (LT) y/o toxina termoestable (ST). Son importantes en lactantes, principalmente en niños menores de 2 años, en niños de edad escolar y adultos puede ser asintomática y poco frecuente. | Contaminación fecal de agua y alimentos, siendo la dosis infectiva: 108 UFC (unidades formadoras de colonias). |

| | | | |
|--|---|---|--|
| | | Tiene un periodo de incubación de 14 a 50 horas, su cuadro agudo se caracteriza por producir diarrea aguda, generalmente sin sangre, sin moco, sin pus y en pocos casos se presentan fiebre y vómito (Rodríguez-Ángeles, 2002). | |
| EHEC , VTEC o STEC | Entero hemorrágica: productoras de toxina de Vero o toxina semejante a Shiga. | Produce brotes caracterizados por dolor abdominal, diarrea acuosa con sangre y poco o nada de fiebre, se le conoce como colitis hemorrágica, su principal mecanismo de patogenicidad es la citotoxina STX, su síntesis está relacionada con la presencia del bacteriófago STX, que está insertado en el genoma. La STX actúa a nivel de síntesis de proteínas ya que se une a la subunidad 60S de los ribosomas de las células intestinales o renales del hospedero. Además de esta toxina, las EHEC tienen otros mecanismos de patogenicidad como el fenómeno de adherencia y esfacelación (A/E), el gen cromosomal <i>eae</i> llamada intimina, cuya expresión es | Ingestión de carne cruda o mal cocida. |

| | | | |
|-------------|----------------|---|--|
| | | regulada por genes plasmídicos y el plásmido pO157, que codifica para la entero hemolisina (Rodríguez-Ángeles, 2002). | |
| EIEC | Enteroinvasiva | Se encuentra relacionada genéticamente con <i>Shigella</i> spp., ya que son descarboxilasa negativas, no móviles y lactosa negativa. Su mecanismo de patogenicidad es la invasión del epitelio del colon, los síntomas característicos son diarreas acuosas con sangre y moco, pero algunos casos sólo presentan diarrea, ésta en ocasiones es indistinguible de la que produce ETEC (Rodríguez-Ángeles, 2002). | La transmisión puede ser de persona a persona por ingestión de alimentos y agua contaminada. |
| EPEC | Enteropatógena | El primer grupo que se identificó serológicamente, su principal factor de patogenicidad es la adhesión, el proceso de adherencia (A/E), que esta mediada por pilis o fimbrias rizadas que se llaman Bfp (bundle-forming pilus). | Transmisión fecal-oral por manos contaminadas de manipuladores de alimentos. |

| | | | |
|-------------|------------------|--|--|
| | | <p>Pueden ocasionar brotes o casos aislados de diarrea, afecta principalmente a niños menores de seis meses y a los de dos años, puede aislarse en adultos enfermos y sanos, principalmente cuando hay un factor predisponente como diabetes. El cuadro clínico se manifiesta con diarrea aguda, la cual puede ser leve o grave, con vómito, fiebre baja y mala absorción (Rodríguez-Ángeles, 2002).</p> | |
| EAEC | Enteroagregativa | <p>Se han sugerido tres características principales en su patogénesis; adherencia a la mucosa intestinal, elaboración de enterotoxinas y citotoxinas e inducción de la inflamación de la mucosa intestinal (Lopardo, 2017). Estas tienen la capacidad de incrementar en la mucosa la producción y secreción de moco que atrapa a las bacterias que se autoaglutinan en una fina película en el epitelio intestinal. Su periodo de incubación es de 8 hora y puede durar de 18 a 20 días, puede causar brotes o</p> | <p>Alimentos contaminados (Lopardo, 2017).</p> |

| | | | |
|-------------|-------------------|--|---|
| | | casos aislados de diarrea persistente. En niños puede manifestarse con diarrea líquida, de color verde, con moco, sin sangre, y que en ocasiones puede llegar a ser severa y requerir rehidratación intravenosa. Algunas veces el cuadro clínico se presenta como diarrea con moco con o sin sangre, vómito y sin o con poca fiebre (Rodríguez-Ángeles, 2002). | |
| DAEC | Adherencia difusa | Se sabe poco de su mecanismo de patogenicidad, pero se ha caracterizado una fimbria de superficie, conocida como F1845, involucrada en el fenómeno de adherencia difusa. Los principales síntomas que se presentan son diarrea acuosa sin sangre y sin leucocitos (Rodríguez-Ángeles, 2002). | *No se encuentra suficientemente estudiado (Lopardo, 2017). |

El aislamiento, identificación y caracterización de cepas de *E. coli*, puede llevarse a cabo a través de métodos *in vitro*, *in vivo* o biología molecular. El método tradicional es el aislamiento a través de una toma de materia fecal, para su sembrado en una placa de Mac Conkey u otro medio selectivo, con asa redonda de nicromel, sembrando por estría cruzada e incubación a 37 °C durante 18- 24 horas y posteriormente se seleccionan de 5 a 10 colonias

típicas de *E. coli* lactosa positivas para la realización del análisis o estudio deseado (Rodríguez-Ángeles, 2002).

6.4.3 *Salmonella typhi*

Salmonella typhi es uno de los dos serotipos tifoideos restringidos para el ser humano, de la subespecie entérica del género *Salmonella*, esta bacteria causa gastroenteritis aguda, fiebre entérica o fiebre tifoidea (Kantele *et al.*, 2012). La salmonelosis es de distribución cosmopolita y constituye un importante problema de salud, se adquiere a través de comida o agua contaminada con heces u orina de personas infectadas, las moscas también son un reservorio mecánico de este microorganismo patógeno (Brito *et al.*, 2010). Tiene un periodo de incubación de 7 a 14 días, el cuadro clínico se caracteriza por fiebre alta, malestar general, anorexia, mialgia, cefalea, dolor abdominal y diarrea, al realizar actividad física se puede presentar bradicardia hepatoesplenomegalia, distensión abdominal y exantema maculopapular o roséola (Gavilan *et al.*, 2020).

6.5 Desinfección

La desinfección es un proceso que consiste en la destrucción selectiva de los organismos que causan enfermedades, en el cual no todos los organismos se destruyen durante el proceso, lo que lo diferencia de la esterilización que conduce a la destrucción de la totalidad de los organismos (Metzalf y Eddy, 1995).

6.5.1 Clasificación de los agentes antimicrobianos

Los agentes antimicrobianos pueden clasificarse de acuerdo a su estructura química, su origen, el rango de especies susceptibles y su mecanismo de acción (Ullah y Ali, 2017). En aguas residuales los métodos más empleados para llevar a cabo el proceso de desinfección, se dividen en agentes químicos, agentes físicos, medios mecánicos y radiación (Metzalf y Eddy, 1995).

Los agentes químicos más corrientes son los productos químicos oxidantes, de los cuales el cloro es el más utilizado, además se utilizan compuestos del cloro, el bromo, el yodo, el ozono (a pesar de que no deja una concentración residual que permita valorar su presencia

después del tratamiento), el fenol y los compuestos fenólicos, los alcoholes, los metales pesados y compuestos afines, como los colorantes, los jabones, los compuestos amoniacales cuaternarios, el agua oxigenada, ácidos y álcalis diversos. El agua muy ácida o muy alcalina también se ha empleado en la destrucción de las bacterias patógenas, ya que el agua con pH inferior a 3 y superior a 11 es relativamente tóxica para la mayoría de las bacterias (Metzalf y Eddy, 1995).

Mientras que, los agentes físicos que se pueden emplear son la luz y el calor, el calor suele utilizarse en las industrias lácticas y de bebidas, pero su aplicación en las aguas residuales no es factible debido a que supondría un alto coste. En cambio, la luz solar es un buen desinfectante, sobre todo la radiación ultravioleta. En la esterilización de pequeñas cantidades de agua, el empleo de lámparas especiales ha resultado exitoso, sin embargo, su eficacia depende de la penetración de los rayos en el agua, por lo que la penetración de la radiación ultravioleta en el agua como método desinfectante no resulta sencillo en sistemas acuosos, por la presencia de materia particulada (Metzalf y Eddy, 1995).

Las bacterias también pueden ser eliminadas durante el tratamiento de aguas residuales empleando medios mecánicos como la sedimentación química, filtros percoladores, fangos activados, cloración del agua residual tratada, tamices de malla gruesa y fina, desarenadores y sedimentación primaria, estos últimos cuatro, se consideran procesos físicos (Metzalf y Eddy, 1995) y su principal objetivo es eliminar o disminuir la presencia de materia particulada, sin embargo intervienen en la desinfección debido a que las bacterias forman parte del material en suspensión.

Con respecto a la radiación, los principales tipos son la radiación electromagnética, la acústica y la radiación de partículas. Los rayos gamma se emiten a partir de elementos radioisótopos, como el cobalto 60. Dado su poder de penetración, los rayos gamma se han utilizado tanto para la desinfección y esterilización de agua potable y agua residual (Metzalf y Eddy, 1995).

Por sus orígenes los agentes antimicrobianos pueden clasificarse en naturales, semisintéticos y sintéticos. Los naturales provienen principalmente de los hongos y suelen presentar alta toxicidad, los semisintéticos provienen de fuentes naturales alteradas químicamente y los

sintéticos se diseñan buscando una mayor efectividad y menor toxicidad, siendo el tipo de agentes más prometedor (Ullah y Ali, 2017).

Además, los agentes microbianos pueden ser de amplio espectro, espectro intermedio o amplio espectro de acuerdo al rango de especies susceptibles a estos agentes, dentro de los agentes de amplio espectro encontramos aquellos que son efectivos frente a organismos Gram negativos y Gram positivos, caso contrario los agentes de espectro estrecho tienen una función limitada y son utilizados contra especies particulares de microorganismos. Dentro de esta clasificación además se ubican como; antiparasitarios, antifúngicos, antibacteriales y antivirulentos, de acuerdo al tipo de microorganismo que combaten (Ullah y Ali, 2017).

6.5.2 Mecanismos de acción

La efectividad de los desinfectantes se basa en cuatro mecanismos principales: daño a la pared celular, alteración en la permeabilidad de las células, alteración de la naturaleza coloidal del protoplasma e inhibición de la actividad enzimática (Metzalf y Eddy, 1995), los cuales corresponden a los principales procesos responsables del crecimiento bacteriano (Ullah y Ali, 2017).

- Inhibidores de la pared celular:

A diferencia de las células de humanos y animales, las células bacterianas poseen pared celular, que es una estructura crítica para su supervivencia y se caracteriza por la presencia de una cadena principal de polisacáridos, llamada peptidoglicano. Los agentes antimicrobianos pueden tener una actividad selectiva inhibiendo la capa de peptidoglicano de la pared celular bacteriana. Entre los antimicrobianos que inhiben la síntesis bacteriana de la pared celular se encuentran los β -lactamas, los derivados de la penicilina (Ullah y Ali, 2017), las cefalosporinas, los monobactámicos y los carbapenémicos, los cuales inhiben las enzimas encargadas de la síntesis del peptidoglicano (Newton, 1965).

Debido a la diferencia entre la pared celular de las bacterias Gram positivas y Gram negativas, la susceptibilidad de las bacterias Gram positivas es mayor, ya que estos agentes antimicrobianos no alcanzan la pared celular de las bacterias Gram negativas, porque se

encuentra protegida por la membrana exterior (Kohanski *et al.*, 2010).

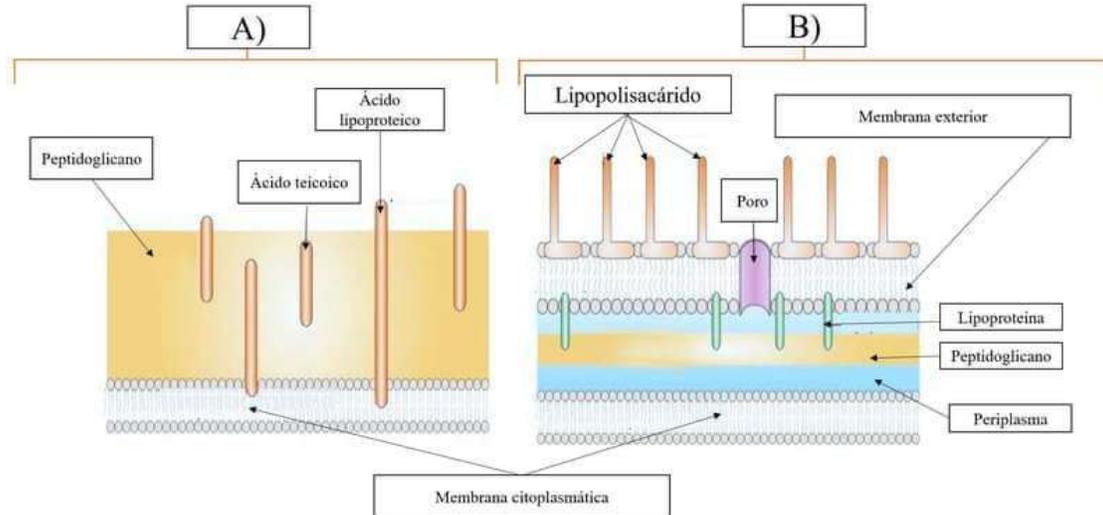


Figura 2. Pared celular de bacterias A) Gram positivas y B) Gram negativas.

Nota: Adaptada de (*LIBRO-PEDIA Ciencias Naturales - Elbibliote.com*, s. f.)

- Inhibidores de la función de la membrana:

La membrana citoplasmática funciona como una barrera selectiva, que regula el flujo intra y extra celular de sustancias, es decir controla la composición interna de la célula. Un daño a la membrana citoplasmática podría significar una fuga de iones y macromoléculas necesarias para la supervivencia de la célula. La membrana citoplasmática se encuentra en células eucariotas y procariotas, por lo que la acción de los inhibidores de la función de la membrana puede ser poco selectiva, además puede ser tóxica para humanos y animales. Por lo que es necesaria una selectividad de los inhibidores, dirigida a la membrana celular bacteriana (Ullah y Ali, 2017).

- Inhibidores de la síntesis de proteínas:

Debido a que las enzimas y las estructuras celulares están constituidas principalmente de proteínas, la síntesis de proteínas es una de las funciones más importantes en las células. Los inhibidores de la síntesis proteica actúan alterando las etapas de síntesis de las proteínas, afectando principalmente a los ribosomas, lo que interrumpe el metabolismo celular óptimo de las bacterias y conduce a la muerte del organismo o la inhibición de su crecimiento y

multiplicación (Ullah y Ali, 2017). Este tipo de agentes, son los más utilizados y se dividen en dos subclases, los inhibidores 50S y 30, que corresponden a las dos subunidades de ribonucleoproteínas que componen al ribosoma (Kohanski *et al.*, 2010).

- Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos:

La inhibición de la síntesis de los ácidos nucleicos (ADN y ARN), es uno de los agentes más importantes para los antimicrobianos, por su importancia en la reproducción bacteriana. Dadas las diferencias enzimáticas entre el ADN y el ARN en células eucariotas y procariotas, los agentes antimicrobianos pueden lograr una alta selectividad (Kohanski *et al.*, 2010). Los antibacterianos de esta clase se pueden subdividir en inhibidores de ADN e inhibidores de ARN. Los inhibidores de ARN interfieren en el proceso de transcripción, donde se producen los transcritos de ARNm (ARN mensajero), de material genético para su transformación en proteínas, esto impide la transcripción de genes, afectando la función normal de las bacterias y provocando muerte celular. Con respecto al ADN, los agentes antimicrobianos actúan de forma similar atacando las etapas de iniciación, alargamiento y/o terminación. Los principales agentes inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos son las quinolonas, nitrofurantoina, metronidazol y rifampina (Ullah y Ali, 2017; Calvo y Martínez-Martínez, 2008).

6.5.3 Agentes antimicrobianos inorgánicos

El uso de agentes antibacterianos inorgánicos se encuentra en expansión, tras la búsqueda de una posible solución a las patologías asociadas a microorganismos, aspecto en el cual la nanotecnología presenta una amplia gama de nuevas posibilidades, a través de técnicas que permiten la síntesis de nuevos materiales con actividad antimicrobiana. Los materiales inorgánicos incluyen los metales y los óxidos metálicos, los cuales han sido los más reportados en la literatura por las ventajas que presentan ante las otras familias debido a su estabilidad y bioseguridad (Betancur *et al.*, 2016).

Dentro de estos materiales, las nanopartículas antibacterianas inorgánicas tales como la plata, el óxido de zinc, el dióxido de titanio y las de cobre han atraído una atención especial debido a su alta estabilidad al estar en contacto con sistemas biológicos (Betancur *et al.*, 2016).

6.6 Nanopartículas de plata

La plata es uno de los agentes antimicrobianos más estudiados (Betancur *et al.*, 2016), pertenece al grupo de agentes antimicrobianos sintéticos, capaces de eliminar microorganismos o inhibir su crecimiento (Sotiriou y Pratsinis, 2013). Su uso como agente antimicrobiano se debe principalmente a sus propiedades como agente antimicrobiano de amplio espectro, siendo activa contra las bacterias Gram positivas y Gram negativas y a sus mecanismos de acción, que pueden resumirse en dos mecanismos principales; el primero es la liberación de iones metálicos tóxicos y el segundo la liberación de especies oxidantes. Las nanopartículas de plata actúan directamente sobre la membrana bacteriana, alterando sus propiedades y causando muerte celular, tanto los cationes de Ag⁺, como las especies oxidantes (ROS) provocan daños al ADN, las proteínas y las enzimas (Lin *et al.*, 2014).

Dicho lo anterior el primer mecanismo se explicaría por la liberación gradual de iones de plata que inhiben la producción de adenosin trifosfato (ATP) y la replicación del ADN, mientras que el segundo mecanismo, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), generan estrés oxidativo y posterior, la muerte celular (Betancur *et al.*, 2016).

6.7 Dióxido de titanio (TiO₂)

El óxido de titanio (IV) o TiO₂ es un óxido metálico, que presenta una alta superficie específica y características mesoporosas prometedoras, no es tóxico, es resistente a la corrosión y estable en soluciones acuosas, además abunda en la naturaleza y posee un bajo costo (Vallejo *et al.*, 2016), se origina en un proceso de reacción del titanio en presencia de oxígeno, que puede ser reproducido y optimizado a través de la técnica de anodizado del titanio (Bravo, 2014). El dióxido de titanio es uno de los semiconductores más estudiados, este se encuentra naturalmente en las formas anatasa, rutilo y brookita, la diferencia entre estas depende de las características de su estructura cristalina. La anatasa y el rutilo son de estructura tetragonal, y son más abundantes en la naturaleza, mientras que la brookita es de estructura ortorómbica y es mucho más escasa (Vallejo *et al.*, 2016; Bravo, 2014). La actividad antimicrobiana del TiO₂ depende de características como la estructura cristalina, la morfológica y el tamaño. Se ha observado que, frente a bacterias y hongos, da resultados

favorables cuando se encuentra en forma anatasa y con tamaño nanométrico (Dizaj *et al.*, 2014).

La arquitectura autoorganizada de las matrices de los nanotubos de dióxido de titanio permite el diseño y el control de las características geométricas, para obtener un material con características específicas de adsorción y propagación de la luz, la geometría de la matriz de los nanotubos, parece ser la arquitectura ideal para los procesos de fotoelectrólisis del agua (Grimes y Mor, 2009).

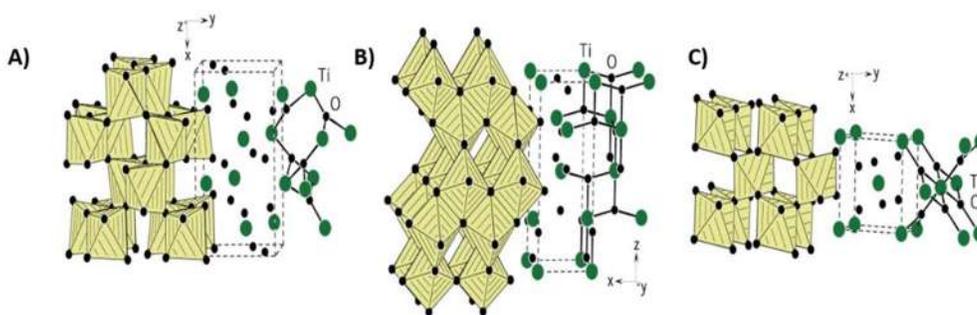


Figura 3. Estructuras cristalinas del TiO₂: (A) Brookita, (B) Anatasa, (C) Rutilo.

(*Crystal structures of TiO₂ (a) anatase (tetragonal), (b) . . . , s. f.*)

Como principal mecanismo de acción antimicrobiana de las nanopartículas de TiO₂, se ha propuesto la vía de estrés oxidativo mediante la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), el cual causa daños específicos en el ADN. Cabe señalar que las propiedades fotocatalíticas de las nanopartículas de titanio mejoran su eficacia antimicrobiana frente a los microorganismos, ya que estas producen una mayor cantidad de ROS cuando se irradian bajo luz ultravioleta (UV) (Allahverdiyev *et al.*, 2011).

6.8 Métodos de síntesis de Nanotubos de TiO₂

Existen numerosos métodos para obtener una variedad de estructuras geométricas de TiO₂, que abarcan una gran variedad de procesos con los cuales, las geometrías que se pueden lograr son de la más amplia variedad, como lo son (Borja-Borja y Rojas-Obviedo, 2020):

- Método Sol-Gel: este método sigue un esquema que se basa en la homogenización de los reactivos, solventes o aditivos que intervengan en el proceso. Todo a

temperatura ambiente, bajo agitación magnética para evitar aglomeración en alguna parte del recipiente.

- Método sólido: Utilizado en el área dedicada al estudio de reacciones de síntesis en paralelo ya que las reacciones se pueden controlar en tiempo real usando técnicas convencionales.
- Método hidrotérmico: que se utiliza para mejorar la regularidad y uniformidad de la mesoestructura de los nanomateriales.
- Método solvotérmico: Es un proceso simple utilizado en la producción de materiales con estructura monocristalina.
- Método de oxidación directa: Se considera poco práctica debido a que los productos de la reacción suelen formar una capa refractaria sólida lo que provoca la separación de los reactantes y detiene la síntesis, generalmente se utiliza en la producción de cuerpos cerámicos.
- Método de depositación química de vapor (CVD): Útil en la producción de nanomateriales a base de carbono con una elevada cristalinidad y pureza.
- Método de depositación física de vapor (PVD): Suele utilizarse en la depositación de capas de carbono y de vapor en metales con capas duras.
- Electrodepositación: Nos permite fabricar matrices de nano-hilos con alineación 1D con tamaño uniforme. Presenta como desventaja que los nano-hilos sintetizados son comúnmente amorfos o policristalinos y porosos, limitando la posibilidad de nuevos estudios sobre microestructuras, propiedades y aplicaciones. Estos métodos se basan en la síntesis de nanopartículas con elevada área superficial, pureza y cristalinidad, además de una alta capacidad específica.
- Tratamiento de microondas: Se utiliza en la síntesis de materiales, absorción selectiva, oxidaciones/reducciones, procesos de polimerización entre otros, uno de sus inconvenientes son las altas temperaturas de operación.
- Síntesis verde: Formación de nanoestructuras metálicas a partir del uso de bacterias, hongos, plantas o sus extractos.

