



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**“Inhibición de *E. coli* con nanopartículas de Ag
activadas con UV soportadas en TiO_2 ”.**

TESIS

Para obtener el título de:

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

QUE PRESENTA EL ALUMNO:

Francisco Yudhiel Flores Arévalo

ASESOR:

Dr. Roberto Guerra González

COASESOR:

MC. Roberto Daniel Iñaki Duran Baltazar

Morelia, Michoacán, Agosto del 2021.

Dedicatoria

Esta tesis está dedicada a:

A mis padres Eugenio Flores Proa y Salud Alejandra Arévalo García quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más, gracias por inculcar en mí el ejemplo de esfuerzo y valentía, de no temer las adversidades porque Dios está conmigo siempre.

A mis hermanos Eugenio Flores Arévalo y Karla Stephanie Flores Arévalo por su cariño y apoyo incondicional, durante todo este proceso, por estar conmigo en todo momento gracias. A toda mi familia porque con consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona y de una u otra forma me acompañan en todos mis sueños y metas.

AGRADECIMIENTOS

A LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO

Mediante la división de estudios de licenciatura

De la facultad de Químico Farmacología

Que ha sido la forjadora en el desarrollo de mi conocimiento

A LA FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

Por el apoyo para realizar dichos estudios y procesos dentro de sus laboratorios,
por las facilidades brindadas y el apoyo en los equipos durante mi estancia de
investigación.

AL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES METALÚRGICAS

Por las facilidades brindadas y el apoyo de los equipos

RESUMEN

El presente trabajo fue dirigido a realizar estudios de inhibición con nanopartículas de plata soportadas en dióxido de titanio (Ag/TiO_2) en su desempeño como bactericida de *Escherichia coli*. Los materiales de dióxido de titanio fueron obtenidos mediante dos procesos, síntesis sol-gel asistida por microondas la cual permite llevar a cabo la síntesis de los compuestos en periodos de tiempo relativamente cortos y síntesis hidrotérmica. Las nanopartículas de plata fueron impregnadas sobre las nanopartículas de dióxido de titanio (Ag/TiO_2) para probar su actividad antibacterial. Para la preparación del dióxido de titanio y de las nanopartículas de plata fueron utilizadas, como sales precursoras, propóxido de titanio y nitrato de plata, respectivamente. En ambos casos se empleó etilenglicol como agente reductor.

Como primera etapa el material impregnado se utilizó sin irradiar con energía del espectro UV y como segunda etapa el material se irradió con energía del espectro UV durante una hora antes de iniciar el estudio de inhibición con el objetivo de efectuar un estudio comparativo acerca de la eficiencia del dióxido de titanio en presencia de energía del espectro UV. La caracterización de los materiales se llevó a cabo por difracción de rayos x y microscopia electrónica de barrido (MEB).

El material irradiado con energía del espectro UV fue efectiva a los 90 minutos de la prueba inhibiendo en un 100% la cantidad de bacterias, mientras que el material que no fue expuesto a la energía del espectro UV mostró una efectividad que se prolongó hasta los 240 minutos, inhibiendo en 99% las bacterias demostrando la efectividad del dióxido de titanio como un excelente soporte para las nanopartículas de plata (Ag/TiO_2) inhibidoras del crecimiento de *Escherichia coli*.

Palabras clave: bactericida, dióxido de titanio, hidrotalcita, *E. coli*, sol-gel.

ABSTRACT

The present work was directed to carry out inhibition studies with silver nanoparticles supported on titanium dioxide (Ag / TiO₂) in its performance as an *Escherichia coli* bactericide. The titanium dioxide materials were obtained by means of two processes, microwave-assisted sol-gel synthesis, which allows to carry out the synthesis of the compounds in relatively short periods of time and hydrothermal synthesis. The silver nanoparticles were impregnated on the titaniumdioxide (Ag / TiO₂) nanoparticles to test their antibacterial activity. For the preparation of titanium dioxide and silver nanoparticles, titanium propoxide and silver nitrate, respectively, were used as precursor salts. In both cases, ethylene glycol was used as the reducing agent.

As a first stage, the impregnated material was used without irradiating with energy from the UV spectrum and as a second stage, the material was irradiated with energy from the UV spectrum for one hour before starting the inhibition study in order to carry out a comparative study about the efficiency of titanium dioxide in the presence of energy from the UV spectrum. The characterization of the materials was carried out by x-ray diffraction and scanning electron microscopy (SEM).

The material irradiated with energy from the UV spectrum was effective at 90 minutes of the test, inhibiting the amount of bacteria by 100%, while the material that was not exposed to the energy from the UV spectrum showed an effectiveness that lasted up to 240 minutes, inhibiting the bacteria by 99%, demonstrating the effectiveness of titanium dioxide as an excellent support for silver nanoparticles (Ag / TiO₂) that inhibit the growth of *Escherichia coli*.

Índice

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1 NANOPARTÍCULAS.....	5
2.2 PLATA.....	5
2.2.1 NANOPARTÍCULAS DE PLATA	6
2.2.2 NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y SU ACCIÓN BACTERICIDA	7
2.2.3 EFECTOS SOBRE LA SALUD Y MEDIO AMBIENTE	8
2.3 DIÓXIDO DE TITANIO (TiO ₂).....	9
2.3.1 SÍNTESIS SOL-GEL.....	10
2.3.2 MICROONDAS.....	11
2.3.3 SÍNTESIS HIDROTÉRMICA	14
2.4 BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS	14
2.4.1 ESCHERICHIA COLI	15
2.5 TÉCNICAS PARA LA EVALUACIÓN DE INHIBICIÓN BACTERIANA.....	17
2.5.1 MÉTODO DE DILUCIÓN EN AGAR	17
2.5.2 MÉTODO DE DILUCIÓN EN CALDO	18
3 JUSTIFICACIÓN E HIPOTESIS	20
3.1 JUSTIFICACIÓN.....	20
3.2 HIPOTESIS	20
4 OBJETIVOS.....	21
4.1 OBJETIVO GENERAL	21
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	21
5 DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	22
5.1 SÍNTESIS SOL-GEL DE TiO ₂ ASISTIDA POR MICROONDAS	22
5.2 SÍNTESIS HIDROTÉRMICA DE TiO ₂	24
5.3 IMPREGNACIÓN POR VIA HUMEDA INCIPIENTE	25
5.4 CARACTERIZACIÓN	25
5.4.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB).	26
5.4.2 DIFRACCIÓN DE RAYOS X (DRX).....	27
5.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL.....	28
5.5.1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	28
5.5.2. CRECIMIENTO BACTERIANO EN PRESENCIA DE LOS MATERIALES	32
6 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	33
6.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES	33
6.1.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB).....	34
6.1.2 DIFRACCIÓN DE RAYOS X (DRX).....	38
6.2 EVALUACIÓN ANTIBACTERIAL	38
7 CONCLUSIONES.....	45
BIBLIOGRAFÍA.....	47

1. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud estima que cada año se presentan 500 millones de casos de diarreas en niños menores de cinco años en Asia, África y América Latina. Entre 3 y 4% de estos casos terminan con la muerte (OMS, 1979; Rohdey Northrup, 1976; Barker 1975 y Gwatkin, 1980). Estas enfermedades son el resultado de la pobreza, la ignorancia, la desnutrición y de un saneamiento ambiental deficiente, particularmente de inadecuados sistemas de abastecimiento de agua y disposición de excretas.

Se podrían reducir significativamente enfermedades como el cólera, la tifoidea, la diarrea y muchas otras mediante un abastecimiento de agua y un saneamiento adecuados. El rol del abastecimiento de agua en la mejora de la salud no se limita a aquellas enfermedades que se transmiten a través de la ingestión de agua por medio de comidas o bebidas.