Sin embargo, de todos los procesos disponibles para su elaboración, los nanotubos obtenidos a través de la anodización del titanio en un electrolito a base de flúor presentan los mejores resultados (Grimes y Mor, 2009).

La ruta de síntesis electroquímica, destaca por su simpleza, su costo y sus resultados tan favorables, durante este proceso se anodiza una placa de titanio a voltaje controlado, en un electrolito compuesto de cantidades controladas de agua y una fuente de fluoruros, a diferencia de otro tipo de rutas como la ruta hidrotermal, no se produce un arreglo desordenado de los nanotubos (Bravo, 2014).

Es importante mencionar que el TiO₂ solamente es fotoactivo bajo radiación ultravioleta ($\lambda < 380$ nm), lo que sumado a la poca eficiencia que el proceso suele presentar, por la rápida recombinación del par electrón-hueco fotogenerado, representan un inconveniente que limita la aplicación práctica de la tecnología basada en este material. Por lo que se suele modificar su superficie con metales de transición (incluidos plata, platino, rutenio y paladio), lo que disminuye el proceso de recombinación al formar heteroestructuras y nuevas interfaces que mejoran la eficiencia fotocatalítica (Vallejo *et al.*, 2016).

6.9 Anodización

La oxidación anódica o anodización es el proceso en el cual dos placas de metales, son puestas en contacto a través de una solución electrolítica o electrolito y expuestas a un régimen de voltajes un tiempo determinado (Bravo, 2014). Lo que nos permite crear una capa de óxido que protege al material anodizado (Grimes y Mor, 2009), el cual funciona como ánodo en el circuito, dándole el nombre al proceso.

Este proceso es similar al proceso de oxidación natural de hierro en presencia de oxígeno atmosférico o agua. La capa protectora, que los materiales adquieren durante este proceso le confiere mayor resistencia a la corrosión y la abrasión, su ductilidad, e incluso, la posibilidad de ser coloreado. El proceso de anodizado es una reacción de óxido-reducción (reacción de transferencia de electrones), que con un voltaje adecuado suministrado en el sistema produce una pérdida de electrones en el ánodo (Bravo, 2014). Los resultados del proceso de anodizado dependen en gran medida de la composición del electrolito, si el electrolito contiene elementos muy electronegativos (F-, Cl-, Br y demás halógenos), los cationes metálicos son

disueltos y expulsados en el electrolito, lo que significa que el metal es corroído o pulido por estos elementos (Bravo, 2014).

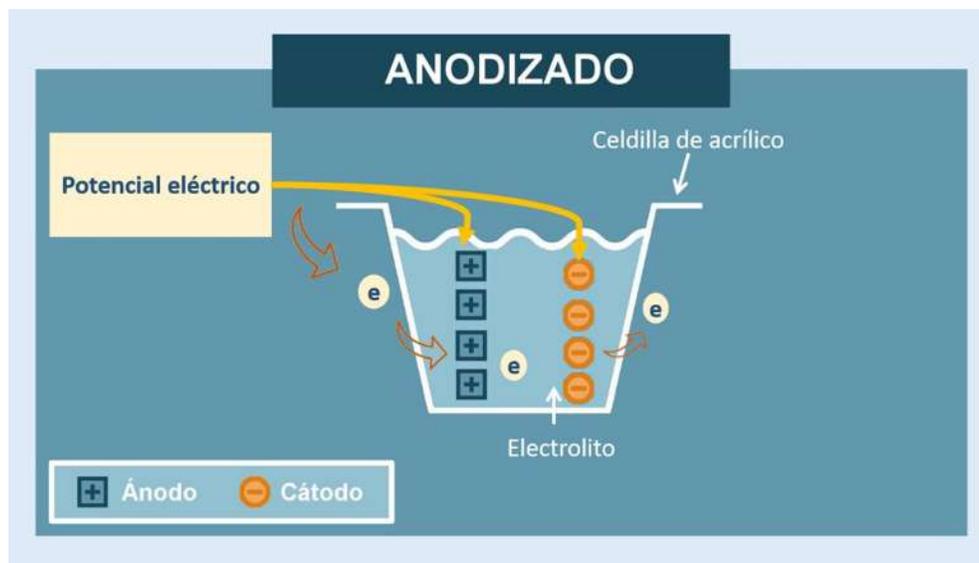


Figura 4. Proceso de anodizado.

En cambio, si el electrolito contiene cantidades considerables de oxígeno y los cationes se enlazan con el oxígeno o el hidroxilo (OH^-) presente en el electrolito, se forma una capa superficial de óxido metálico en la superficie del ánodo, que es compacta o monolítica, y crece hasta un espesor límite dependiente del voltaje suministrado al sistema, ya que los óxidos son malos conductores eléctricos. A medida que aumenta el ancho de la capa de óxido, disminuye la corriente dentro de ésta y la capa de óxido actúa como barrera eléctrica impidiendo la migración.

Y finalmente, cuando el electrolito contiene ambos elementos, se generará una capa de óxido que será disuelta selectivamente. La adición de oxígenos y elementos más electronegativos que éste (como el flúor, el cloro, el bromo) en el electrolito, genera una capa de óxido en el metal anodizado, que es disuelta por estos elementos señalados. En este caso, el electrolito es capaz de disolver la capa de óxido, pero no totalmente. Lo que, bajo condiciones controladas de anodizado, representa la disolución ordenada de la capa de óxido por el electrolito, lo que permite moldear la capa de óxido para formar diferentes estructuras geométricas, como poros o nanotubos (Bravo, 2014).

6.9.1 Nanotubos de TiO₂ por anodizado

La optimización del proceso de anodizado del dióxido de titanio ha permitido la obtención de estructuras de muy alto orden y un estudio profundo de las variables que las crean (Bravo, 2014).

De todas las variables a tomar en cuenta, se considera que la más importante es la composición del electrolito, ya que las cantidades de oxígeno aportadas por el agua y un aportador de fluoruros crean las condiciones para la formación de tubos, cabe mencionar que el fluoruro es el encargado de disolver ordenadamente el TiO₂ durante este proceso, logrando estructuras de muy alto orden, convirtiéndose en un componente estándar del proceso, además es importante valorar el pH del electrólito, el voltaje, la temperatura, el tiempo de anodización y número de anodizaciones, para una morfología final específica (Grimes y Mor, 2009).

Las medidas de largo, diámetro interno, diámetro externo y ancho de la pared, dependen de las variables mencionadas anteriormente, el largo de las nanoestructuras obtenidas depende de la duración de la anodización, la concentración de fluoruros, el voltaje, la conductividad del electrolito, la temperatura. El diámetro interno y externo, dependen mayormente del voltaje, pero también se ven afectados por el contenido de agua y el contenido de fluoruros. Con respecto al ancho de la pared, se podría decir que en gran medida es dependiente de las variables mencionadas con anterioridad, pero se ha encontrado que la temperatura influye especialmente en este parámetro, debido a que afecta de forma directa la viscosidad del electrolito y su capacidad para disolver, obteniendo paredes más anchas a menores temperaturas (Grimes y Mor, 2009).

6.9.2 Parámetros de control en la morfología final del arreglo de nanotubos de TiO₂.

6.9.2.1 Tipo de electrolito

Como se ha mencionado con anterioridad el tipo de electrolito es fundamental en muchas de las propiedades finales de los nanotubos, se compone de una cierta cantidad de agua que porta oxígenos y fluoruros, los electrolitos definen tanto el pH de la solución y las velocidades en que se producen las reacciones químicas (Bravo, 2014).

Dependiendo del electrolito utilizado se mencionan cuatro generaciones de nanotubos, el equipo de Grimes, realizó las primeras síntesis en soluciones de agua y cantidades variables de ácido fluorhídrico, que llevaron a nanotubos cortos llamados de primera generación, estos nanotubos estaban limitados a un largo final de 0,5 [μm] debido al ambiente ácido que provee el electrolito y tienen un ordenamiento mayormente aleatorio dado por una muy fuerte disolución del óxido (Grimes y Mor, 2009).

La segunda generación abarca procesos en los cuales se utilizaron soluciones acuosas y un proveedor de fluoruros como el fluoruro de amonio (NH_4F), el fluoruro sódico (NaF), el fluoruro de cesio (CsF) o el fluoruro potásico (KF), donde se lograron nanotubos más largos de hasta 5 [μm] y una mayor organización de estos, mejorando su aspecto, debido a un ambiente menos ácido logrando un mayor largo de la capa de óxido. Para esta generación el agua cumple una función doble, aporta el oxígeno necesario para la oxidación y acelera la velocidad de las reacciones, siendo un aspecto clave en su disolución (Grimes y Mor, 2009).

Una tercera generación se abrió paso al cambiar la solución acuosa por una solución orgánica, por lo que se utilizan electrolitos como el Etilenglicol (EG) ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$), el dimetilsulfóxido o DMSO (CH_3SOCH_3), la formamida (CH_3NO), acompañadas de cantidades variables pero controladas de agua como aportador de oxígenos, y una fuente de fluoruros. Las variaciones en las cantidades específicas de agua y fluoruros, permiten obtener una disolución controlada en todo el proceso y afinar el crecimiento hasta 1 mm de largo. Sin embargo, el tiempo de anodización se vio modificado con el uso de este electrolito, alargándose por horas e incluso días (Bravo, 2014; Grimes y Mor, 2009).

La cuarta generación aplica la técnica de doble anodización de Fukuda de la alúmina porosa en el titanio, con ella se logra crear una geometría altamente ordenada de nanotubos, ya que se hace crecer una capa de nanotubos sobre una placa anteriormente anodizada, que contiene un “molde” para los nanotubos y permite que estos se organicen fácilmente. Esta técnica permite la aplicación de una variada combinación de posibles electrolitos, el cual es fundamental en definir el pH de la solución, en donde en ambientes más ácidos el óxido sufrirá una mayor disolución (Bravo, 2014; Grimes y Mor, 2009).

6.9.2.2 Cantidad de agua

La cantidad de agua en el electrolito afecta la velocidad de crecimiento de los tubos y la velocidad de la disolución, interviene oxidando el titanio y acelera la disolución de la capa de óxido acelerando la velocidad de la reacción, ya que los complejos formados son solubles en agua.

La cantidad de agua se relaciona con el voltaje, definiendo un diámetro final para los tubos, una gran cantidad de agua limitará el diámetro de estos y un contenido menor a 20% de volumen permite diámetros grandes a potenciales también altos, a propósito de esto una de las razones del límite de la segunda generación fue la gran cantidad de agua presente en el electrolito (Bravo, 2014; Grimes y Mor, 2009).

6.9.2.3 Cantidad de fluoruro

La cantidad de fluoruros es fundamental en la disolución de la capa de óxido formada, si la concentración de estos es mínima no será capaz de disolver el óxido, y un máximo lo disolverá completamente. Es importante señalar que, dentro de este rango, una cantidad mayor de fluoruros tendrá que ser acompañada de un voltaje mayor que permita la movilidad de los fluoruros en el óxido, por esto también existe una relación entre el largo final de los tubos, la cantidad de fluoruros y el voltaje que es proporcionado al sistema (Grimes y Mor, 2009).

6.9.2.4 pH

El pH tiene una relación importante con la conductividad del electrolito, representa el desbalance de cargas que existe en una solución neutra sin presencia de un campo eléctrico que las disocie y afecta la disolución del óxido. Las primeras anodizaciones lograban únicamente 0,5 µm de largo, porque el ambiente ácido favorecía demasiado la disolución y no permitía un gran crecimiento, a esto, la solución fue hacer electrolitos más neutros que permitieron un crecimiento mayor, de tal modo que la velocidad de disolución se ve aumentada a pH más ácidos y disminuida a pH más básicos (Grimes y Mor, 2009; Dubed, 2017).

6.9.2.5 Voltaje

El voltaje de anodización determina la fuerza del campo eléctrico entre el electrolito, el óxido y la capa metálica, afecta la migración de iones que permite el crecimiento controlado de los tubos, además define la movilidad de los fluoruros en la disolución, el largo final de los tubos y en alguna medida afecta el ancho de la pared de los tubos (que también depende de la profundidad del tubo), pero la medida más afectada por el voltaje es el diámetro de los tubos, afectando de manera distinta el diámetro interno y el externo (Bravo, 2014; Dubed, 2017).

Al controlar los tiempos de voltaje, se ha logrado crear incluso pequeñas cadenas conectadas o nanolazos, un voltaje mayor crea secciones en forma de tubo de algunos nanómetros, y un voltaje menor creará un “gorro” que tapara la sección recién creada, parecida a la estructura interna de una rama de bambú (Bravo, 2014).

6.9.2.6 Tiempo

Es necesario determinar un tiempo óptimo de anodizado para un grupo de condiciones específicas para el proceso, ya que este tiempo permite extender al máximo el largo del arreglo de nanotubos. En las primeras dos generaciones de anodización, las características se hacen demasiado agresivas para permitir el crecimiento más allá de unas pocas micras y terminan condicionadas a un largo final independiente del tiempo de anodizado. En electrolitos de primera y segunda generación el tiempo de anodizado es alargado entre 30 minutos a un par de horas, lo que permite que la estructura se modifique adquiriendo el grado de orden necesario para obtener un arreglo relativamente homogéneo (Grimes y Mor, 2009). En comparación, en los electrolitos de tipo orgánico, el proceso de crecimiento es mucho más lento, el tiempo de anodización se ve aumentado desde varias horas e incluso varios días, afinando el crecimiento hasta 1 mm. El problema de este tipo de anodizaciones es que la disolución se ve aumentada en algunas áreas, por lo general las capas superiores, creando secciones de “nanograss” encima de los tubos, lo que da lugar a una capa porosa remanente sobre el arreglo de tubos (Bravo, 2014; Allahverdiyev *et al.*, 2011).

6.9.2.7 Temperatura

La variación en la temperatura de anodizado produce un cambio en la viscosidad del electrolito, que define cambios en la disolución, electrolitos más viscosos, disminuyen la disolución del óxido y permiten un mayor crecimiento en el ancho de la pared sin variar su diámetro, razón por la cual la mayoría de las anodizaciones se realizan a temperatura ambiente (Bravo, 2014).

6.9.2.8 Temperatura de calcinación

Los nanotubos sintetizados por anodización electroquímica son amorfos, no presentan una estructura cristalina, por lo que, son comúnmente calcinados ya que muchas de sus aplicaciones dependen de su eficiencia fotoeléctrica, la cual se ve incrementada con la cristalización de la estructura de los tubos, sin embargo, solo es posible calcinar el TiO₂ sintetizado, hasta un punto en específico, ya que a mayor temperatura se terminará por fundir la geometría tubular, se recomienda una calcinación a 400°C para obtener una cristalización completa, de la estructura amorfa a Anatasa, esto sin perder la geometría tubular, lo que permite ocupar el TiO₂ en aplicaciones fotoeléctricas con alrededor del 5% de eficiencia (Bravo, 2014).

6.9.2.9 Otros

El envejecimiento del electrolito, cuando es utilizado en una serie de anodizaciones y su conductividad, poseen una relación directa con el largo final obtenido de los nanotubos, al utilizarlo más de una vez, incrementa la conductividad del electrolito y permite un mayor crecimiento de los tubos, sin embargo algunos electrolitos higroscópicos permiten la adsorción de humedad del ambiente y por lo tanto un aumento en la cantidad de agua disponible en el electrolito y una concentración mayor de agua actúa como un inhibidor del crecimiento (Concha *et al.*, 2010).

De igual manera se ha estudiado el efecto de la agitación del electrolito, tanto en agitación magnética como en agitación ultrasónica, como el flujo laminar producido por la agitación mejora el orden de las estructuras formadas, se muestra una mayor homogeneidad,

especialmente en la parte superior de los tubos, que les confiere una mayor capacidad fotoeléctrica (Bravo, 2014).

6.10 Incorporación de impurezas y semiconductores tipo n

El TiO₂ estequiométrico es prácticamente un aislante (posee un ancho de banda de 3.2 eV), sin embargo, por razones termodinámicas, su estructura es deficiente en oxígenos, lo cual origina estados localizados cerca de la banda de conducción dándole características de semiconductor. Los semiconductores pueden clasificarse en; semiconductores intrínsecos (es idealmente un cristal perfecto, en estos se da lugar a la “generación del par electrón-hueco) y extrínsecos (son formados por la introducción al cristal de dopantes), que se dividen a su vez en semiconductores extrínsecos tipo n y p.

El dopado es un proceso que nos permite introducir impurezas (átomos de otro elemento químico), en la estructura del nanotubo de forma controlada y predeterminada, durante el proceso de la síntesis, para alterar sus propiedades. Puede ser un dopado bajo o alto de acuerdo al número de átomos que se agregan en el proceso (Wang *et al.*, 2008), cabe mencionar que la sustitución de algunos átomos del sólido con impurezas introduce niveles localizados cuya energía cae dentro del gap, modificando sus propiedades, así como aumenta la densidad de electrones en la banda de conducción.

En los conductores tipo n, como el TiO₂, los portadores de carga son mayoritariamente electrones, los dopantes, deficientes de electrones con respecto al material base, generan niveles localizados de energía, estos átomos pueden químicamente reducirse, tomando electrones de la banda de valencia y aumentando la densidad de huecos en la misma. En un semiconductor tipo n con todas las impurezas ionizadas, la concentración de electrones en la banda de conducción es aproximadamente igual a la concentración de huecos disminuye con respecto a un semiconductor intrínseco.

Los posibles usos del semiconductor están definidos por el espectro de absorción, en los materiales más eficientes para fotocatalisis el coeficiente de absorptividad molar varia abruptamente cuando cambia la longitud de onda y por ende su energía, los semiconductores útiles para fotocatalisis poseen una banda prohibida de energía comparable a la de los fotones de luz visible, o, respecto a luz ultravioleta; $E_g < 3,5$ eV.

La absorción de fotones de energía por encima de E_g (fotoexcitación), promueve electrones de la banda de valencia a la banda de conducción y por cada electrón promovido se produce un hueco en la banda de valencia, los pares fotogenerados son portadores libres con cargas opuestas que, en ausencia de un campo eléctrico, recombinan rápidamente, liberando el exceso de energía en forma de calor y en algunos casos, con emisión de fotones (recombinación radiativa). La recombinación puede ser parcialmente suprimida mediante un campo eléctrico que separa espacialmente los electrones y los huecos, o en presencia de trampas o de aceptores de electrones o de huecos en la superficie del material. Los portadores de carga atrapados en estados superficiales pueden sobrevivir tiempos suficientemente largos como para reaccionar con el agua u otras sustancias cercanas a la superficie del semiconductor. Sobre esta base se sustentan procesos de uso práctico como la fotoquímica y la fotocatalisis heterogéneas (Wang *et al.*, 2008).

6.11 Fotocatalisis heterogénea

La fotocatalisis heterogénea ha despertado gran interés en los últimos años, debido a sus aplicaciones en procesos de remediación ambiental, se le considera una de las nuevas Tecnologías Avanzadas de Oxidación (TAO), esta técnica sustituye la activación térmica por una activación fotónica lo que la diferencia de la catálisis convencional (Herman, 1999), se basa en la irradiación de suspensiones de óxidos semiconductores, por lo general el dióxido de titanio en presencia de la especie contaminante de interés en degradar.

La fotocatalisis heterogénea se define como la aceleración de una fotorreacción mediante la presencia de un catalizador, el cual, al ser activado por la absorción de la luz, acelera el proceso e interacciona con la sustancia contaminante a través de un estado excitado o bien mediante la aparición de pares de electrón-hueco. Los electrones excitados son transferidos hacia la especie reducible, a medida que el catalizador acepta electrones de la especie oxidable que ocuparán los huecos ($e^- - h^+$); de esta manera, el flujo neto de los electrones será nulo y el catalizador permanecerá inalterado, generando reacciones de óxido-reducción que provocan la degradación y la mineralización de la sustancia tratada (Guarín y Mera, 2011).

Debido a la gran variedad de contaminantes que pueden ser eliminados mediante este tipo de tratamientos y la posibilidad de utilizar radiación solar hacen de la fotocatalisis heterogénea una técnica de gran potencial para un futuro sostenible.

6.12 Breve discusión sobre las ventajas y desventajas generales del proyecto

Entre los materiales semiconductores existentes, el dióxido de titanio es el más utilizado como fotocatalizador debido a sus diversas ventajas, tales como: estabilidad a temperatura ambiente, nula toxicidad, amigable con el medio ambiente y bajo costo de operación, además de contar con los niveles de energía de banda apropiados para separar la molécula del agua en oxígeno e hidrógeno, característica que no poseen muchos materiales semiconductores. Sin embargo, este material cuenta con algunas desventajas: absorción de luz limitado al espectro UV y recombinación electrónica superficial. Para resolver este inconveniente se han explorado el modificar la superficie del TiO₂ con metales de transición como lo son el cobre y la plata, lo que disminuye el proceso de recombinación al formar heteroestructuras y nuevas interfases que mejoran la eficiencia fotocatalítica, además de explorar técnicas de síntesis como: hidrotermales, sol-gel y anodizado electroquímico, los cuales han sido ampliamente utilizados para la formación de nanoestructuras de dióxido de titanio (Vallejo, 2016)

Como principal mecanismo de acción antimicrobiana de las nanopartículas de TiO₂, se ha propuesto la vía de estrés oxidativo mediante la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), el cual causa daños específicos en el ADN. Cabe señalar que las propiedades fotocatalíticas de las nanopartículas de titanio mejoran su eficacia antimicrobiana frente a los microorganismos, ya que estas producen una mayor cantidad de ROS cuando se irradian bajo luz ultravioleta (UV). Sin embargo, el uso de nanopartículas de TiO₂ bajo luz ultravioleta, puede implicar daño genético sobre las células y tejidos humanos, lo que podría resultar en un inconveniente, a pesar de que dicha toxicidad se considera mínima (Allahverdiyev *et al.*, 2011).

En cuanto a la utilización de plata, es importante considerar que el coste de obtención de las nanopartículas de plata puede ser alto en relación a su vida útil, en referencia a los tiempos de acción antimicrobiana, además de los problemas ambientales causados por la liberación de cationes y radicales de oxígeno (ROS). Por otra parte, se ha demostrado recientemente,

que la exposición repetida de bacterias a nanopartículas de plata puede inducir a un rápido desarrollo de resistencia a la actividad antimicrobiana (Panáček *et al.*, 2018). Aunque algunos autores mencionan que la lixiviación de plata en solución es insignificante, debido a que los depósitos de plata superficial presentan una alta estabilidad (Brugnera *et al.*, 2014).