Un suministro adecuado de agua para el baño, el lavado de ropas y de utensilios de cocina, la preparación de alimentos y otros propósitos higiénicos puede tener efectos significativos sobre las enfermedades de los ojos y la piel, las enfermedades transmitidas por ectoparásitos (piojos, sarna y afines), las enfermedades contraídas a través de alimentos y otras, particularmente sobre aquellas controlables mediante el lavado de las manos. (F. Eugene McJunkin, Julio 1982.)

Existen diferentes tipos de tratamientos tales como: los preliminares, primarios, secundarios, terciarios y avanzados. Los tratamientos preliminares y primarios consisten en la remoción de sólidos flotantes y suspendidos, respectivamente. Los secundarios están conformados principalmente por procesos biológicos; los terciarios sirven para dar características potables al agua y los avanzados son aquellos cuyo objetivo es remover los contaminantes que no se eliminaron en las etapas anteriores.

El dióxido de titanio o Titania (TiO_2) es un material semiconductor ampliamente utilizado en la purificación de agua y aire ya que posee actividad fotocatalítica y biocida que permite la degradación de contaminantes orgánica perjudicial y la

eliminación de agentes patógenos como bacterias. Por todo esto, en conjunto con sus excelentes propiedades ópticas el TiO_2 resulta un material de interés para ser aplicado en ambientes sanitarios, interiores de edificios, etc. (H. Chen, et al, 2012.) Con el objeto de mejorar esta velocidad de reacción y la eficiencia fotocatalítica se han abordado distintas estrategias sobre este material como por ejemplo la modificación de la estructura cristalina para la generación de vacancias (A. Nakajima et al, 2001.)

La incorporación de metales nobles a la estructura mejora la actividad fotocatalítica a través de la reducción de la velocidad de recombinación e^-/h^+ , la disminución del band-gap u otros fenómenos asociados a la absorción del plasmón de superficie (P. Christopher et al, 2011).

Varios autores incorporaron nanopartículas de Ag en recubrimientos de TiO_2 (en fase anatasa), para mejorar la actividad fotocatalítica y biocida, ya que estas alteran la estructura de la Titania mejorando la eficiencia de la separación de pares electrón-agujero fotogenerados y mejorando la eficiencia en la transferencia de los portadores de carga al material circundante.

La propiedad antimicrobiana de la plata es bien conocida en biología y está relacionada con la cantidad y la velocidad de liberación de sus cationes. En su estado metálico es inerte pero reacciona con la humedad en la piel y el fluido de las heridas y se ioniza. La plata ionizada es altamente reactiva, ya que se une a proteínas de los tejidos y provoca cambios estructurales en la pared celular bacteriana y la membrana nuclear que lleva a la distorsión y la muerte celular. La plata también se une al ADN y ARN bacteriano y los desnatura inhibiendo la replicación bacteriana.

Las bacterias coliformes son un grupo heterogéneo compuesto por un consorcio de bacterias Gram negativas principalmente. Existe poca evidencia que indique que estas bacterias coliformes pertenezcan a un solo género taxonómico. La falta de certeza en cuanto a su filiación taxonómica y la imprecisa correlación entre los métodos recomendados para la detección de coliformes han presentado problemas. El primero, es que *Escherichia coli* es aceptada como bacteria coliforme, la especie contiene variantes que no producen gas de la lactosa o lo

hacen después de 48 horas, por lo que no se les identifica por medio de esta técnica. Segundo, la capacidad de fermentar la lactosa está frecuentemente asociada a genes localizados en plásmidos. Estos determinantes extracromosomales son fácilmente transferidos entre otras bacterias Gram negativas no relacionadas a las coliformes, que pueden, en consecuencia, ser recuperadas en la etapa inicial del análisis. No obstante en la práctica, la técnica ha demostrado su efectividad. (NOM-112-SSA1-1994)

Escherichia coli coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se considera de flora normal, pero hay descritos seis grupos de *E. coli* productora de diarrea: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y de adherencia difusa (DAEC). (Guadalupe Rodríguez, 2002.)