Una de las ventajas de producir nanotubos de TiO₂ por el método de anodizado electroquímico es que éstos han sido inmovilizados o se encuentran relativamente fijos en la superficie del titanio durante su preparación, por lo que es poco probable que el anodizado sufra algún daño, ya que esta capa forma parte del metal base utilizado. Como resultado, estas capas de nanotubos tienen muchas posibles aplicaciones específicas gracias a las propiedades de superficie adquiridas como una elevada dureza y resistencia a la abrasión (Escamilla, 2012).

El anodizado electroquímico se ha convertido en uno de los favoritos, considerándolo superior a otros procesos de síntesis de nanoestructuras, la arquitectura autoorganizada de las matrices de los nanotubos de dióxido de titanio facilita el diseño y el control de las características geométricas, esto debido a que el proceso permite optimizar las dimensiones del nanotubo (diámetro, grosor de pared y longitud) según sea requerido, por tanto, el desarrollo de la nanoestructura superficial puede realizarse en muestras tridimensionales (Aguilera, 2018), con una mayor área superficial en relación a otros métodos de síntesis (Abdullah y Kamarudin, 2017) y características específicas de adsorción y propagación de la luz (Grimes y Mor, 2009), el anodizado no es afectado por la luz solar y a pesar de poseer una gran resistencia a la luz UV, todos los recubrimientos orgánicos pueden eventualmente fallar por la exposición a los rayos ultravioletas (Paredes, 2010), de cualquier modo el anodizado electroquímico parece ser la técnica de síntesis ideal para los procesos de fotoelectrólisis del agua.

7. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

7.1 Síntesis de las probetas

7.1.1 Depositación física de vapor (PVD) y anodizado electroquímico

La depositación se llevó a cabo sobre placas con dimensiones de 50x10x1mm, una vez cortadas las placas en la tornamesa Struers, modelo labosystem (figura 5), se sometieron a un desbaste con lijas y posteriormente un pulido a espejo con pasta diamante de 3 μ m.



Figura 5. Tornamesa Struers modelo labosystem.

Previo al depósito las placas se sometieron a limpieza bajo el equipo de ultrasonido Elmasonic X-tra (figura 6) en solución con isopropanol durante 15 minutos. El depósito de Ti se realizó mediante la técnica de arco catódico utilizando un equipo PVD marca DOMINO mini OERLIKON (figura 7). El equipo cuenta con una cámara de vacío, en la cual se deposita el sustrato, sobre un sistema planetario con rotación de tres ejes (figura 8), con cátodo de moneda de titanio de 99.5% de pureza (PLANSEE).



Figura 6. Equipo de ultrasonido X-tra.

Figura 7. A) DOMINO mini OERLIKON. B) Cámara de vacío.

El depósito dentro de la cámara de vacío se llevó a cabo a 8×10^{-5} mbar, con la finalidad de eliminar el oxígeno remanente, las muestras fueron precalentadas a 300 °C que facilita una etapa de limpieza con iones Ar. Posteriormente la cámara se mantiene a 500 °C durante 1.5 horas a 130 A y 700 Ah (amperios-hora) y se concluye con una etapa de enfriamiento de la cámara de depósito.



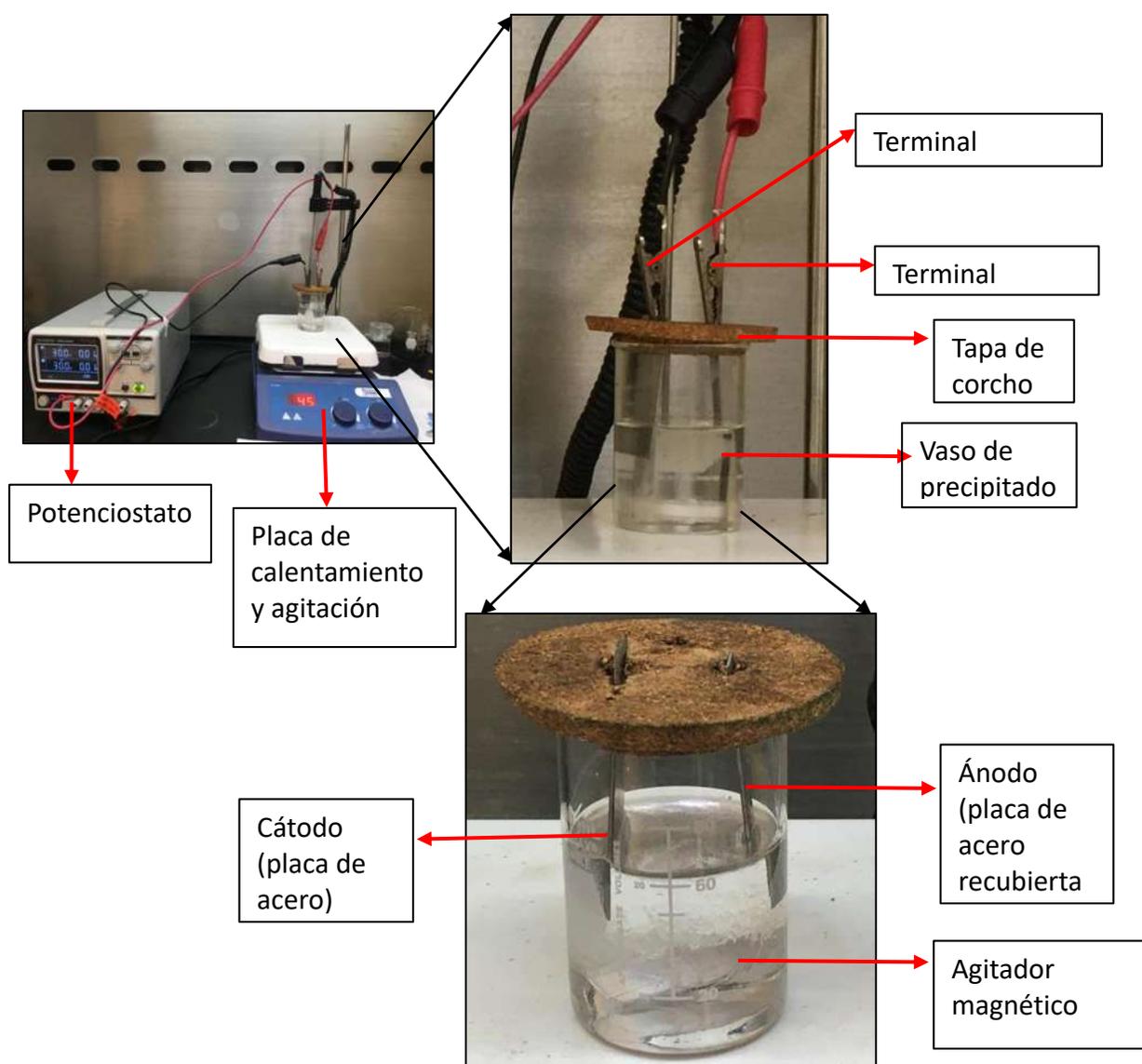
Figura 8. Sistema planetario con rotación de tres ejes.

7.1.2 Anodización electroquímica

La síntesis del material se llevó a cabo por oxidación anódica (anodizado) bajo los parámetros recomendados por Aguirre, 2021 con una variación en la preparación del electrolito. Se requiere la preparación de un electrólito de tercera generación a base de una solución de etilenglicol (EG) (C₂H₆O₂) 98%, agua (H₂O) 2% vol y Fluoruro de amonio (NH₄F) 0.3 % Wt. En primer lugar, se disolvió el fluoruro de amonio en agua hasta lograr una solución homogénea, posteriormente se agregó el etilenglicol y se mantuvo en agitación (120 rpm) hasta que la solución electrolítica se torna transparente y uniforme.

Durante la síntesis se utilizó un potencióstato marca Bio-Logic, que permitió aplicar una corriente directa con electrodos de acero inoxidable al sustrato ya recubierto de Ti (50x10 x1 mm), una parrilla eléctrica para mantener la temperatura y agitación constante y un vaso de

precipitados que se utilizó como reactor (100 ml), en el cual se llevó a cabo el crecimiento de los nanotubos sobre el sustrato. En el mismo vaso se preparó el electrolito, una vez listo, se introducen de forma vertical en el vaso dos placas de metal, las cuales corresponden al cátodo (acero inoxidable) y el ánodo (la placa de sustrato recubierta con Ti), con una separación de 3.5 cm entre ellas y conectadas a una fuente CD, a corriente constante, y un arreglo en serie. Se estudió el efecto del tiempo y la intensidad de corriente y una vez encontrados los parámetros más adecuados, estos fueron utilizados en la síntesis por anodizado de las probetas recubiertas de Ti a utilizar durante el ensayo antimicrobiano.



Para encontrar los parámetros óptimos de síntesis, se realizaron anodizaciones variando los parámetros intensidad de corriente y tiempo los cuales se muestran en la tabla 2, que incluye las condiciones experimentales de crecimiento con las cuales se obtuvo el crecimiento de la película de TiO₂ sobre las probetas recubiertas y por medio de las caracterizaciones (resultados) se definieron las mejores condiciones de síntesis.

Tabla 3. Parámetros variables de anodizado.

| Voltaje | Intensidad de corriente (A) | Tiempo (min) |
|----------------|--|-----------------------------|
| 60 V | 0.04 | 60, 120 |
| | 0.02 | 10, 20, 30, 40, 50, 60, 120 |

7.1.3 Electrodeposición de Ag

Para realizar los depósitos de los materiales de TiO₂-Ag se empleó la técnica de doble pulso de potencial, en base a lo reportado por Ortiz, 2013, lo cual permite un buen control sobre los parámetros morfológicos de las nanopartículas depositadas, tales como tamaño y distribución. Para llevarlo a cabo se requiere conocer el potencial de nucleación al cual se forman las nanopartículas (E_1) sobre la superficie deseada y el potencial al cual se llevará a cabo el crecimiento de los núcleos (potencial de crecimiento, E_2). Para esto se debe realizar una voltamperometría cíclica (VC) que nos permite conocer estos potenciales.

El sistema para llevar a cabo la voltamperometría y la electrodeposición, se utilizó un arreglo convencional de tres electrodos, tomando como electrodo de trabajo las probetas de acero recubiertas de TiO₂, un electrodo de referencia de platino y un alambre de platino de contra-electrodo, en una disolución acuosa de nitrato de plata 0.5 %Wt (AgNO₃).

Posteriormente, se efectuó una voltamperometría cíclica comenzando en sentido de reducción a partir del potencial a circuito abierto (E_{ocp}) a una velocidad de barrido de 25 mV/s (figura 10). A partir de la voltamperometría obtenida para el sistema TiO₂-Ag, se asignó el pico de reducción de los iones Ag⁺ en -0.35 V, además se analizó la respuesta

voltamperométrica realizada para la disolución acuosa que contiene el electrolito soporte (0.5 %Wt AgNO₃) bajo el arreglo experimental de 3 electrodos y bajo las condiciones experimentales recomendadas por Ortiz, 2013, con un tiempo de 70 sg, que se reportan en la

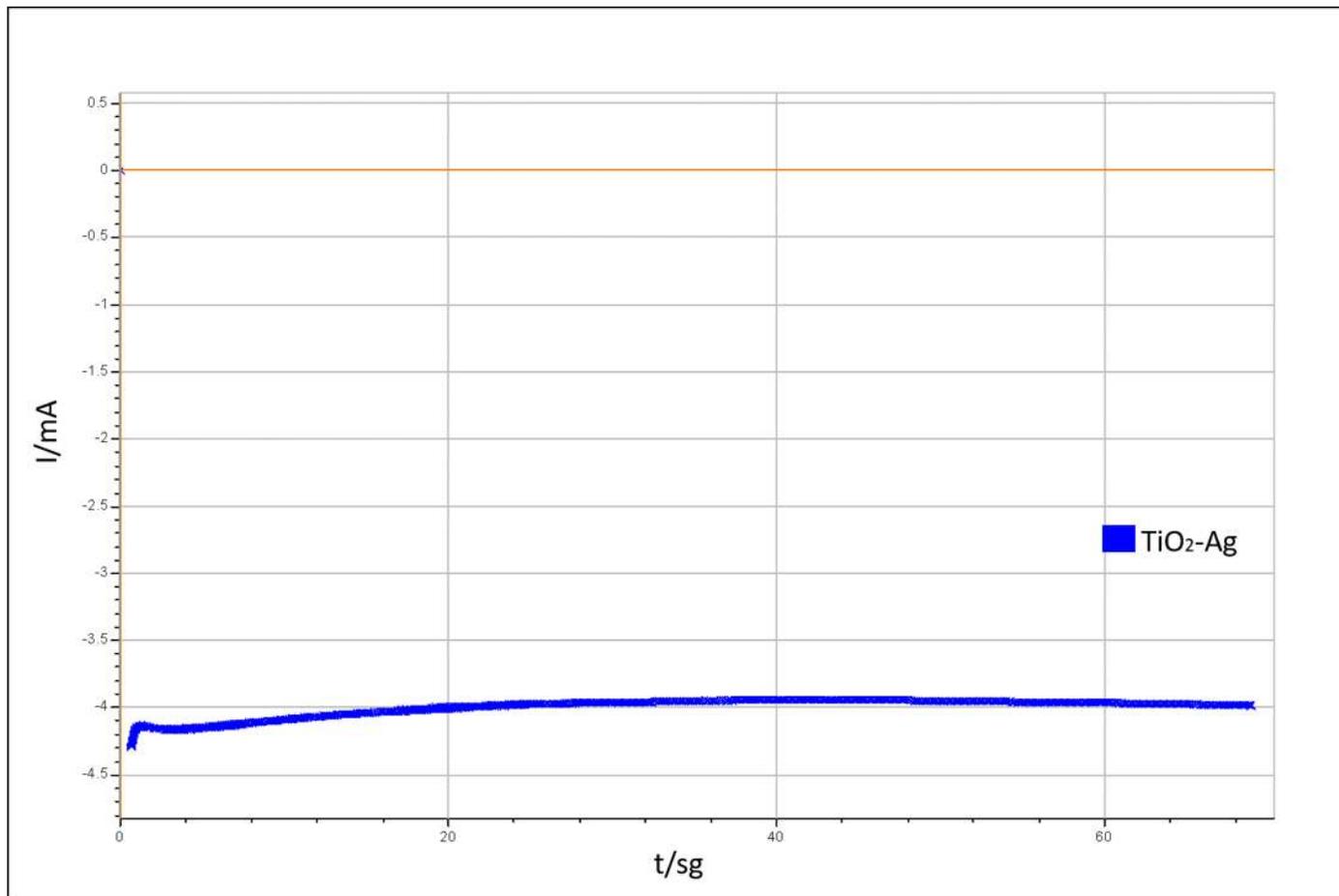


tabla 3.

Tabla 4. Parámetros utilizados en el electrodeposito de Ag.

| Electrodo de trabajo | Electrodo de referencia | Contra-electrodo | Circuito | Velocidad de barrido | PICO DE REDUCCIÓN de los iones Ag ⁺ | Pico de oxidación de Ag ⁰ | E ₁ | E ₂ |
|----------------------|-------------------------|------------------|----------|----------------------|--|--------------------------------------|----------------|----------------|
| | | | | | | | | |

| | | | | | | | | |
|---|---------|--------------------|---------|---------|---------|-----------|-------|--------|
| Probetas de acero, recubrimiento anodizado TiO ₂ | Platino | Alambre de platino | Abierto | 25 mV/s | -0.35 V | + 0.265 V | -0.40 | -0.26V |
|---|---------|--------------------|---------|---------|---------|-----------|-------|--------|

7.1.4 Tratamiento térmico

Una vez sintetizadas, las películas se someten a enjuagues continuos con acetona y etanol y finalmente un tratamiento térmico en un horno tubular (figura 12) a 500 °C durante 2 horas, bajo condiciones estándar, atmósfera de aire en laboratorio y rampa de calentamiento de 10°C/min, para eliminar residuos y favorecer la formación de la fase anatasa, sin afectar las nanoestructuras resultantes.



Figura 11. Horno de tubo para tratamiento térmico.

Una vez terminado el proceso, se preparan para el análisis de sus características microestructurales (presentadas en los resultados).

7.1.5 Caracterización del material

7.1.5.1 Difracción de rayos X

La difracción de rayos X es una de las técnicas más utilizadas para el estudio de estructuras cristalinas y espaciados atómicos, esta técnica se basa en la difracción de las ondas electromagnéticas incidentes por planos sucesivos de átomos en un cristal. Los rayos X, producen una radiación incidente sobre la muestra en el orden de los Armstrongs, que se generan por un tubo de rayos catódicos, y posteriormente se filtran para producir radiación monocromática, se concentran y se dirigen hacia la muestra, posteriormente los rayos X son difractados con ángulos que dependen de las distancias interatómicas, la dispersión de los planos será intensa únicamente si los rayos difractados por cada plano del material llegan al detector, por lo que existe una relación entre la longitud de onda de rayos X (λ), la separación entre dos planos consecutivos o espaciado reticular (d) y el ángulo de incidencia (θ) (Ley de Bragg) (Faraldos y Goberna, 2021).

$$n\lambda = 2d \sin \theta$$

La obtención de las distancias interplanares de la red cristalina, determina un valor que es característico para cada tipo de compuesto, lo que permite identificarlos y así obtener información sobre la estructura cristalina, a través de los patrones de difracción. Además, si se comparan las distancias interplanares con patrones de referencia estándar, es posible identificar la mezcla y/o los compuestos que hay en una muestra (Faraldos y Goberna, 2021).

Para obtener los patrones de difracción de las estructuras, las muestras se analizaron por difracción de rayos X, utilizando el difractómetro philips X'pert MPD con radiación de CuK α ($\lambda=1.54060$) y se realizaron mediciones de 2θ entre 10 y 80° , con un tamaño de paso de 0.5° y tiempo de paso de 0.05 s.

7.1.5.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

En este trabajo se realizó un estudio por microscopía electrónica de barrido (SEM), usando un microscopio JEOL-JSM-5300 acoplado con un detector de electrones secundarios, con resolución nominal de 5 nm, que permitió obtener un barrido de las muestras y observar por medio de las micrografías la estructura obtenida, así como los componentes presentes por un análisis EDS.

En la microscopía electrónica de barrido o SEM, se utiliza el principio de la microscopía óptica en la que se sustituye el haz de luz por un haz de electrones, el microscopio electrónico de barrido se encuentra equipado con un emisor de electrones, una columna y diferentes lentes electromagnéticas. Durante el proceso el emisor genera un haz de electrones incidentes, con una aceleración entre 200 V y 30 keV, el cual viaja a través de la columna, pasa a través de las diferentes lentes electromagnéticas y con ayuda de un sistema de deflexión se manipula el haz de electrones para poder llevar a cabo un barrido superficial de la muestra (Faraldos y Goberna, 2021).

Esta interacción con la superficie del material genera señales (electrones secundarios, electrones retro-dispersados, rayos x, entre otras) que son capturadas por los detectores, permitiéndonos obtener información morfológica y de composición química superficial de la muestra (Faraldos y Goberna, 2021).

En un análisis SEM las muestras son gruesas y los electrones incidentes serán dispersados (scattering) más de una vez, de la interacción entre los electrones incidentes con los átomos que componen la muestra se generan señales, las cuales pueden ser captadas con detectores específicos para cada una de ellas. El detector capta una señal y las convierte en una señal electrónica que es proyectada en una pantalla (CRT), el barrido del haz esta sincronizado con el barrido del CRT y produce una relación uno a uno entre puntos de la muestra y puntos en el CRT (Faraldos y Goberna, 2021).

El mecanismo por el cual la imagen es magnificada es simple, la zona barrida por el haz de electrones sobre las muestras es menor que la región que se muestra en la pantalla. La

magnificación lineal está dada por la relación entre la longitud barrida sobre la muestra, y la longitud del barrido sobre el tubo de rayos catódicos.

La interacción haz incidente-muestra produce una variedad de señales, las cuales brindan distinta información sobre la superficie de la muestra, que son captadas por sus correspondientes detectores, con respecto a la naturaleza de la interacción, los electrones secundarios son emitidos desde la muestra como consecuencia de las ionizaciones surgidas de las interacciones inelásticas. Poseen baja energía (< 50 eV). Brindan una imagen de la morfología superficial de la muestra (Faraldos y Goberna, 2021).

7.1.5.3 Análisis del tamaño de poro

Las imágenes obtenidas del análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM), fueron analizadas mediante el programa Imagj, el cual permitió llevar a cabo una serie de 100 mediciones del tamaño de poro, esta información se recabó en una base de datos en el programa Excel; Microsoft Office, 2017, el cual permitió la elaboración de gráficos que permitieron la interpretación de la información.

7.2. Anodizado e incorporación de Ag *in situ*

Con el propósito de efectuar una incorporación de Ag *in situ* durante el proceso de anodizado, se llevaron a cabo una serie de pruebas en base a lo recomendado por Aguirre, 2021, para la síntesis de las nanoestructuras, bajo las siguientes condiciones;

Tabla 5. Parámetros variables de anodizado e impregnación *in situ*.

| Voltaje | Intensidad de corriente (A) | Tiempo (min) | Temperatura | Electrolito |
|---------|-----------------------------|--------------|------------------------|--|
| 60 V | 0.04 | 7,15,30 | 45°C | Etilenglicol 98%, Agua 2%, Floruro de amonio 0.3%, *AgNO₃ 0.5 %Wt |
| | | | Agitación constante | |

*Indica una variación en el electrolito utilizado por Aguirre, 2021

7.3 Análisis de la actividad antimicrobiana

7.3.1 Sitio de muestreo

Para llevar a cabo el estudio, se consideró un sitio de muestreo, el cual se ubicó en la Facultad de Biología (Edificio R), de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

La Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo se encuentra ubicada en las coordenadas 19°41'29"N, 101°12'25"O en la ciudad de Morelia, Michoacán de Ocampo, de acuerdo al estudio general del acuífero que abastece la ciudad elaborado por Estrada, 2015, la Universidad Michoacana se abastece de la zona administrativa correspondiente al Valle de Morelia-Queréndaro perteneciente a la cuenca del lago de Cuitzeo.