La *Escherichia coli* es una bacteria que se encuentra presente en algunos medios nutritivos, principalmente provenientes de las aguas de riego. La *Escherichia coli* puede causar algunas enfermedades en los humanos entre las que destacan la diarrea y la disentería. Esta bacteria puede eliminarse con distintos antibacteriales cuyas eficiencias dependen de sus propiedades fisicoquímicas (I. Chopra, 2007.)

Teniendo en cuenta lo anterior, en este trabajo se planteó la síntesis de dióxido de titanio en dos formas (nano barras y nano esferas) para observar la sinergia con la impregnación de nanopartículas de plata a ambas formas para evaluar su actividad inhibitoria de la bacteria *E. coli*.

2. ANTECEDENTES

En los últimos años, los problemas de contaminación han adquirido tal magnitud y diversidad que la sociedad ha ido tomando cada vez con mayor conciencia de los riesgos actuales, y más aún, de los potenciales. Como resultado de la presión social generada, quienes toman las decisiones muestran una creciente voluntad política para resolver los problemas. Ahora, es necesario que especialistas sólidamente formados les ofrezcan soluciones realistas.

Otro elemento para desarrollar soluciones, que tal vez sea el más importante, es contar con un número suficiente de profesionales de la ingeniería, biología, economía y otras disciplinas especializados en ingeniería ambiental.

La situación es aún más desalentadora para el saneamiento. Según las estadísticas recopiladas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), las áreas rurales de África, Asia y América Latina reciben un servicio muy deficiente, sólo uno de cada cinco pobladores tiene acceso a agua segura.

Muchas enfermedades se transmiten por vía "fecal-oral" o "ano-a-boca". Las fuentes de agua potable son contaminadas por excretas humanas (o en algunas enfermedades "zoonóticas" por excretas de animales) evacuadas por alguien con una infección. Esa persona puede estar enferma o ser un "portador". Un portador hospeda dentro de su cuerpo los organismos patógenos sin manifestar síntomas. Frecuentemente, los portadores son más importantes en la transmisión que las personas realmente enfermas.

La mayoría de las enfermedades de vía fecal-oral se manifiestan en el tracto intestinal, es decir, son "enfermedades entéricas". El síndrome más frecuente es la diarrea, es decir, deposiciones sueltas frecuentes. (F. Eugene McJunkin, 1988).

El análisis para la evaluación de la calidad biológica del agua consiste, generalmente, en la determinación de indicadores bacteriológicos y no de organismos patógenos como tales. Tradicionalmente, los grupos de bacterias considerados como indicadores, son coliformes totales y coliformes fecales. El indicador ideal es el que se encuentra presente cuando existen bacterias patógenas de origen fecal y cuyo número está relacionado directamente con el

grado de contaminación. El indicador tradicional de la calidad microbiológica son las bacterias del grupo de las coliformes fecales, especialmente *Escherichia coli*. Los coliformes fecales están estrechamente relacionados con la probabilidad de encontrar patógenos excretados, mientras que los miembros del grupo coliforme total están ampliamente distribuidos en la naturaleza, en comparación con su presencia en el intestino humano y en el de animales de sangre caliente; presenta poco significado sanitario en aguas residuales (Jiménez Cisneros Blanca, 2001).

2.1 NANOPARTÍCULAS

El interés sobre especies químicas de tamaño nanométrico es una de las áreas de trabajo más importantes de la investigación en química debido, fundamentalmente, a la gran variedad de nuevas propiedades y potenciales aplicaciones que se pueden explotar en diversos campos. (A. Müller et al, 2004.)