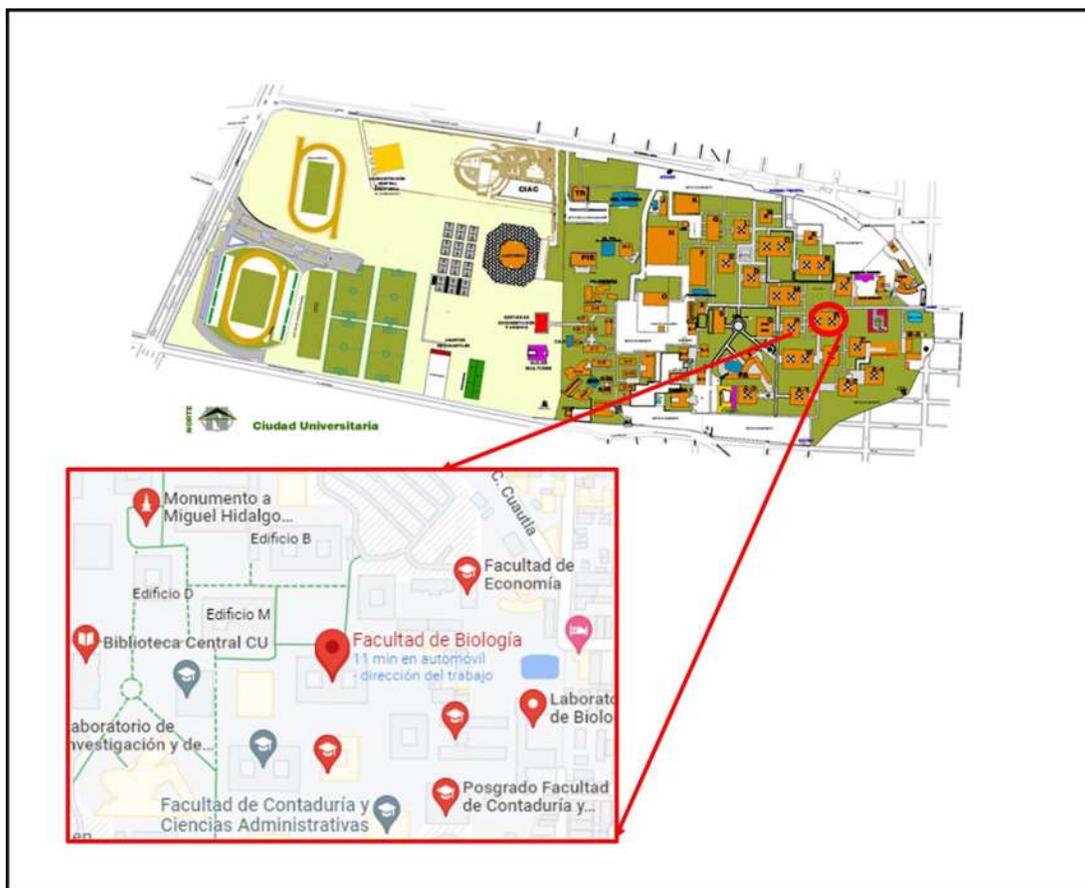


Figura 12. Mapa de Ciudad Universitaria, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Edificio R, Facultad de biología.

Nota: Adaptada de (UMSNH, s. f.)

7.3.2 Toma y procesamiento de muestras

La toma de las muestras para la obtención y aislamiento de las cepas de interés (*Salmonella typhi* y *E. coli*), se llevó a cabo de forma directa utilizando un asa bacteriológica, la cual permitió trasvasar los inóculos de la zona de alcantarillado a los tubos de ensayo (previamente etiquetados con los datos del sitio y fecha correspondiente), los cuales contenían 7 ml de caldo lactosado. Las muestras fueron incubadas a 36°C durante 24 horas para su posterior tratamiento en el área de análisis de Aguas del Laboratorio de Biología Acuática “J. Javier Alvarado Días”.

7.3.3 Aislamiento de las cepas

Una vez confirmada la presencia de organismos patógenos, se tomaron muestras de cada uno de los tubos de ensayo inoculados con las muestras provenientes de la red de alcantarillado. Estas muestras fueron sembradas por la técnica de estriado en placa en medio EMB (Agar eosina azul de metileno) y Agar *Salmonella-Shiguelia* (medios selectivos y de diferenciación), e incubadas a 36°C durante 48 horas, con el objetivo de identificar las cepas de interés; *Salmonella typhi* (ATCC 14028) y *E. coli* (ATCC 25922).

Tras la identificación de las cepas bajo los criterios establecidos en la ficha técnica del medio selectivo, se aisló con asa bacteriológica una o más colonias pertenecientes a cada una de las cepas de interés, repitiendo el proceso de siembra en medio selectivos e incubación a 36°C por 48 horas las veces necesarias para que la diferenciación y aislamiento de las colonias no fuese complicado, hasta obtener un cultivo en placa exclusivo de las cepas anteriormente mencionadas.

7.3.4 Identificación de las cepas

Para la identificación de géneros bacterianos, se ejecutaron protocolos establecidos para la caracterización de las reacciones bioquímicas primarias de la comunidad procarionte heterótrofa, las cuales consistieron en el desarrollo de cultivos multiespecíficos en agaros selectivos y de diferenciación cromática, los cuales se indican en la tabla 6.

Tabla 6. Pruebas bioquímicas para la determinación de familias de Enterobacteriaceae.

| PRUEBA | MEDIO | ADICION DE REACTIVO |
|---|-------------------------------|--|
| Fermentación de Hidratos de Carbono | TSI | NO |
| Desnaturalización de Lisina | LIA | NO |
| Uso de citrato como fuente de carbono y sales de amonio | CITRATO | NO |
| Capacidad de movimiento | SIM | NO |
| Producción de Ácido Sulfhídrico | SIM | NO |
| Producción de Indol | SIM | 10 Gotas de Reactivo Erlich |
| Vía de fermento de lactosa | MVRP | 10 Gotas de Rojo de Metilo |
| | MVRP | 10 Gotas de KOH 5 Gotas Alfa Naftol ESPERAR 15 MIN |
| Hidrólisis de Urea | Agar nutritivo y Agar de Urea | NO |
| Utiliza fenil alanina | Agar fenil alanina | Cloruro férrico al 10 % |
| Ornitina | MIO | NO |
| Fermentación de lactosa | SS | NO |
| Voges-Proskauer | MB | Alfa Naftol Hidróxido potásico 40% |
| Tinción Gram | | Cristal violeta |

| | | |
|------------------------|---------------|-----------------------------------|
| Oxidasa | TMFD | Tetrametil-p-fenilendiamina al 1% |
| Hidrólisis de gelatina | Medio Frazier | Cloruro de mercurio |
| Caldo de Malonato | Malonato | Fenilalanina |

7.3.5 Ensayo antimicrobiano; TiO₂-Ag frente *Salmonella typhi* y *E. coli*

Una vez aisladas e identificadas, se tomaron muestras realizando un barrido con aza bacteriológica de las cepas de *Salmonella typhi* y *E. coli* y se llevaron a incubadora, en tubos de ensayo que contenían 7 ml de caldo nutritivo durante 24 horas, con el fin de mantener la viabilidad de las cepas.

Tras la incubación, con una pipeta estéril, se tomaron 10 ml del caldo nutritivo inoculado con las cepas, y se depositaron en nuevos tubos de ensayo los cuales contenían 10 ml de caldo nutritivo estéril, 1ml por tubo y se agitaron en oscuridad previo al depósito de las placas anodizadas. Los experimentos antimicrobianos fotocatalíticos bajo irradiación UV-A se llevaron a cabo dentro de una cabina de flujo laminar de la marca Ecoshel provista de una lámpara LED UV-A con una longitud de onda de 365 nm y 10 W de potencia, bajo luz solar, y en oscuridad y se tomaron muestras a los tiempos 0, 5, 15, 30, 60 y 90 min., las cuales se sembraron en cajas Petri con agar McConkey por la técnica de estriado en placa.

Como controles, se colocó una probeta anodizada de TiO₂-Ag en caldo lactosado sin material bacteriano, con la finalidad de comprobar la inexistencia de contaminación bacteriana durante la realización del estudio y material bactericida en caldo nutritivo, sin contacto con las probetas anodizadas de TiO₂-Ag, con la finalidad de comprobar que el declive de material bacteriano no es consecuencia de las condiciones del medio y puede atribuirse a la actividad fotocatalítica de las probetas anodizadas de TiO₂-Ag.

Las placas se incubaron invertidas a 37°C por 24 horas en atmósfera aeróbica, para su posterior conteo. La clasificación y conteo de las colonias se realizó bajo los criterios establecidos en la NOM 092 SSA1 1994, con una variación; aquellas colonias clasificadas

como provenientes de una sola fuente, cadenas de colonias y crecimiento extendido, no se contaron como una sola colonia, se identificaron en las placas, se tomó evidencia fotográfica que se procesó en el programa Imagej, admitiendo una mejor cuantificación de la presencia de colonias en los cultivos.

Tabla 7. Criterios para el conteo de colonias en placa de acuerdo a la NOM 092 SSA1 1994.

| Criterios |
|--|
| Contar todas las colonias desarrolladas en las placas seleccionadas (excepto las de mohos y levaduras), incluyendo las colonias puntiformes. Hacer uso del microscopio para resolver los casos en los que no se pueden distinguir las colonias de las pequeñas partículas de alimento. |
| Placas con menos de 25 colonias: Cuando las placas corridas muestran cuentas de menos de 25 colonias, contar el número de colonias presentes en dicha dilución, promediar el número de colonias y multiplicar por el factor de dilución para obtener el valor estimado de cuenta en placa. Aclarar en su informe esta situación agregando la leyenda "valor estimado". |
| Cuando las placas de todas las diluciones no muestran colonias, reportar la cuenta en placa como menor que una vez el valor de la dilución más baja usada. |

| | | |
|---|--|---|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. Cadenas de colonias no separadas claramente entre sí, que parecen ser causadas por la desintegración de un cúmulo de bacterias. 2. Colonias que se desarrollan en película entre el agar y el fondo de la caja. 3. Colonias que se desarrollan en película en la orilla de la caja sobre la superficie del agar. | <p>Provenientes de una sola fuente.</p> |  <p>Ejemplo: Cadenas no separadas claramente que parecen ser causadas por la desintegración. Varias cadenas.</p> |
| <ol style="list-style-type: none"> 1. Cadenas de colonias no separadas claramente entre sí, que parecen ser causadas por la desintegración de un cúmulo de bacterias. | <p>Si la caja contiene una sola cadena, contar como una sola colonia, si la caja contiene varias cadenas que parecen originarse de fuentes separadas, contar cada cadena como colonia individual. No contar cada colonia de la cadena individualmente.</p> |  <p>Ejemplo: Cadenas de colonias no separadas claramente entre sí. Una sola cadena.</p> |
| <ol style="list-style-type: none"> 2. Colonias que se desarrollan en película | <p>Generalmente se observan cómo crecimiento</p> | |

| | | |
|---|---|---|
| <p>entre el agar y el fondo de la caja.</p> <p>3. Colonias que se desarrollan en película en la orilla de la caja sobre la superficie del agar.</p> | <p>diferenciable de otras colonias y se cuentan como tales. (Se cuentan como una colonia).</p> | |
| <p>4. Colonias de crecimiento extendido y en algunas ocasiones acompañadas de inhibición del crecimiento, que en conjunto exceden el 50% de la caja o represión del crecimiento que por sí mismo excede el 25% de la superficie de la caja.</p> | <p>Crecimiento extendido: se toman en cuenta únicamente las placas donde se puedan diferenciar colonias.</p> |  <p>Ejemplo: Zona de crecimiento extendido.</p> |

Los datos obtenidos en el análisis de las muestras se agruparon en una base de datos utilizando el programa Excel; Microsoft Office, 2017. El cual permitió la elaboración de tablas y gráficas.

8. RESULTADOS

8.1 Síntesis y caracterización del material

8.1.1 Influencia del voltaje y la intensidad de corriente en la síntesis de nanotubos de TiO₂ por anodizado.

La morfología superficial de los recubrimientos de Ti y de los anodizados fueron estudiados mediante microscopía electrónica de barrido, las micrografías fueron obtenidas con un Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo JEOL, modelo JSM 7200F (figura 13) que utiliza electrones secundarios. En primer lugar, se analizaron los recubrimientos sin anodizar, y se obtuvieron las micrografías de las figuras 15 y 16, lo que nos permitió tener un punto de comparación entre las superficies anodizadas y sin anodizar.



Figura 13. Microscopio electrónico de barrido.



Figura 14. Muestras montadas para analizar en el microscopio electrónico de barrido.

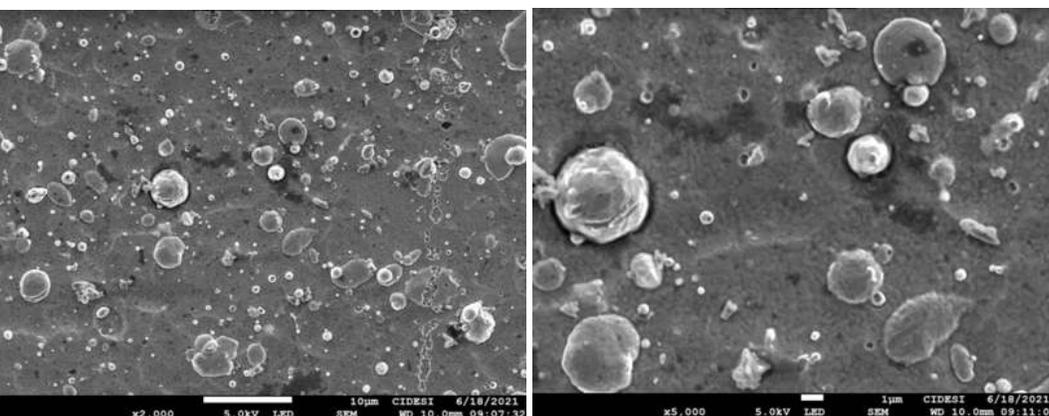
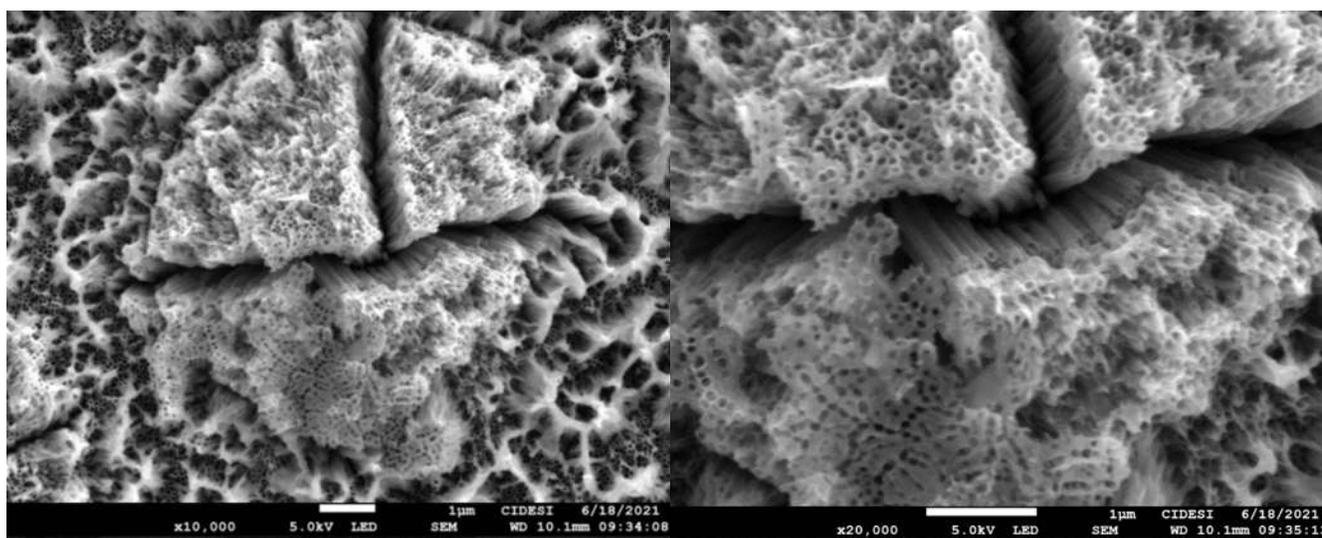


Figura 15. Micrografía de la superficie de acero recubierta de Ti a 2,000 x.

Figura 16. Micrografía de la superficie de acero recubierta de Ti

En la superficie de acero recubierta se puede observar una morfología uniforme del recubrimiento, pero destaca la presencia de partículas denominadas “droplets”, lo que se considera un fenómeno común en el proceso de arco catódico, estas “macropartículas”, son gotas de metal que presentan tamaños en un rango de 1 a 15 μm de diámetro, las cuales son expulsadas por el objetivo y se incrustan en el recubrimiento, en muchas aplicaciones no representan un daño significativo (Sproul, 1996), siendo el caso de nuestra investigación, ya que su presencia en el acabado de la superficie no representa un problema mayor durante el anodizado, más que la aparición de algunas zonas en las que el anodizado se agrieta, fenómeno que puede ser observado en las micrografía presentadas a continuación (figura 17).



anodizado, en un proceso a 60V, 0.02 A, 60 min, 10,000 x y 20,000 x.

Con respecto a los anodizados realizados para determinar las condiciones óptimas de síntesis de las probetas de TiO₂-Ag, se mantuvo el voltaje como una variable constante, siendo la intensidad de corriente y el tiempo, las variables a estudiar. En la mayoría de los estudios en los que se lleva a cabo la síntesis por anodización se utilizan voltajes relativamente altos (20-100V) y tiempo de anodización de más de 5 horas, siendo estos factores determinantes en las características finales de los nanotubos (Concha *et al.*, 2010), pero son pocos o nulos los estudios que mencionan los efectos de las variaciones de la intensidad de corriente durante el proceso, en cambio se enfocan en el efecto producido por la densidad de corriente (intensidad de corriente por unidad de área).

Las probetas en las que se estudió el efecto de la intensidad de corriente, mostraron los mejores resultados para aquellas muestras en las que se utilizó una densidad menor (0.02 A) y tiempos menores a 60 minutos (figura 18), a pesar de que todas las muestras presentan cierto grado de corrosión, pueden ser un buen ejemplo de que la intensidad de corriente, aunado a otros factores como una amplitud en el tiempo, favorece la corrosión y la pérdida de las nanoestructuras por dilución en electrolitos ácidos, como podemos observar en las figuras 19, 20, 21 y 22, donde se presentan las micrográficas para las muestras anodizadas bajo las siguientes condiciones:

- 0.02 A por 120 min.
- 0.04 A por 120 min.
- 0.04 A por 60 min.

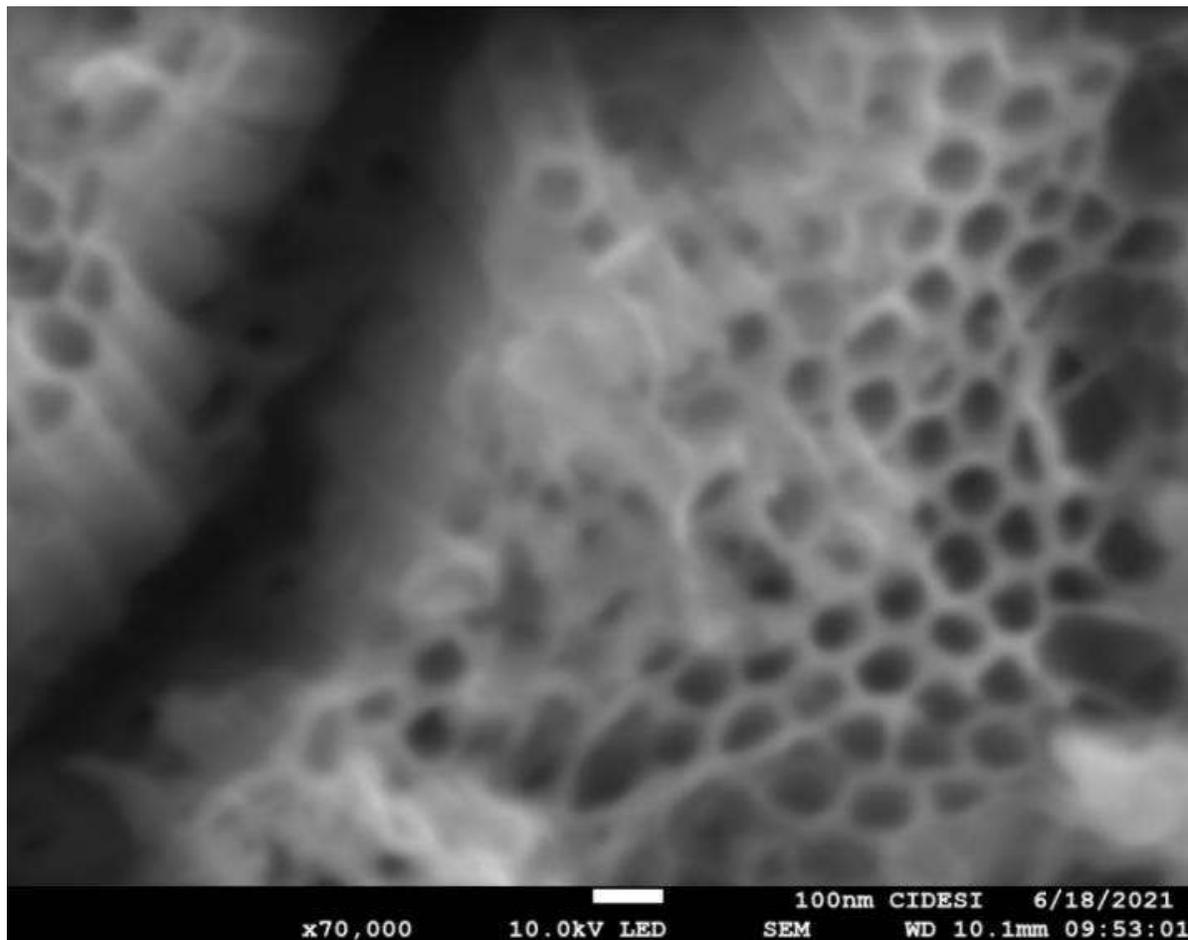


Figura 18. Micrografía de la superficie de acero recubierta de Ti, de un proceso de anodizado a 60V, 0.02 A, 60 min, 70,000 x.

Donde se observa la pérdida del recubrimiento de titanio y zonas anodizadas, por efecto de la corrosión, por lo que se decide conservar una intensidad de corriente suficiente para la formación de las nanoestructuras (0.02 A) y explorar los efectos de la variable tiempo.