Las nanopartículas de metales, de óxidos metálicos o de compuestos basados en metales muestran interesantes propiedades biológicas, ópticas, magnéticas, electrónicas, catalíticas, etc. que, en general, se relacionan con el tamaño y la forma de los nuevos materiales y pueden ser interesantes desde el punto de vista de su aplicación práctica. Así, las propiedades únicas que muestran las nanopartículas metálicas provienen de la alta relación superficie: volumen, del confinamiento cuántico del movimiento electrónico en nanopartículas semiconductoras, de la resonancia de plasmones superficiales en algunas partículas metálicas o del superparamagnetismo en nanomateriales magnéticos. (C. Burda et al, 2005).

2.2 PLATA

La plata ha sido empleada durante miles de años como metal precioso por el ser humano en aplicaciones tan dispares como joyería, utensilios, moneda, fotografía o explosivos. De todos estos usos, uno de los más importantes es su empleo como agente desinfectante con fines higiénicos y médicos.

Así, ya desde la antigüedad se empleaban vasijas de plata para almacenar agua o vino ya que se consideraba que preservaba sus condiciones. También Hipócrates, padre de la medicina moderna, describió el empleo de polvo de plata para su aplicación en la curación de heridas y en el tratamiento de úlceras. En los siglos XVII y XVIII se empleó nitrato de plata para el tratamiento de úlceras y su actividad antimicrobiana se estableció en el siglo XIX. Sin embargo, después de la introducción de los antibióticos en 1940 el uso de las sales de plata disminuyó. Posteriormente, se han empleado sales y compuestos de plata en diferentes campos biomédicos, especialmente en el tratamiento de quemaduras. (H. J. Klasen, Burns, 2000).

2.2.1 NANOPARTÍCULAS DE PLATA

En el caso de las nanopartículas de plata los primeros métodos descritos son el método Lee-Meisel (P. C. Lee et al, 1982) y el método Creighton (J. A. Creighton et al, 1979). El primero de ellos consiste en una variación del método Turkevich para la obtención de nanopartículas de oro, en el que se emplea AgNO_3 en lugar de HAuCl_4 como precursor metálico y citrato de sodio como agente reductor.

En el método Lee-Meisel se obtienen nanopartículas de plata con una distribución amplia de tamaño de partícula (polidispersas). El método Creighton consiste en la reducción de AgNO_3 con el agente reductor NaBH_4 . Este método es el más popular en la actualidad y da lugar a la obtención de nanopartículas de plata de aproximadamente 10 nm y con una distribución estrecha de tamaños (monodispersas).

Las propiedades biomédicas de las nanopartículas de plata constituyen también un campo de investigación de gran relevancia. La mayoría de las publicaciones respecto a este se basan en las propiedades antimicrobianas de las nanopartículas de plata, aunque existen también estudios sobre sus propiedades antivirales, fungicidas o de cicatrización. Evidentemente, de manera paralela al estudio de estas propiedades se están desarrollando multitud de aplicaciones prácticas. (L. S. Nair, C. T. Laurencin, 2007).

2.2.2 NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y SU ACCIÓN BACTERICIDA

En estudios realizados en la actualidad se ha establecido la plata como "oligodinámica" debido a su capacidad para producir un efecto bactericida a concentraciones muy bajas. Esta característica de los iones Ag^+ se debe a su gran reactividad frente a sustancias como proteínas, enzimas, ADN, ARN, etc. debido a las interacciones que se producen frente a grupos funcionales de tipo tiol, carboxilato, fosfato, hidroxilo, imidazol, indol o amina. Esta interacción se puede producir de manera sencilla o combinada lo que puede provocar una serie de eventos que interfieren en los procesos microbianos. (Miguel monge, 2009).