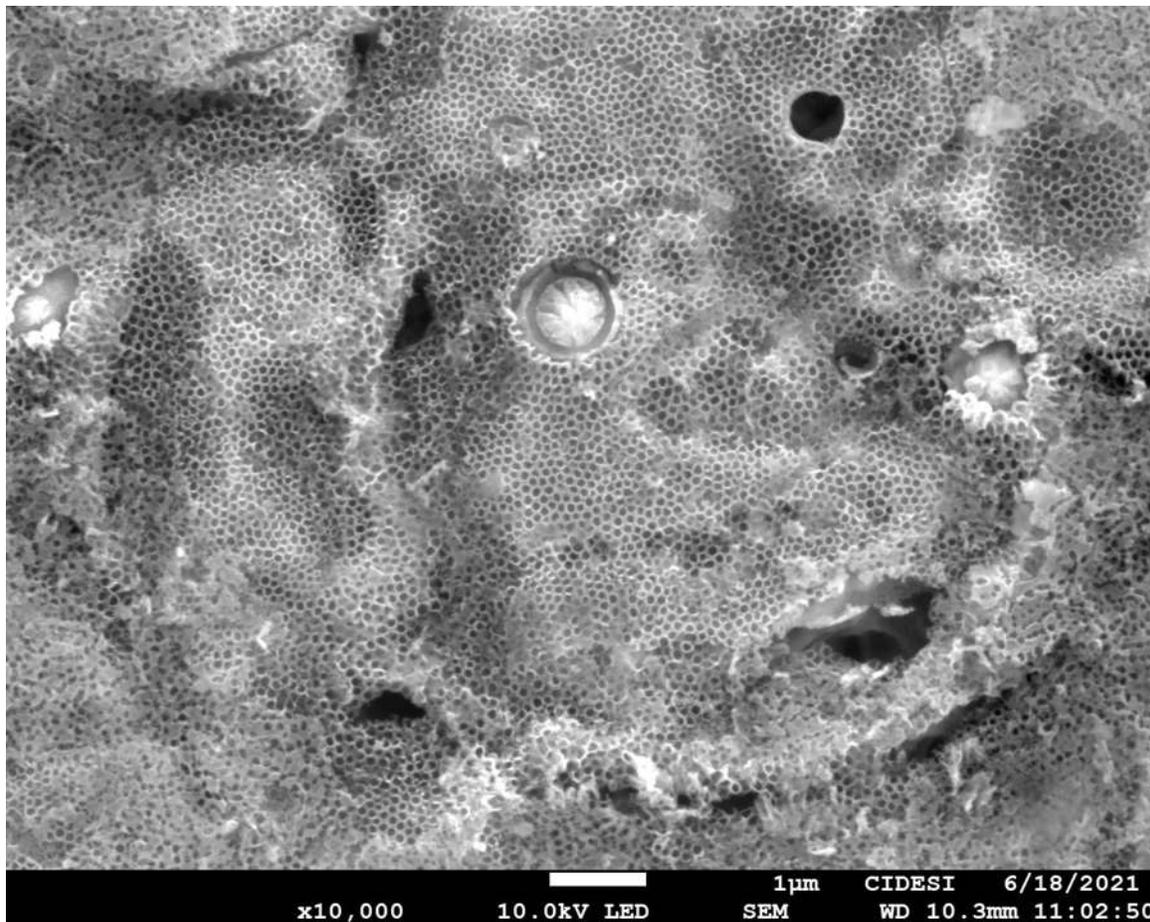


Figura 19. Micrografía de la superficie de acero recubierta de Ti, de un proceso de anodizado; 30 V, 10,000 x, 0.02 A – 120 min

Cabe mencionar que se observaron variaciones en la intensidad de corriente de ± 0.01 A durante los primeros minutos (2-5 min) del proceso de anodizado, que se atribuyen a los fenómenos que tienen lugar en la primera etapa de formación de la capa compacta de óxido sobre la interfase metal-electrolito que produce un decremento en la densidad de corriente debido a la baja conductividad del TiO₂, posteriormente la densidad incrementa en la segunda etapa de formación, mientras la capa de TiO₂ se agrieta o rompe en forma localizada debido al efecto de disolución que provoca el electrolito, estabilizándose al comienzo de la tercera etapa durante la formación de los poros y así mantenerse constante por el resto del proceso

de anodizado (Concha *et al.*, 2010). Para reducir este efecto y mantener la densidad de corriente constante por más tiempo, puede ser necesario variar los parámetros como el área de anodizado, concentración de electrolito y tiempo de anodizado (Aguirre, 2021).

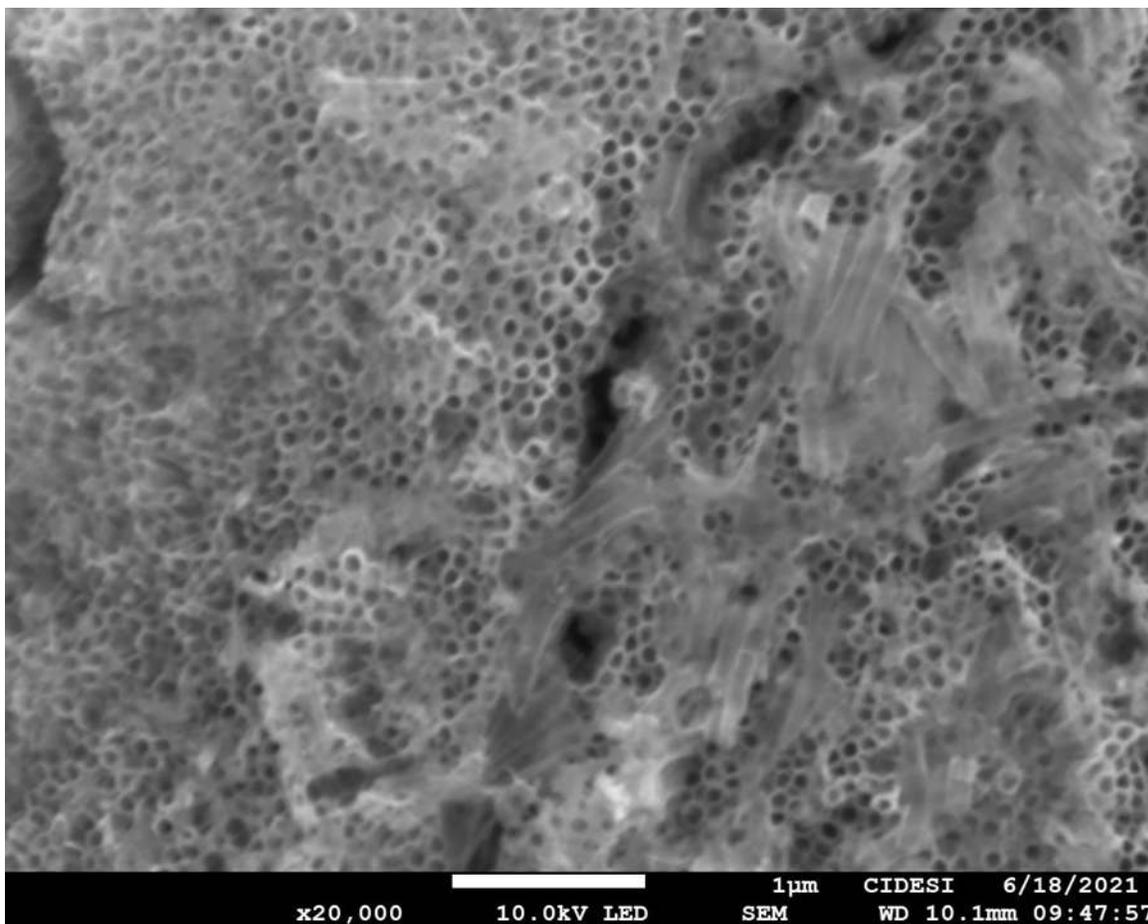


Figura 20. Micrografía de la superficie de acero recubierta de Ti, de un proceso de anodizado; 30V, 20,000 x, 0.02 A – 60 min

Asimismo, se presentaron variaciones de ± 5 V durante los primeros minutos de síntesis de algunas de las probetas anodizadas, respecto a esto, se conoce que las variaciones en el voltaje durante el anodizado en electrolitos de tipo orgánico generan una respuesta importante sobre el comportamiento electroquímico y su resistividad, lo que sumado a las variaciones de la intensidad de corriente contribuye a los procesos de formación y pérdida por corrosión de las nanoestructuras. Con base en lo descrito en la literatura los mejores resultados en cuanto resistividad a la corrosión se presentan bajo condiciones de síntesis a voltajes más altos

(Correia *et al.*, 2021), lo que, sumado a los resultados obtenidos en las micrografías, se justifica la elección de llevar a cabo la síntesis de los materiales bajo 30 V.

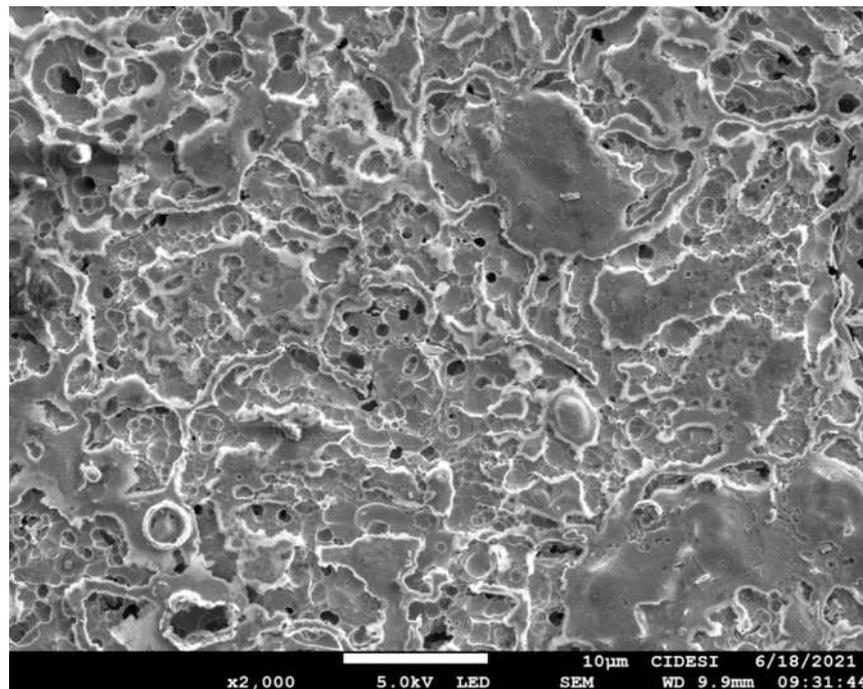


Figura 21. Micrografía de la superficie de acero recubierta de Ti, de un proceso de anodizado; 30V, 2,000 x, 0.04 A – 120 min

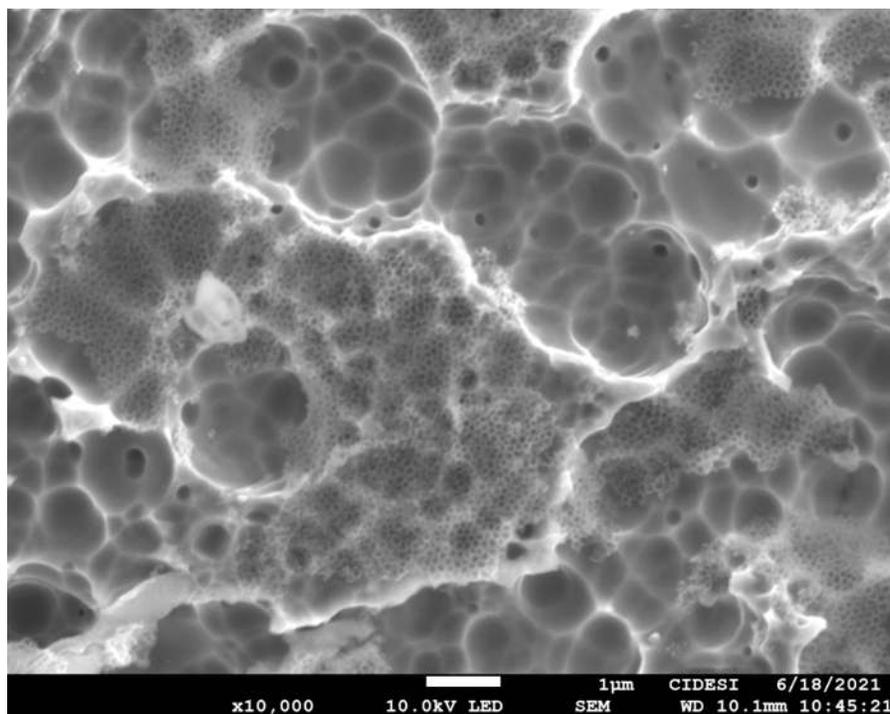


Figura 22. Micrografía de la superficie de acero recubierta de Ti, de un proceso de anodizado; 30V, 2,000 x, 0.04 A – 60 min

8.1.2

Influencia de la variación del tiempo en la síntesis de los nanotubos de TiO₂

En cuanto a la variación de tiempo en la obtención de las nanoestructuras, se optó por la aplicación de tiempos por debajo de 60 minutos, aumentado 10 minutos en cada proceso de anodizado, obteniendo así probetas anodizadas a 0.02 A durante 10, 20, 30, 40 y 50 minutos.

Así en las probetas anodizadas a 60V, 0.02 A, durante 10 minutos, se pudo observar la formación de pequeñas estructuras o formación de cristales que asemejan al pasto o el denominado “nanograss” (figura 21), la formación de este tipo de estructuras suele atribuirse a la cantidad de fluoruro de amonio (NH₄F) contenida en el electrolito y el contenido de agua. Autores como Naduvath, (2015), reportan que electrolitos con un contenido de agua del 2% siempre conducirán a la formación de “nanograss” (figura 23), excepto cuando la concentración de NH₄F es demasiado bajo para dar lugar a un anodizado uniforme, en cambio la formación de estas estructuras se reduce con un aumento en la concentración de agua en el electrolito, dado que altas concentraciones de agua aumentan la conductividad del electrolito, favoreciendo así la velocidad de disolución del óxido, lo que también beneficia el tamaño de diámetro interno de los nanotubos, observando tamaños más grandes.

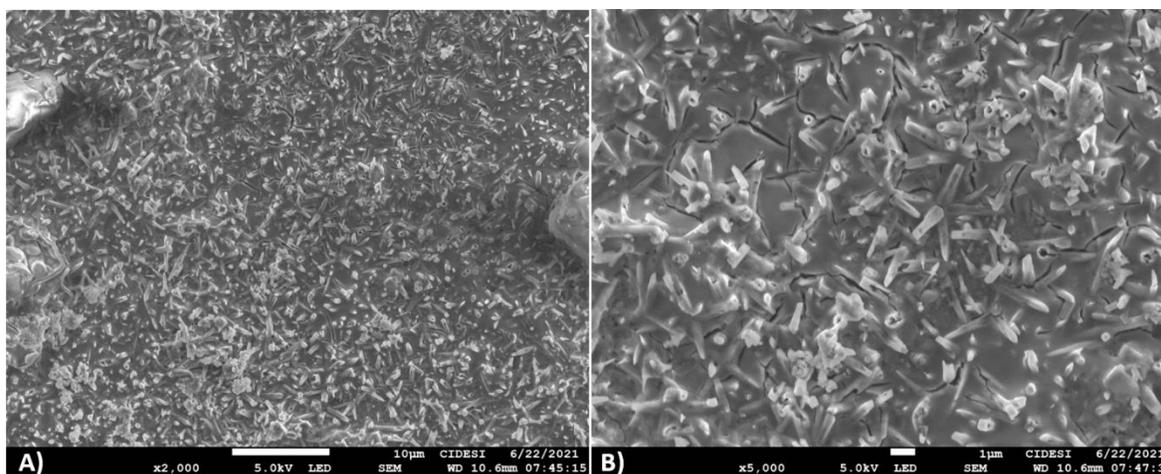


Figura 23. Micrografías de la superficie de acero recubierta de Ti de un proceso de anodizado a 30 V, 0.02 A y 10 min, A) 2,000 X y B) 5,000 x en la cuales se aprecia la formación de estructuras semejantes a la formación cristales o “nanograss”.

El “nanograss” es el resultado de una división vertical de los nanotubos durante su proceso de formación, que es promovida por bajos y medios volúmenes de agua (2-10% en volumen), mientras que altos volúmenes (20% en volumen) dan lugar a una división tipo anillo. Esto podría ser atribuido a la cantidad de agua contenida en el electrolito debido a su edad o tiempo transcurrido desde su preparación hasta la realización de la síntesis, para comprobarlo deberían realizarse una serie de anodizados tomando el tiempo (10 min) como una variable fija y modificar las condiciones del electrolito en cuanto concentración de agua y (NH₄F). Investigaciones como la realizada por Bravo, (2014), sugieren que la aparición de “nanograss” puede prevenirse aplicando un electropulido o lijado previo además de llevar las probetas a sonicación.

A 20 minutos se observó únicamente la formación de nanoporos sobre la superficie del recubrimiento (figura 24).

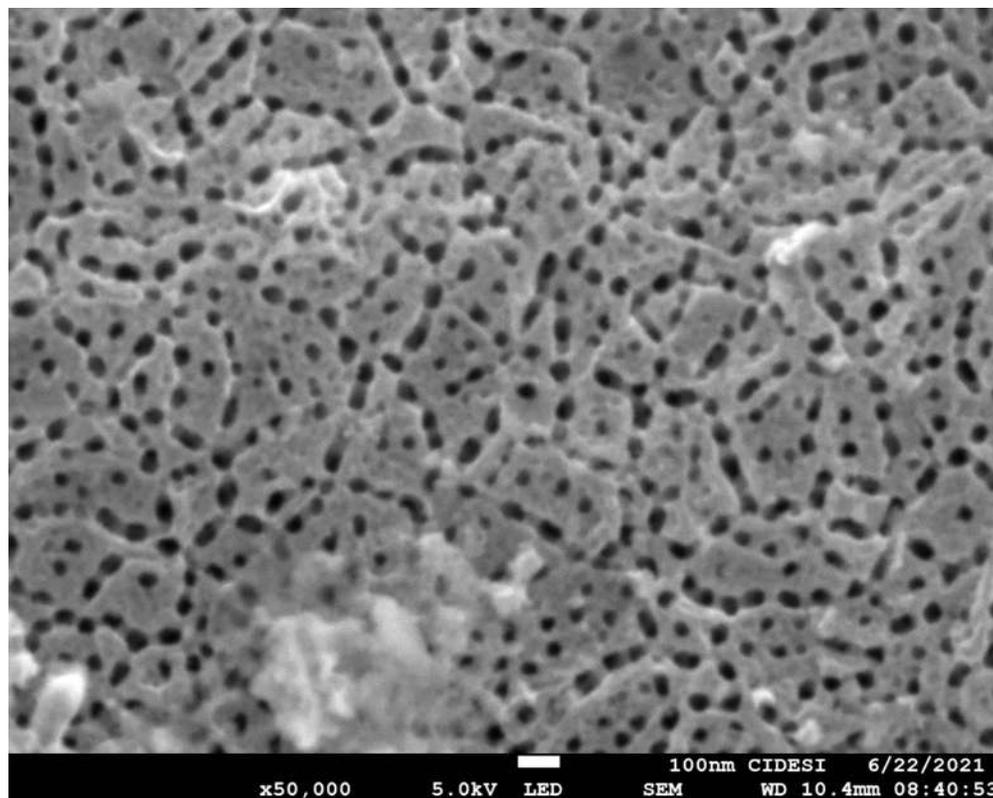


Figura 24. Micrografías de la superficie de acero recubierto de Ti de un proceso de anodizado a 60 V, 0.02 A y 20 min, 50,000 X.

Los mejores resultados se obtuvieron de las probetas anodizadas durante 30 minutos, presentando una superficie más homogénea y autoorganizada (figura 25). por lo que las probetas para el análisis antimicrobiano fueron sintetizadas a 60 V, 0.02 A de intensidad de corriente y un tiempo de anodizado de 30 min. Mientras

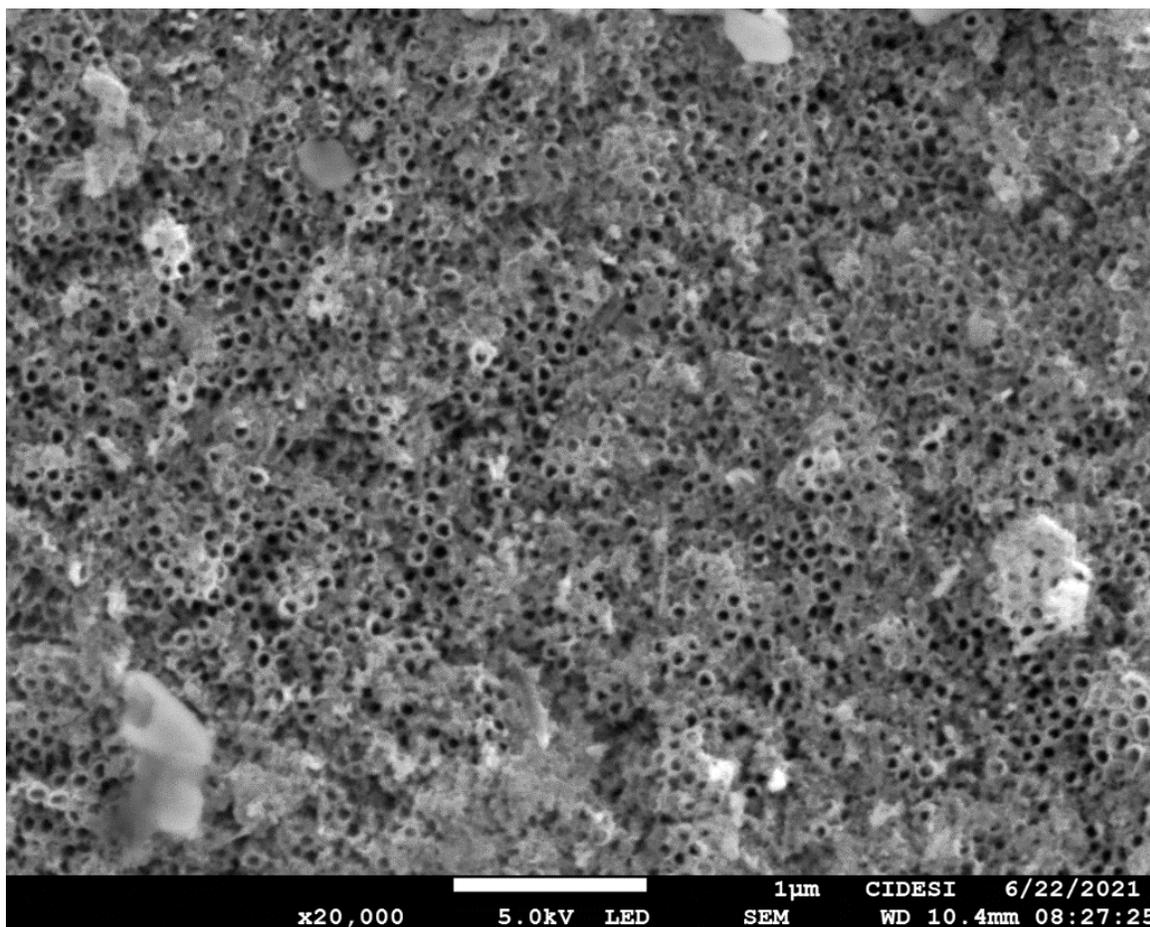


Figura 25. Micrografías de la superficie de acero recubierta de Ti de un proceso de anodizado a 60 V, 0.02 A y 30 min, 20,000 X.

que las probetas anodizadas a 40 y 50 minutos muestran la pérdida de nanoestructuras (figura 26 A) e incluso la pérdida del recubrimiento por efectos de la corrosión (figura 26 B). Lo que concuerda con lo reportado por Xiabo *et al.*, (2007) quienes reportan que, a tiempos más cortos de anodización, se obtienen películas de nanotubos más densas y organizadas, mientras que, para tiempos más largos, la película de nanotubos se vuelve menos densa y algunas partes de la película del óxido se disuelve. En procesos en los que se utilizan potenciales bajos, este fenómeno se atribuye a que la formación electroquímica del óxido es

lenta, por lo que se requieren tiempos relativamente cortos para evitar la dilución química de las nanoestructuras formadas (Concha *et al.*, 2010).

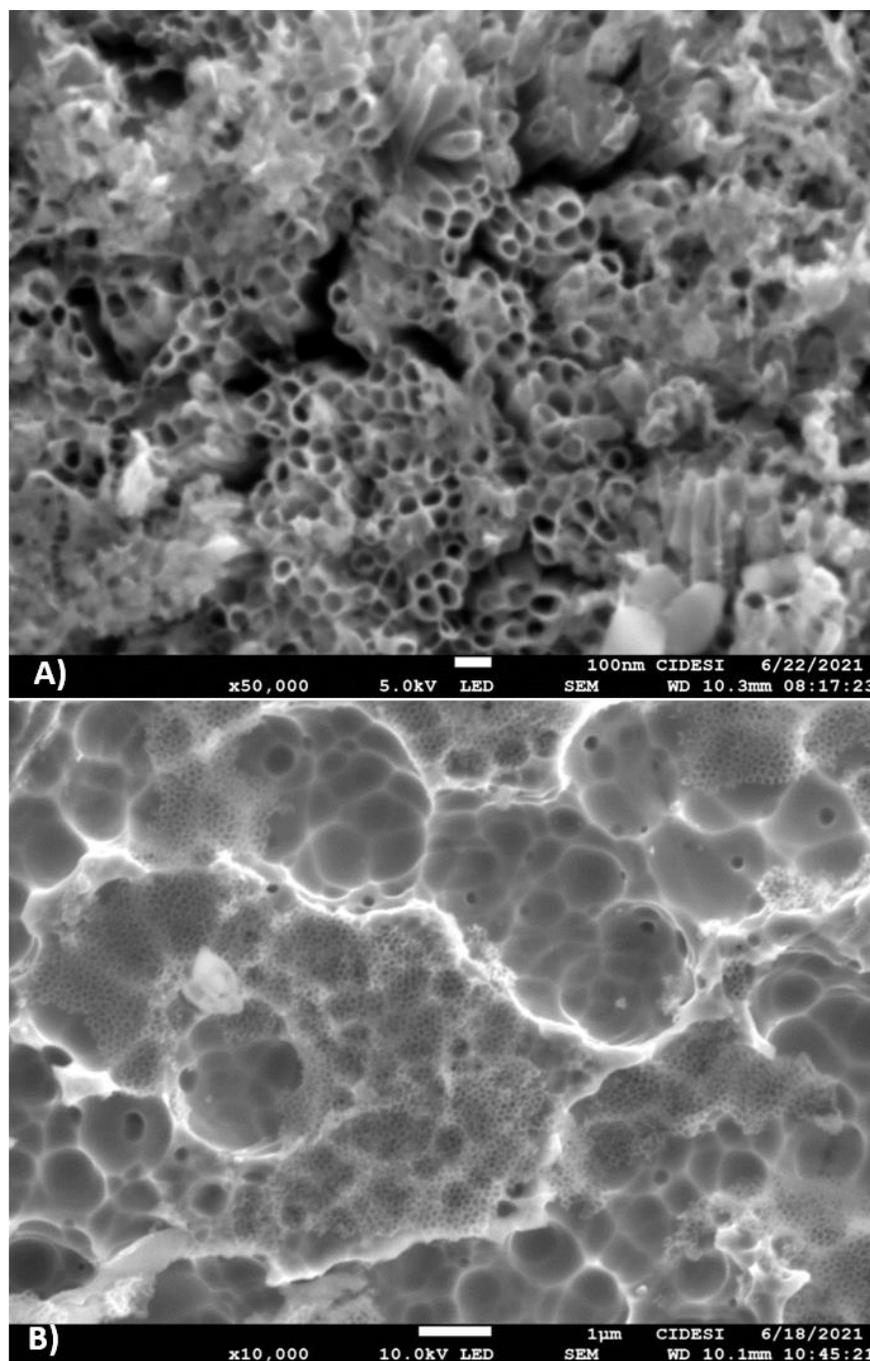


Figura 26. Micrografías de la superficie de acero recubierta de Ti de un proceso de anodizado A) 60 V, 0.02 A y 40 min, 50,000 x, B)60 V, 0.02 A y 50 min, 10,000 x.

8.1.3 Tamaño de poro

El conjunto de datos obtenido de las mediciones realizadas a las probetas anodizadas para llevar a cabo el análisis antimicrobiano permitió recopilar la siguiente información e histograma (figura 27). Los poros muestran una tendencia a presentar tamaños de diámetro de entre los 50.9 nm y los 55.4 nm, lo que se encuentra por arriba del promedio (49-67 nm), los datos de la distribución del tamaño de poro presentan mucha variabilidad, lo que se puede observar en el histograma ya que los datos se encuentran desplazados a la izquierda en forma de “acantilado”, el tamaño de poro máximo fue de 82.5 nm y el mínimo de 46.4 nm, resultados favorables para la investigación debido a que las partículas en tamaño nanométrico presenta mejores propiedades que las de tamaño macro (Vázquez, 2020). Lo que concuerda con lo reportado por Chernozem *et al.*, (2015), cabe mencionar que el estudio reporta una tendencia a disminuir el tamaño de poro con un aumento excesivo en el tiempo de anodizado y un aumento en el tamaño de poro y la distancia entre estos con un aumento en el voltaje aplicado.

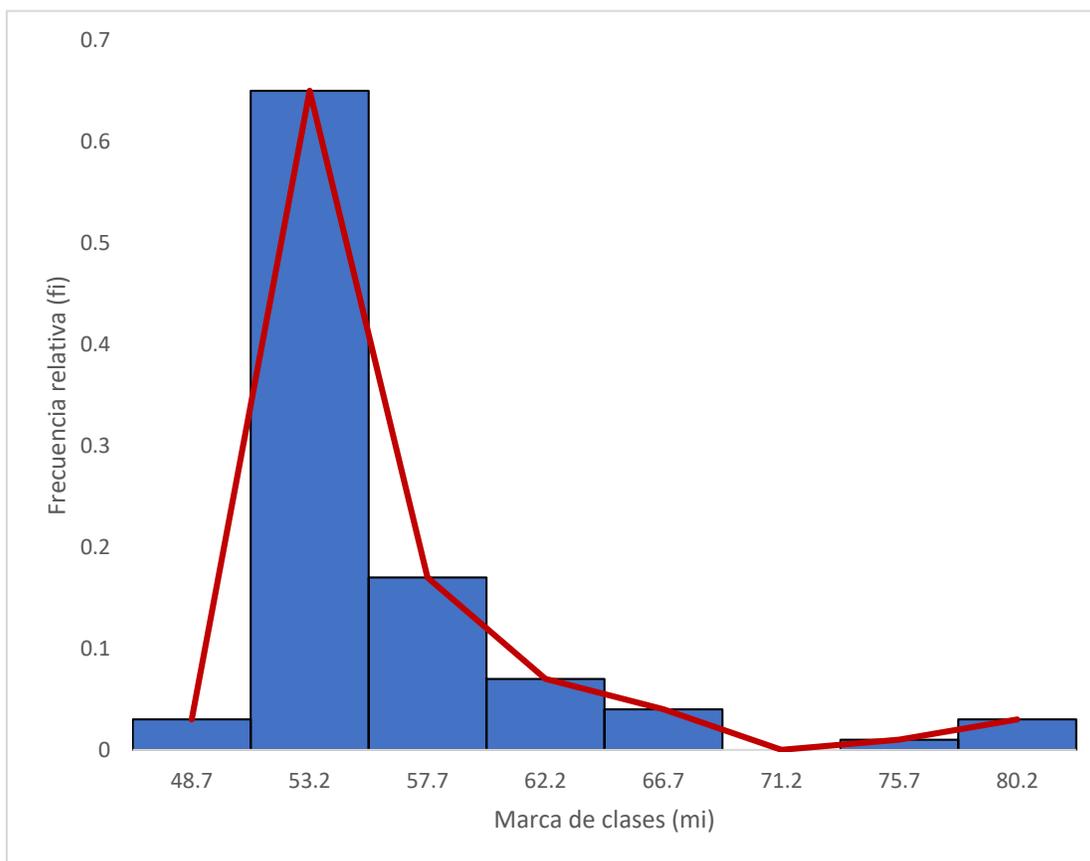


Figura 27. Histograma de la distribución del tamaño de poro.

8.1.4 Análisis de composición química (EDS)

A fin de comprobar que la impregnación durante el método de electrodeposición de Ag aplicado a las probetas sintetizadas para el análisis antimicrobiano se llevó a cabo con éxito, se realizó un análisis de composición química (EDS) a las muestras en el microscopio electrónico de barrido.

Los resultados del espectro exhiben mejores resultados para tiempos de deposición cortos de segundos y milisegundos, lo que concuerda con lo reportado por Ortiz, 2013. A manera de comparación, a continuación, se pueden observar las imágenes obtenidas del análisis por microscopía electrónica de barrido de una muestra con tiempo de electrodeposición de 5 minutos, en las cuales se confirma la presencia de Ag sobre toda la superficie de la probeta anodizada (figura 28), y zonas en las que se presenta una deposición de partículas de plata de mayor tamaño.

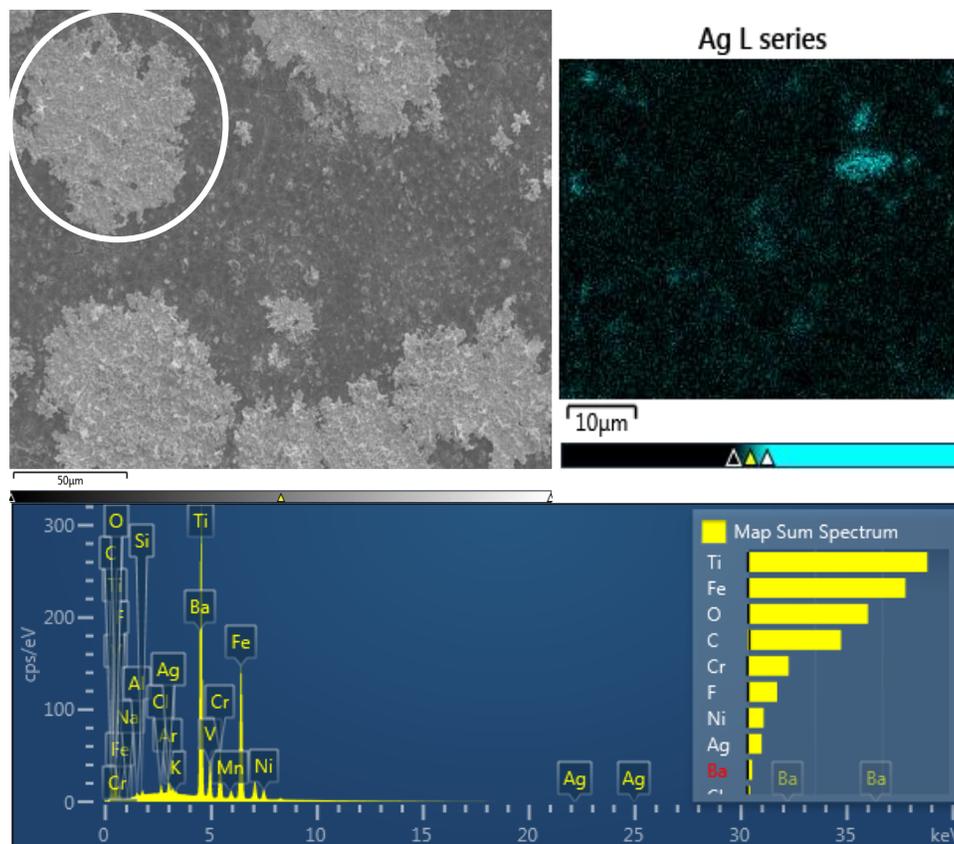


Figura 28. Micrografía y EDS probeta anodizada a 60 V, 0.02 A y 30 min, con proceso de electrodeposición de Ag T = 5 min.

La siguiente micrografía corresponde a una de las probetas sintetizadas con el fin de llevar a cabo el análisis antimicrobiano, las cuales fueron sometidas a tiempos de depositación de 70 s en una disolución acuosa de nitrato de plata 0.5 %Wt (figura 29), la imagen muestra la depositación de cristales de plata sobre la superficie anodizada, con un tamaño mínimo de 600 nm, un máximo de 1200 nm y un promedio de 780 nm, el análisis además permitió obtener el espectro y la tabla de composición de la muestra (figura 32, tabla 10), confirmando la presencia de plata sobre la superficie de las probetas en 2.97 %Wt.

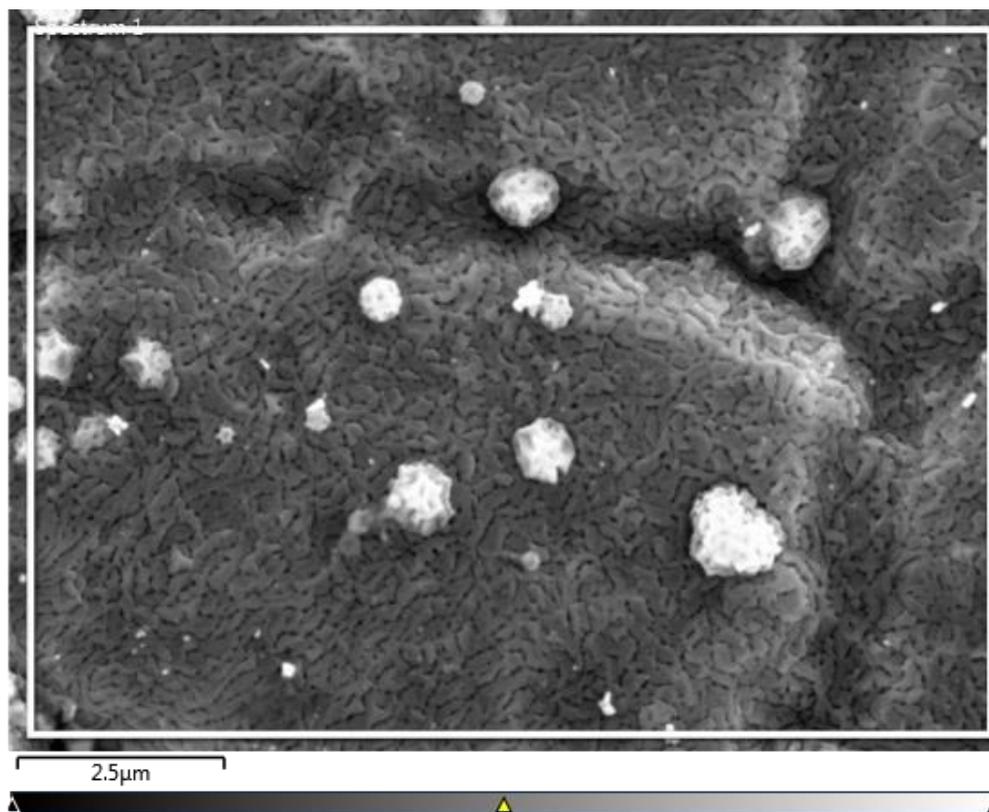


Figura 29. Micrografía y espectro probeta anodizada a 60 V, 0.02 A y 30 min, proceso de electrodeposición de Ag con $t = 70$ s.

Tabla 8.

Análisis de composición química para probetas

| ESPECTRO 1 | CONCENTRACIÓN TEORICA | %Wt | %Wt Sigma | % ATOMICO |
|------------|-----------------------|--------|-----------|-----------|
| Ti | 2.75 | 97.03 | 0.09 | 98.66 |
| Ag | 0.08 | 2.97 | 0.09 | 1.34 |
| Total | | 100.00 | | 100.00 |

8.1.5 Análisis mediante Difracción de Rayos X (XRD)

Los patrones de difracción se obtuvieron utilizando un difractómetro philips X'pert MPD con radiación de CuK α ($\lambda=1.54060$), con una intensidad de las líneas de difracción entre 20° y 80°, en la escala 2 θ con un tamaño de paso de 0.5° y tiempo de paso de 0.08 s.

Los resultados de la difracción de rayos X de la muestra antes del proceso de anodizado indica la presencia de titanio con un pico en 2 θ = 40.17 asociado a los planos (101) en una estructura cristalina hexagonal, correspondiente al pico más alto (figura 30).

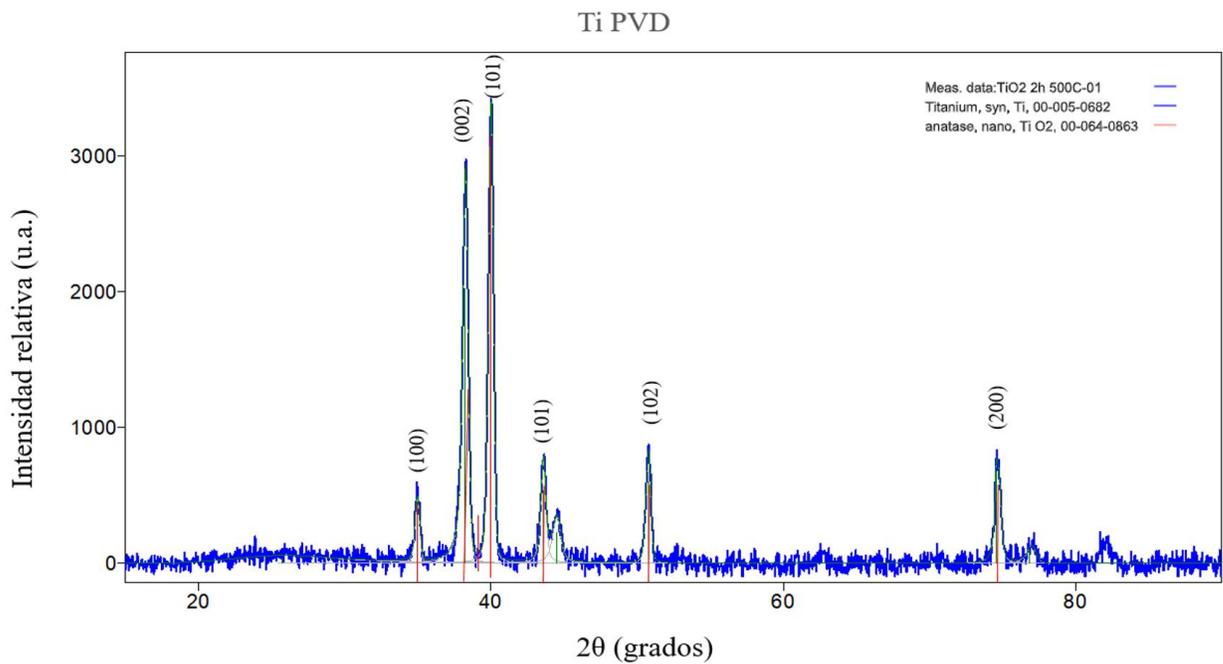


Figura 30. Patrón de difracción de rayos X de Ti depositado sobre acero (pre-anodizado).

Posteriormente se llevó a cabo el proceso de anodizado de la muestra y el tratamiento térmico a 500 °C, del que se muestra el patrón de difracción en la figura 31, el tratamiento térmico da lugar al proceso de cristalización del dióxido de titanio amorfo que se obtiene tras el anodizado, convirtiéndose en TiO₂.

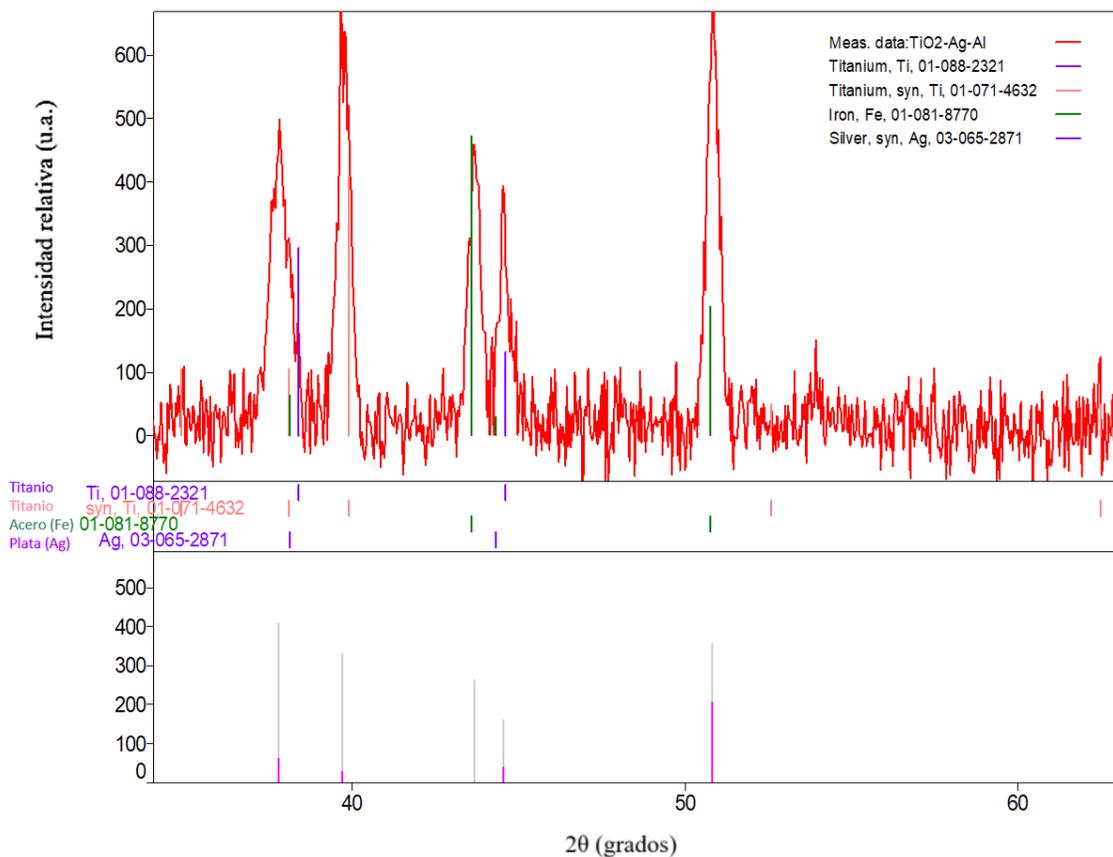


Figura 31. Patrón de difracción de rayos X de TiO₂. Tratamiento térmico posterior al anodizado.

8.2 Efectos de la incorporación de Ag *in situ*

La incorporación de AgNO₃ (0.5 % en peso) al electrolito durante el proceso de anodizado, mostró resultados favorables en cuanto a la incorporación de Ag se refiere, definiendo que incluso cantidades por debajo del 0.5 %Wt son suficientes para lograr la impregnación deseada.

La figura 32 ilustra la imagen en capas y el mapa del espectro obtenido del análisis de composición química, de la muestra sintetizada durante 15 minutos, donde se aprecia la presencia de elementos como el Ni y Cr, debido a la pérdida de recubrimiento por la corrosión.

En cuanto a la formación de estructuras y la variación en el tiempo (7, 15, 30 min.), se ha descrito con anterioridad que la ausencia de la formación de la capa dúplex (capa de barrera y capa de morfología tubular) en electrolitos de cuarta generación (clasificadas así porque permiten combinaciones de electrolitos muy variadas) pudiera ser motivo de un tiempo de anodizado insuficiente.

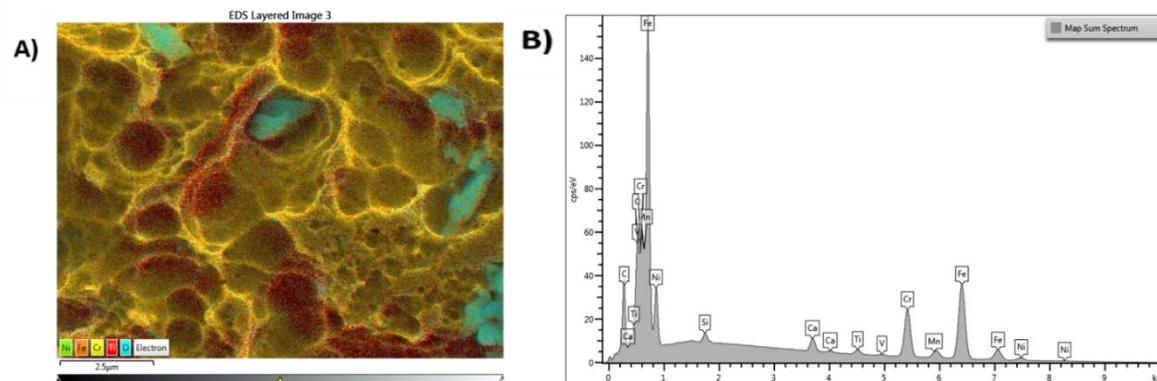


Figura 32. Análisis de composición química (EDS): A) Imagen en capas, B) Mapa del espectro. Muestra sintetizada por 15 min.

En cuanto a la formación de estructuras y la variación en el tiempo (7, 15 y 30 min.), se ha descrito con anterioridad que la ausencia de la formación de la capa dúplex (capa de barrera y capa de morfología tubular) en electrolitos de cuarta generación (clasificadas así porque permiten combinaciones de electrolitos muy variadas) pudiera ser motivo de un tiempo de anodizado insuficiente.

La caracterización por microscopía electrónica de barrido de la muestra anodizada durante 7 min., nos permite apreciar la ausencia de formación de la capa dúplex (Figura 33), mientras que para las muestras anodizadas durante 15 y 30 min., obtenemos imágenes en las cuales podemos identificar un proceso de corrosión del sustrato (Figura 34), lo cual se comprobó a través de los resultados arrojados por el análisis de composición química (EDS) ilustrado en la Figura 32. Se considera además que el aporte de Ag al electrolito modifica sus propiedades conductoras que en añadidura al efecto del tiempo de síntesis (tiempos más prolongados), dan lugar a la exposición del acero (sustrato), resultado de la pérdida del Ti debido a la corrosión, agrietamiento y ataques poco homogéneos. Lo que define que la identificación de los parámetros tiempo y voltaje óptimos para el anodizado y la impregnación *in situ* requiere de una experimentación más a fondo.

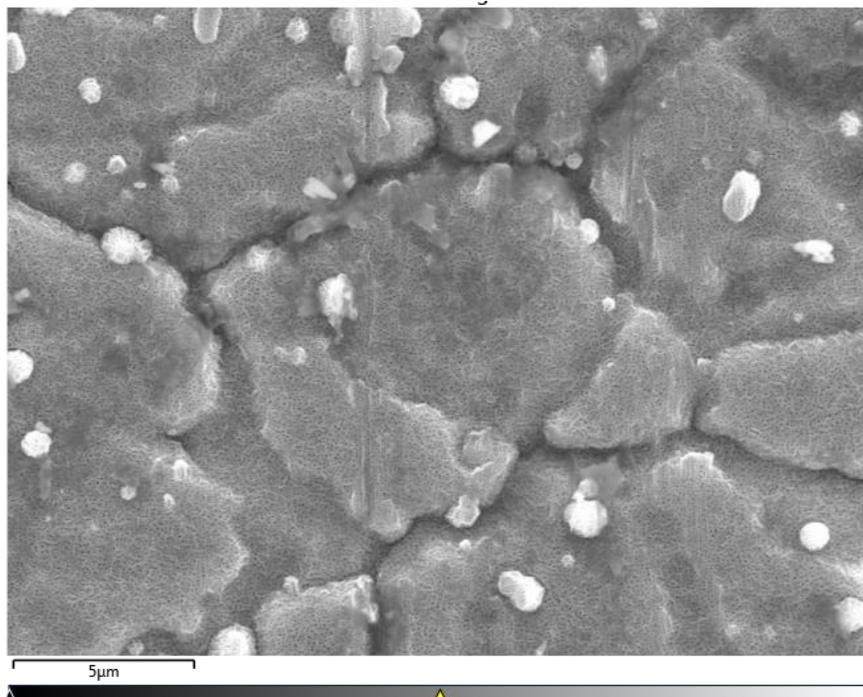


Figura 33. Microscopia electrónica de barrido: Muestra sintetizada por 7 min., (proceso de incorporación *in situ*).

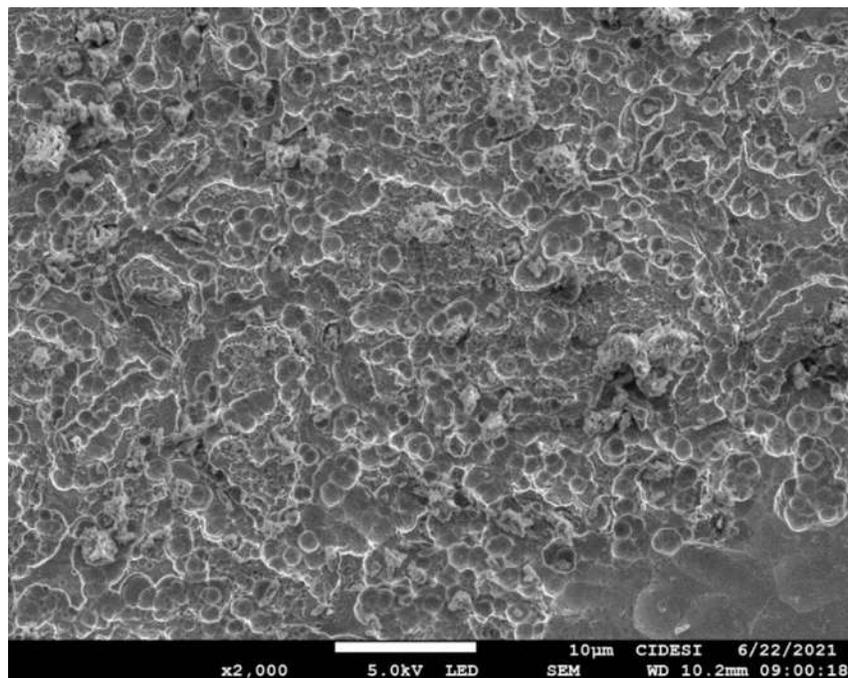


Figura 34. Microscopia electrónica de barrido: Muestra sintetizada por 15 min., (proceso de incorporación *in situ*).

8.3. Análisis de la actividad antimicrobiana

8.3.1 Pruebas bioquímicas para la determinación familias de Enterobacteriaceae

Los resultados de la caracterización de los microorganismos, muestran que las cepas, cumplieron con las características deseadas para los microorganismos entéricos *E.coli* y *Salmonella typhi*.

Tabla 9. Resultados de las pruebas de identificación de cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella* sp. por pruebas bioquímicas

| Prueba | Cepas | Cepas |
|---------------------------------|-------------------------|-----------------------|
| | <i>Escherichia coli</i> | <i>Salmonella</i> sp. |
| Tinción gram | negativa | negativa |
| Oxidasa | negativa | negativa |
| Producción de indol | positiva | negativa |
| Rojo de metilo | positiva | positiva |
| Voges-Proskauer | negativa | negativa |
| Citrato | negativa | positiva |
| Producción de ácido sulfhídrico | negativa | positiva |
| Hidrólisis de urea | negativa | negativa |
| Desaminasa de fenilalanina | negativa | negativa |
| Descarboxilasa de Lysina | positiva | positiva |
| Crecimiento KCN | negativa | negativa |
| Caldo de malonato | negativa | dudosa |
| Movilidad | dudosa | negativa |
| Hidrólisis de gelatina | negativa | negativa |
| Producción de ácido en glucosa | positiva | positiva |
| Producción de gas en glucosa | positiva | positiva |

8.3.2 Análisis de la actividad antimicrobiana.

En relación con el análisis de la actividad antimicrobiana, el conteo en placa de los controles (Probetas de TiO₂-Ag sin bacteria y material bacteriano *Escherichia coli* y *Salmonella typhi*) en los tiempos 0 y 90 min., permitió descartar la existencia de contaminación por agentes microbianos y comprobar que el declive de material bacteriano no es consecuencia de las condiciones del medio.

Se determinó el número de UFC (unidades formadoras de colonias) de acuerdo a la NOM 092 SSA1 1994 y los datos obtenidos fueron agrupados y sometidos a una prueba de Wilcoxon/kruskal-Wallis ($x^2 = 18.93$, g.d.l.= 7, $p \geq .0084$ y una prueba de Tukey-Kramer para determinar la existencia de una diferencia estadística significativa entre tratamientos, concluyendo que respecto a las medias, no existe diferencia significativa entre los tratamiento “Luz solar” y “Luz UV” para ambas cepas (con un valor de p de 1.000), no existen diferencias significativas entre los tratamientos “Control bacteria *E.coli*”, “Control bacteria *Salmonella*” y “Sin tratamiento fotocatalítico” para *Salmonella typhi* (con un valor de p de 0.0798 y 0.9231 respectivamente) (figura 35).

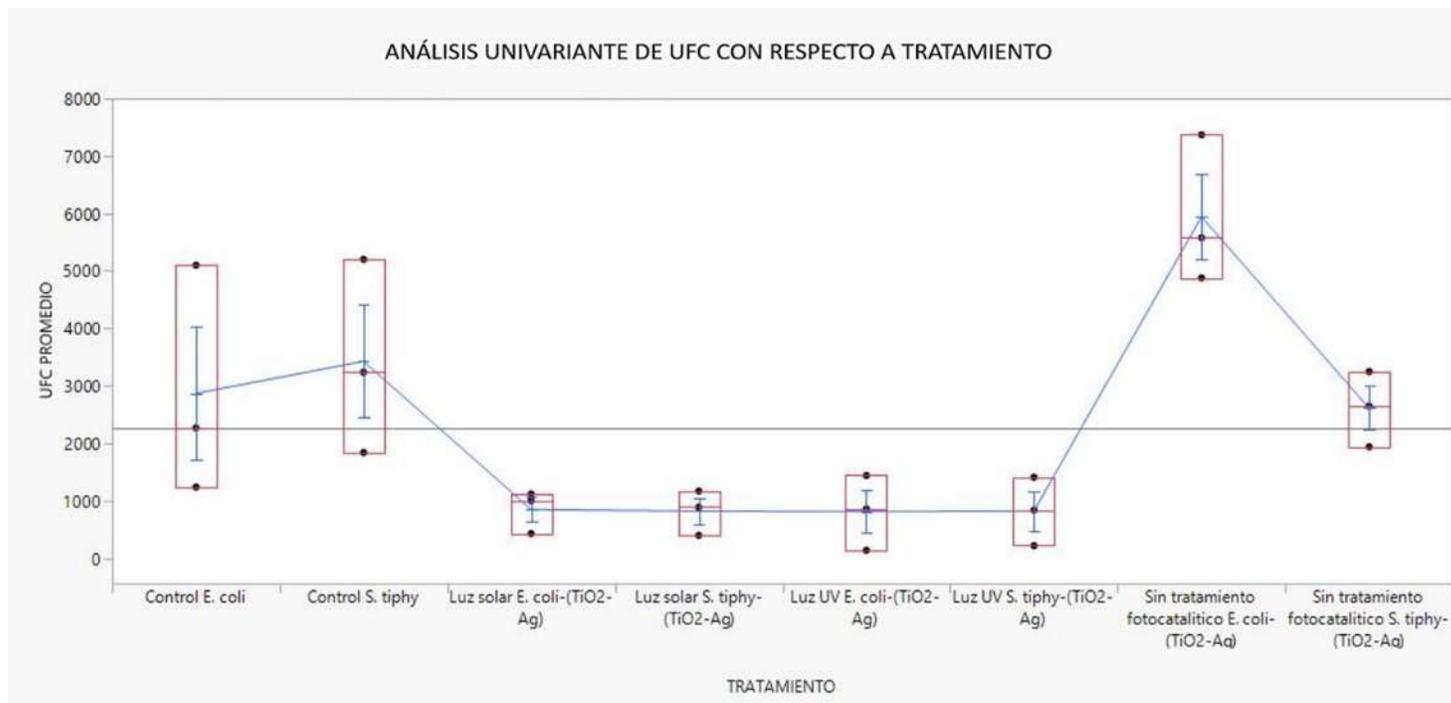


Figura 35. Análisis univariante del conteo de Unidades Formadoras de Colonias con respecto a los tratamientos utilizados frente a *Escherichia coli* y *Salmonella typhi*.

Investigaciones como la realizada por Suri *et al.*, (2012) y Brugnera *et al.*, (2014), demuestran que la incorporación de Ag⁰ sobre TiO₂, irradiado bajo luz solar, luz UV e incluso luz cercana a luz UV como fotocatalizadores, inactiva fuertemente a *E. coli* y *Salmonella tiphy* concluyendo que ambas cepas podrían eliminarse eficazmente, encontrando diferencias significativas en la eficacia de desinfección, debido al tiempo necesario de aplicación de los tratamientos con respecto al número de sobrevivientes, esto relacionado con el porcentaje de plata impregnado en el TiO₂. Atribuido a que el dopado de plata mejora la separación de electrones y huecos, así como la eficiencia de la transferencia de carga entre la banda de valencia y la banda de conducción de TiO₂ (Pam y Lee, 2014) en porcentajes cercanos al 1% en peso, resultando en una reducción bacteriana del 100% en tiempos cortos (15-30 min), sin importar la fuente de luz (Luz UV artificial o luz solar) en el sistema fotocatalítico (Sökmen *et al.*, 2001), pero se comportan de manera muy diferente para cargas de plata más altas (Kubacka *et al.*, 2008), incluso con valores cercanos 1% en peso, alargando los tiempos necesarios (60-180 min) para alcanzar una desinfección completa (Castro *et al.*, 2011), lo que concuerda con lo encontrado en la presente investigación, mostrando un efecto de reducción en la población bacteriana en los experimentos realizados bajo luz ultravioleta para *E.coli* en un 97.4% y para *Salmonella typhi* en un 96.5% (figura 36) y una tasa de muerte bacteriana en los experimentos realizados bajo luz solar para *E.coli* en un 86.5% y para *Salmonella typhi* en un 80.4% (figura 37), con un porcentaje del 2.97 % en peso de Ag⁰ incorporada al TiO₂ anodizado, considerando que para llegar al 100% de eficiencia se necesitaría más tiempo de exposición a radiación UV o luz solar, o emplear un menor porcentaje en peso de Ag⁰ para la incorporación en el TiO₂.

A pesar de que en estudios como el realizado por Shahbaz *et al.*, (2016) y Kim *et al.*, (2013), sin importar que ambas bacterias son gram negativas y poseen estructuras celulares similares *Salmonella tiphy* se muestra más sensible en comparación con *E. coli* frente a tratamientos fotocatalíticos usando TiO₂ para su inactivación, en la presente investigación no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos fotocatalíticos “Luz solar” y “Luz UV” aplicados a las probetas de TiO₂-Ag frente las cepas *E.coli* y *Salmonella tiphy*,

posiblemente atribuido al efecto de la concentración inicial de microorganismos que influye en el tiempo en el que se alcanza el 100% de inactivación bacteriana (López, 2014).

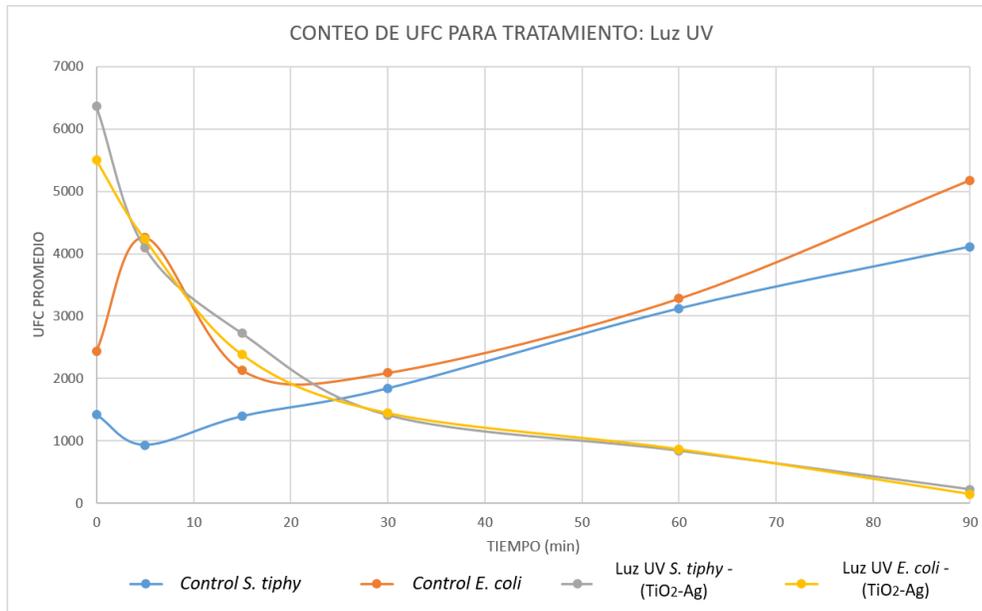


Figura 36. UFC promedio para el Tratamiento “Luz UV-TiO₂Ag” frente a *Escherichia coli* y *Salmonella typhi*.

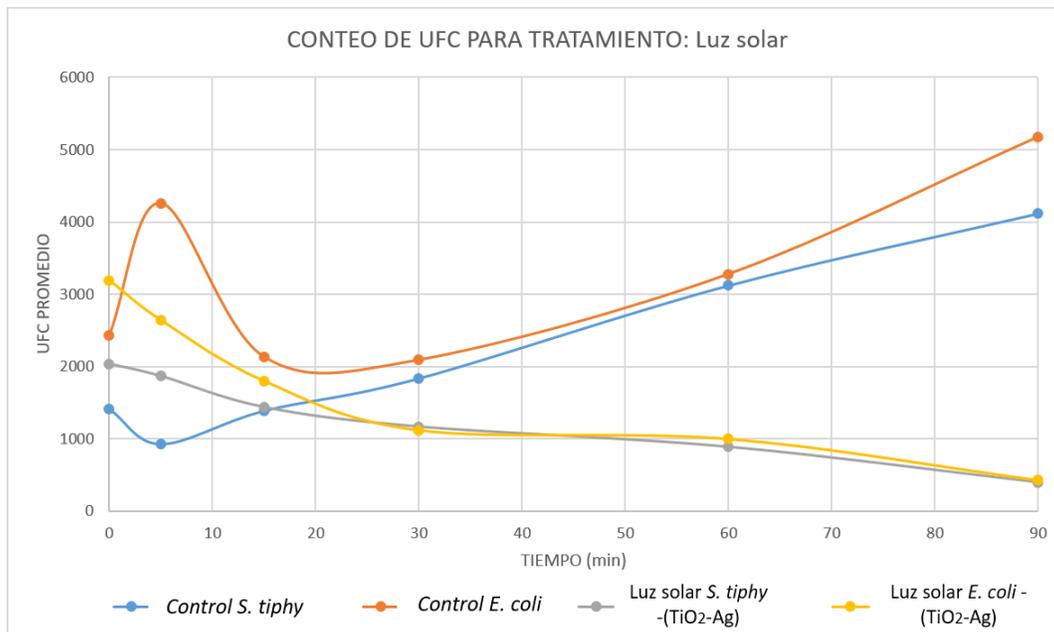


Figura 37. UFC promedio para el Tratamiento “Luz solar-TiO₂-Ag” frente a *Escherichia coli* y *Salmonella typhi*.

Por otra parte, los experimentos realizados sin tratamiento fotocatalítico, exponiendo las probetas de TiO₂-Ag frente al material bacteriano, no muestran un efecto de inhibición bacteriana frente a *Escherichia coli* y *Salmonella typhi* por sí solas, observando un crecimiento poblacional a lo largo del tiempo (figura 38), esto debido a la ausencia de la activación fotónica del TiO₂-Ag necesaria para la generación de especies reactivas de oxígeno responsables de los daños específicos en el ADN, por los cuales se ha empleado en la inhibición de bacterias (Vallejo *et al.*, 2016).

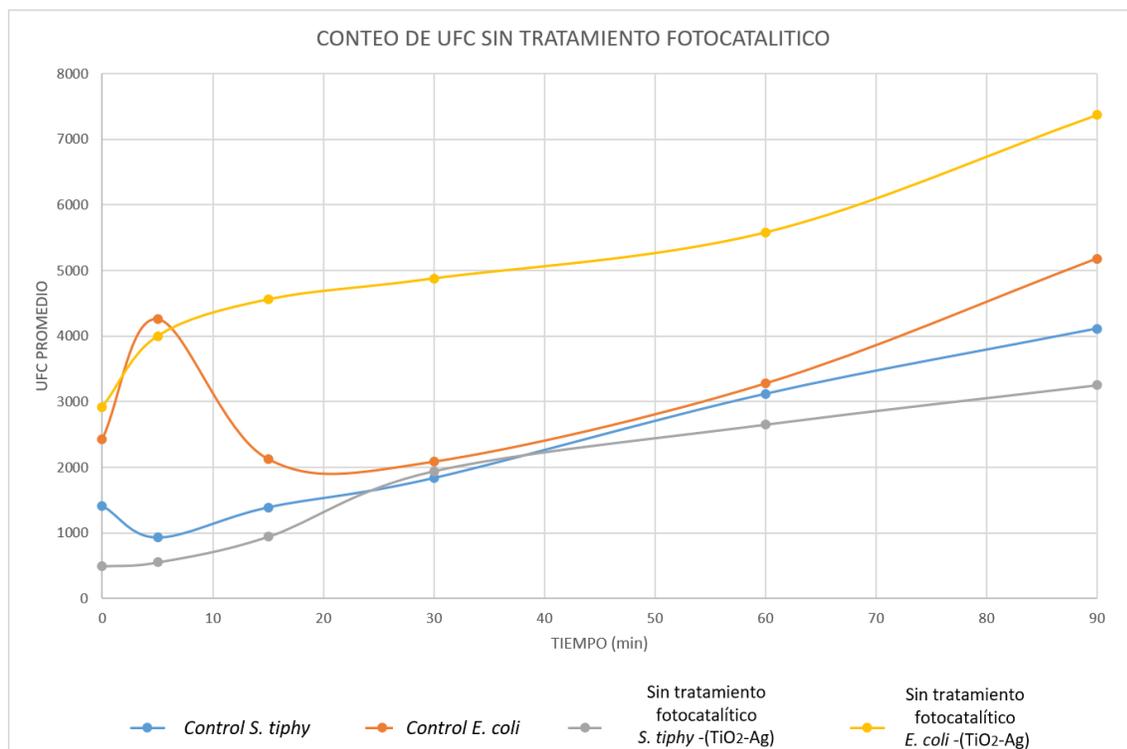


Figura 38. UFC promedio vs tiempo, sin tratamiento fotocatalítico frente *Salmonella typhi* y *Escherichia coli*.

9. CONCLUSIONES

La incorporación de la impureza de plata, en los nanotubos de TiO₂ obtenidos por el método de anodizado electroquímico, le confirió mejores propiedades fotocatalíticas al material, aumentando su efectividad antimicrobiana bajo radiación UV frente a *E. coli* y *Salmonella typhi*.

De acuerdo a la evidencia científica previa, la incorporación de la impureza de plata al 2.97 % en peso, en los nanotubos de TiO₂ obtenidos por el método de anodizado electroquímico y bajo tratamiento fotocatalítico, presentó un efecto de prolongación en el tiempo necesario para obtener un 100% de eficiencia antimicrobiana frente a las cepas *E. coli* y *Salmonella typhi*, considerando necesario implementar un menor % en peso de Ag en el electrolito durante el proceso de electrodeposición para obtener un menor porcentaje de Ag⁰ de incorporación en las probetas de TiO₂ anodizadas.

Las variables de síntesis por anodizado empleadas durante el experimento permiten controlar la morfología final de las nanoestructuras, considerando que las mejores condiciones de síntesis son 60 V, 0.02 A de intensidad de corriente, con un arreglo en serie y un tiempo de 30 minutos, obteniendo tamaños de nanoporo máximo de 82.5 nm y mínimo de 46.4 nm. Por medio del análisis de composición química (EDS) se demuestra que la incorporación de plata por la técnica de doble pulso es efectiva, obteniendo buenos resultados con tiempos cortos (milisegundos o segundos). Finalmente, la implementación de la placa de acero inoxidable como sustrato es adecuado para el proceso de síntesis por anodizado, sin embargo, dificulta el análisis de las propiedades ópticas del material obtenido, por lo que se recomienda indagar sobre otro tipo de sustratos.

Se demostró que la incorporación de plata *in situ* durante el proceso de síntesis por anodizado incorporando AgNO₃ al electrolito, es posible. No obstante, el tipo de electrolito empleado en el proceso de anodizado electroquímico influye sobre la resistencia a la corrosión del sistema, de ahí que, la incorporación de AgNO₃ al electrolito resulte desfavorable para el proceso de síntesis. Siendo necesaria una investigación y experimentación más a fondo para determinar los parámetros de síntesis óptimos que permitan la formación de la nanoestructuras, bajo estas condiciones.

Los resultados del análisis antimicrobiano de las probetas de TiO₂-Ag bajo “Luz UV” y “Luz solar” frente a las cepas *E.coli* y *Salmonella tiphy*, sugieren que para llegar al 100% de eficiencia antimicrobiana se necesitaría más tiempo de exposición a radiación UV o luz solar. Además la ausencia de diferencias significativas entre los tratamientos fotocatalíticos “Luz solar” y “Luz UV” aplicados a las probetas de TiO₂-Ag frente las cepas *E.coli* y *Salmonella tiphy*, posiblemente se atribuyen al efecto de la concentración inicial de microorganismos que influye en el tiempo en el que se alcanza el 100% de inactivación bacteriana.

10. RECOMENDACIONES

La implementación de la placa de acero inoxidable como sustrato es adecuado para el proceso de síntesis por anodizado, sin embargo, dificulta el análisis de las propiedades ópticas del material obtenido, por lo que se recomienda indagar sobre otro tipo de sustratos.

La evidencia sugiere que el tiempo que transcurre entre la preparación del electrolito y su utilización no debe variar entre experimentos ya que podría influir sobre la cantidad de agua contenida en este y favorecer la aparición de estructuras como el “*nanogras*”.

La síntesis de nanotubos utilizando el potencióstato/galvanostato es una opción que podría permitir un mejor control de las variables en cuanto a estabilidad de la intensidad de corriente, sin embargo, requiere de una experimentación más a fondo para determinar las condiciones adecuadas para la síntesis.

11. REFERENCIAS

- Aguilera Correa, J. J. (2018). *Efecto de las modificaciones obtenidas mediante anodizado de aleaciones de titanio en la adherencia bacteriana y la osteointegración para la prevención local de las infecciones de prótesis articular*. Tesis doctoral inédita. Universidad Autónoma de Madrid.
- Aguirre, N. C. 2021. Síntesis y Caracterización de Películas Nanoestructuradas de TiO₂. Tesis de Maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. México
- Albu, S.P., Schmuki, P. .2013. *Influence of anodization parameters on the expansion factor of TiO₂ nanotubes*. *Electrochimica Acta*, 91(), 90–95.
- Allahverdiyev, A. M., Abamor, E. S., Bagirova, M., Rafailovich, M. 2011. Antimicrobial Effects of TiO₂ and Ag₂O Nanoparticles against Drug- Resistant Bacteria and Leishmania Parasites. *Future Microbiol.* Vol. 6, (8), 933–940 pp.
- Apella, M. C. y Araujo, P.Z. 2011. Microbiología de agua. Conceptos basicos. Universidad nacional de Tucuman. Buenos Aires. Argentina. 33-50 pp. https://www.psa.es/es/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf
- Asahi, R.Y., Morikawa, T.A., Ohwaki, T., Aoki, K., Taga, Y. (2001). Visible-light photocatalysis in nitrogen-doped titanium oxides. *Science*, 293(5528), 269-271.
- Betancur, C. P., Hernández, V., Buitrago, R. 2016. Nanopartículas para materiales antibacterianos y aplicaciones del dióxido de titanio. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. Vol. 35, (4). 387-402 pp. [CIENCIAS CLÍNICAS Y PATOLÓGICAS \(sld.cu\)](https://www.sld.cu)
- Borja-Borja, J.M. y Rojas-Obviedo, B.S. 2020. Nanomateriales. Métodos de síntesis. *Polo del concimiento*. Vol. 5, (8). 426-445 pp.
- Bravo, N.A. 2014. Síntesis y Caracterización de Nanotubos de TiO₂ Obtenidos por Oxidación Anódica. Universidad de Santiago de Chile. Santiago, Chile.

-
- Brito, E.C., Borgues, N. D., Falavina, E.M., Prazeres, D., Hofer, E. 2010. Serotipos de Salmonella de origen humano identificados en el Estado de Pará (Brasil) entre 1991 y 2008. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*. Vol. 1, (1). 93-100. http://scielo.iec.gov.br/pdf/rpas/v1n1/es_v1n1a14.pdf
- Brugnera, M. F., Miyata, M., Queico, C., Boldrin, M.V. 2014. Silver ion release from electrodes of nanotubes of TiO₂ impregnated with Ag nanoparticles applied in photoelectrocatalytic Disinfection. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 278: 1-8.
- Calvo, J. y Martínez-Martínez, L. 2008. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Elsevier España*, S.L Vol. 27, (1). 44-52 pp. [Mecanismos de acción de los antimicrobianos \(elsevier.es\)](http://www.elsevier.es)
- Castro, C.A., Arámbula, A.L., Centeno, A., Giraldo, S.A. 2009. Degradación Heliocatalítica de *Escherichia coli* en Sistemas tipo Desinfección SODIS, con Dióxido de Titanio Modificado. *Información Tecnológica*. Vol. 20, (6). 29-36 pp. [Microsoft Word - art05-4133IT-08-vf-Castro 8p -crm separ elect p29-36 .doc \(conicyt.cl\)](#)
- Castro, C., Jurado, A., Sissa, D., Giraldo, S.A. 2011. Performance of Ag-TiO₂ Photocatalysts towards the Photocatalytic Disinfection of Water under Interior-Lighting and Solar-Simulated Light Irradiations. *International Journal of Photoenergy*.
- Chernozem, R.V., Surmeneva, M.A., Surmenev, A. 2015. Influence of Anodization Time and Voltage on the Parameters of TiO₂ Nanotubes. *National Research Tomsk Polytechnic University*. 1 (3): 116-121.
- Concha, M. O., Reynaud, A. G., Cuevas, C. 2010. Crecimiento de nanoestructuras de TiO₂ obtenidas a bajo potencial por reacción anódica en soluciones ácidas H₂SO₄/HF. *Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología de Superficies y Materiales*. Vol. 23, (5). 183-187 pp. [Microsoft Word - 36025.doc \(cinvestav.mx\)](#)
- Correia, M., Gil, L.E., Angulo, N., Mendez, E., Pereyra, M. 2021. Efecto del voltaje y electrolito en la morfología y comportamiento a la corrosión de capas

nanoestructuradas de TiO₂ en sustratos de Ti₆Al₄V para uso biomédico. Acta microscópica. 1 (31): 21-32 pp. [View of Efecto del voltaje y electrolito en la morfología y comportamiento a la corrosión de capas nanoestructuradas de TiO₂ en sustratos de Ti₆Al₄V para uso biomédico \(acta-microscopica.org\)](#)

Díaz-Cuenca, E., Alvarado-Granados, A. R., Camacho-Calzada, K.E. 2012. El tratamiento de agua residual doméstica para el desarrollo local sostenible: el caso de la técnica del sistema unitario de tratamiento de aguas, nutrientes y energía (SUTRANE) en San Miguel Almaya, México., Vol. 14, (1). 78-97 pp.

Dizaj, S. M., Lotfipour, F., Barzegar-Jalali, M., Zarrintan, M. H., Adibkia, K. 2014. Antimicrobial Activity of the Metals and Metal Oxide Nanoparticles. Mater. Sci. Eng. Vol. 44, 278–284 pp.

Dubed Bandomo, G. C. 2017. Síntesis y Caracterización Fisicoquímica y Foelectroquímica de Membranas de Nanotubos de TiO₂ (MNTs- TiO₂) Modificadas con Materiales Electrocatalíticos. Tesis de Maestría. Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica.

Escamilla Rodríguez, A. H. 2012. Modificación de Superficies de Titanio y Aleaciones de Titanio por el Método de Anodizado Electroquímico para la Generación de Arreglos con Nanotubos de Óxido de Titanio (TiO₂). Tesis de Maestría inédita. Universidad Autónoma de Baja California.

Espigares G. M., Pérez-López J.A., Gálvez R. 1968. Aspectos sanitarios del estudio de las aguas residuales.

Esquivel Barajas, G., Flores Magallon, R., Bretado Aragon, L., Álvarez Bernal, D., & Silva García, T. (2018). Efecto antibacterial de nanopartículas metálicas (Dióxido de titanio dopado con nitrato de plata) en aguas residuales. Efecto Antibacterial De nanopartículas metálicas (Dióxido De Titanio Dopado Con Nitrato De Plata) En Aguas residuales). (p.4). Morelia: Universidad de la Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo. <http://www.egnosis.udg.mx/index.php/trabajosinocuidad/article/view/403/238>

Estrada A.M. 2015. Análisis hidroquímico, modelación de flujo e interpretación del agua subterránea que abastece a la zona de Morelia, Michoacán México. Tesis de Maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. [IIMM-M-2015-0464.pdf \(umich.mx\)](#)

Faraldos, M. y Goberna, C. 2021. Técnicas de caracterización de materiales. Tercera edición. Madrid. España.

Figura 1. *Tipos de bacterias - Imagui.* (s. f.). <https://www.imagui.com/a/tipos-de-bacterias-i7earogk4>

Figura 2. *LIBRO-PEDIA Ciencias Naturales - Elbibliote.com.* (s. f.). http://elbibliote.com/libro-pedia/manual_csnaturales/5grado/capitulo7/tema03.php?g=5&c=7&t=3

Figura 3. *Crystal structures of TiO₂ (a) anatase (tetragonal), (b) . . . (s. f).* ResearchGate. https://www.researchgate.net/figure/Crystal-structures-of-TiO-2-a-anatase-tetragonal-b-rutile-tetragonal-and-c_fig1_332113069

Figura 12. *UMSNH.* (s. f.). <https://www.umich.mx/>

García, F.M. 2016. Apuntes para espectrometría de Radiación Ultravioleta Visible (UV/VIS). Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Química. Posgrado en Ciencias Químicas. Toluca, México.

Gavilan, M.C., Avilés, G.B., González, R. 2020. Protocolos diagnóstico-terapéuticos de la AEP: Infectología pediátrica. Gastroenteritis aguda. Disponible en: <https://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/gea.pdf>

González González, M. I., Torres Rojas, T., & Chiroles Rubalcaba*, S. (2003). Calidad microbiológica de aguas costeras en climas tropicales. *Revista electrónica de la Agencia de Medio Ambiente*, (4).

Grimes, C.A. y Mor, G.K. 2009. TiO₂ Nanotube Arrays. Synthesis, Properties and Applications. Springer. 380 pp.

-
- Guarín, C.Y. y Mera, A.C. 2011. Fotocatálisis heterogénea con TiO₂ para el tratamiento de desechos líquidos con presencia del indicador verde de Bromocresol. *Revista de ingenierías*. Universidad de Medellín. Vol. 10, (19). 79-88.
- Herman, J.M. 1999. Heterogeneous photocatalysis: fundamentals and applications to theremoval of various types of aqueous pollutants. *Elsevier*. Vol. 53: 115-129.
<http://dns2.asia.edu.tw/~ysho/YSHO-English/1000%20CE/PDF/Cat%20Tod53,%20115.pdf>
- Irie, H., Washizuka, S., Yoshino, N., Hashimoto, K. (2003). Visible-light induced hydrophilicity on nitrogen-substituted titanium dioxide films. *Chemical Communications*. (11), 1298-1299.
- Kantele, A., Pakkanen, S.H., Sittonen, A., Kartunnen, R., Kantele, J. M. 2012. Live oral typhoid vaccine Salmonella Typhi Ty21a – A surrogate vaccine against non-typhoid salmonella. *Elsevier*. (30). 7238-7245 pp.
- Kim S., Ghafoor K., Lee J., Feng M., Hong J., Lee DU., Park J. 2013. Bacterial inactivation in water, DNA strand breaking, and membrane damage induced by ultraviolet-assisted titanium dioxide photocatalysis. *Water Research*. 47:4403–4411 pp.
- Kohanski, M. A.; Dwyer, D. J.; Collins, J. J. 2010. How Antibiotics Kill Bacteria: From Targets to Networks. *Nature Reviews Microbiology*. 423– 435 pp.
- Kubacka, A., Ferrer, M., Martínez-Arias, A., Fernández-García M. 2008. Ag promotion of TiO₂-anatase disinfection capability: Study of *Escherichia coli* inactivation. *Applied Catalysis B: Environmental*. 84: 87-93.
- Lin, X., Li, J., Ma, S., Liu, G., Yang, K., Tong, M., Lin, D. 2014. Toxicity of TiO₂ Nanoparticles to *Escherichia Coli*: Effects of Particle Size, Crystal Phase and Water Chemistry. *PLoS One.*, Vol. 9 (10): 110-247.
- Lopardo, A.H. 2017. Manual de Microbiología Clínica de la Asociación Argentina de Microbiología. Bacterias de importancia clínica. Volumen 1. Universidad de Buenos Aires. Buenos aires, Argentina.

-
- López Ventura, A.M. 2014. Desinfección fotocatalítica de *E. coli* con TiO₂ soportado en material de bajo costo. Tesis de licenciatura. Universidad del Mar. Oaxaca, México.
- Marín G., R. 2019. Físicoquímica y microbiología de los medios acuáticos: Tratamiento y control de calidad de aguas.
- Matsunaga, T., Tomoda, R., Nakajima, T., Wake, H. 1985. Photoelectrochemical sterilization of microbial cells by semiconductor powders. *Microbiology Letters*. Vol. 29. 211-214 pp.
- Metcalf y Eddy. 1995. Ingeniería de aguas residuales: Tratamiento, vertido y reutilización. McGraw Hill
- Newton, B. A. 1965. Mechanisms of Antibiotic Action. *Annu. Revista de Microbiología*. Vol. 19 (1), 209–240 pp.
- Olmedo, M.T. 2008. Subproductos de la desinfección del agua por el empleo de compuestos de cloro. Efectos sobre la salud. *Higiene y Sanidad Ambiental*. Vol. 8. 335-342 pp.
- Ortiz, O.E. 2013. *Electrodeposición de Ag nanométrico en electrodos de TiO₂ nanoparticulado mediante la técnica de doble pulso de potencial para la elaboración de celdas solares sensibilizadas con mesoporfirina IX*. Tesis de Maestría. CIDETEC. México
- Panáček, A., Kvítek, L., Smékalová, M., Večeřová, R., Kolář, M., Röderová, M., Dyčka, F., Šebela, M., Prucek, R., Tomanec, O., Zbořil, R. 2018. Bacterial Resistance to Silver Nanoparticles and How to Overcome It. *Nat. Nanotechnol.* Vol. 13, (1), 65–71 pp.
- Paredes, J.L. 2010. El uso de la anodización en materiales. Casa del tiempo. 59-65 pp.
- Pham, T., y Lee, B. 2014. Effects of Ag doping on the photocatalytic disinfection of *E. coli* in bioaerosol by Ag-TiO₂/GF under visible light. *Journal of Colloid and Interface Science*. 428: 24-31.

-
- Premkumar, J. (2004). Development of super-hydrophilicity on nitrogen-doped TiO₂ thin film surface by photoelectrochemical method under visible light. *Chemistry of Materials*. Vol. 16, (21), 3980-3981.
- Raffo L. y Ruiz, L. E. 2014. Caracterización de las aguas residuales y la demanda bioquímica de oxígeno industrial. *Revista de investigación Industrial DATA*. Vol. 17, (1). 71-80 pp.
- Ramalho R.S. 1996. Tratamiento de aguas residuales. Editorial Revertè. Barcelona, España.
- Reddy, P.M., Venugopal, A., Subrahmanyam, M. 2007. Hydroxyapatite-supported Ag-TiO₂ as *Escherichia coli* disinfection photocatalyst. *Catalysis and Physical Chemistry Division, Indian Institute of Chemical Technology*. 41: 379-386.
- Rodríguez-Ángeles, G. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Publica de México*. Vol. 44, (5). 464-475 pp.
- Shahbaz HM., Yoo S., Seo B., Ghafoor K., Kim JU., Lee DU., Park J. 2016. Combination of TiO₂-UV Photocatalysis and High Hydrostatic Pressure to Inactivate Bacterial Pathogens and Yeast in Commercial Apple Juice. *Food and Bioprocess*.
- Rodríguez, A.G. 2016. Síntesis y Caracterización de Nanopartículas de TiO₂ Dopadas con Plata Para Desinfección de Aguas Residuales. Tesis de licenciatura. Universidad autónoma de Querétaro. Facultad de Ingeniería.
- Sökmen, M., Candan, F., Sümer, Z. 2001. Disinfection of *E. coli* by the Ag-TiO₂/UV system: lipidperoxidation. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 143: 241-244.
- Sopha, H., Hromadko, L., Nechvilova, K., Macak, J. M. 2015. *Effect of electrolyte age and potential changes on the morphology of TiO₂ nanotubes*. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 759(), 122-128.
- Sotiriou, A. G y Pratsinis S. E. 2013. Engineering nanosilver as an antibacterial, biosensor and bioimaging material. *Europe PMC Funders Group*. Vol. 1, (1). 3-10 pp.

-
- Sproul, W.D. 1996. *Physical vapor deposition tool coatings*. Elsevier. Pp. 1-7.
- Suri, R.P., Thornton, H.M., Muruganandham, M. 2012. Disinfection of water using Pt- and Ag-doped TiO₂ photocatalysts. 33: (13-15).
- Ubonchonlakete, k., Sikong, L., Saito., F. 2012. Photocatalytic disinfection of *P.aeruginosa* bacterial Ag-doped TiO₂ film. Elsevier. 32: 656-662.
- Ullah, H., Ali, S. 2017. Classification of AntiBacterial Agents and Their Functions. In Antibacterial Agents; InTech, Vol. 3, (20).
- Vallejo, W., Díaz-Uribe, C., Navarro, K., Valle, R., William, A. J., Romero, E. 2016. Estudio de la actividad antimicrobiana de películas delgadas de dióxido de titanio modificado con plata. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas*. Vol. 40(154): 69-74.
- Vázquez, R.E. 2020. Síntesis y caracterización de nanopartículas de TiO₂ y TiO₂/Ag y su aplicación para el tratamiento de agua residual. Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico de Culiacán.
- Wang, H., Yang, B., Zhang, W. 2008. Photocatalytic Degradation of Methyl Orange on Y Zeolite Supported TiO₂. *Advanced materials Research*. Vol. 43, 129-135 pp.
- Wang, H., Li, H., Wang, J., Wu, J., Liu, M. 2013. Influence of Applied Voltage on Anodized TiO Nanotube Arrays and Their Performance on Dye Sensitized Solar Cells. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 13(6), 4183–4188.
- Wong, M., Chen, C., Hsieh, C., Hung, S., Sun, D., Chang, H. 2015. Antibacterial property of Ag nanoparticle-impregnated N-doped titania films under visible light. *Scientific Reports*. 5: 1-11.
- Xiaobo, C., Maria, S., Timothy S., Samuel, S. M. 2007. *Fabrication of 10 nm diameter TiO₂ nanotube arrays by titanium anodization.*, 515(24), 8511–8514.
- Yang, G., Yin, H., Liu, w., Yang, Y., Zou, Q., Luo, L., Li, H., Huo, Y., Li, H. 2017. Synergistic Ag/TiO₂-N Photocatalytic System and Its Enhanced Antibacterial

Activity towards *Acinetobacter baumannii*. *Applied Catalysis B: Environmental*.
17: 1-36.