El efecto bactericida de las nanopartículas de plata se conoce también desde hace tiempo pero el mecanismo de acción de las mismas se ha estudiado recientemente, aunque sigue sin conocerse completamente. El modo de interacción posible entre las nanopartículas de plata y diferentes bacterias gram-negativas ha sido estudiado en profundidad empleando la técnica High Angle Annular Dark Field (HAADF) Scanning Electron Transmission Microscopy (STEM) que permite observar las imágenes a escala nanométrica y con un alto contraste.

La figura 1 muestra un esquema de la interacción de las nanopartículas de plata con una bacteria *E. Coli*. Las nanopartículas aparecen unidas a la membrana celular de las bacterias provocando modificaciones en la permeabilidad y en la respiración de la bacteria.

Los autores proponen que, además, las nanopartículas de plata de tamaño tan pequeño pueden penetrar en el interior de la bacteria dañando compuestos que poseen grupos funcionales basados en azufre o fósforo, como por ejemplo el ADN. Finalmente, como efecto complementario a la acción bactericida, las nanopartículas de plata desprenden de su superficie iones Ag^+ que contribuyen al efecto bactericida del mismo modo que los iones Ag^+ procedentes de las sales de plata. Las nanopartículas desestabilizan la membrana externa de las bacterias *E. coli*, colapsan el potencial de membrana plasmática y merman el nivel de ATP intracelular de un modo similar al de los iones Ag^+ .

También se observa que, mientras que los iones de plata procedentes de la sal AgNO_3 producen un efecto bactericida empleando concentraciones a nivel micromolar, las nanopartículas de plata muestran un comportamiento bactericida a concentraciones a nivel nanomolar. Las nanopartículas de plata con una superficie parcialmente oxidada podrían ser transportadores de iones Ag^+ quimisorbidos en cantidades suficientes como para producir un efecto bactericida, mientras que las nanopartículas de plata sintetizadas bajo atmósfera de nitrógeno no presentan actividad bactericida. (C. N. Lok et al, 2007).

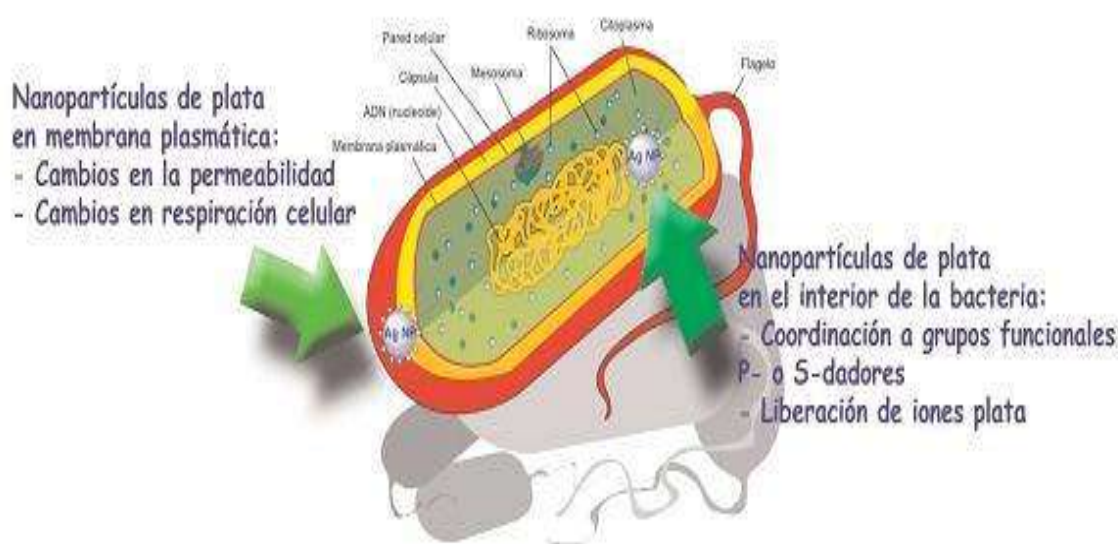


FIGURA 1 Esquema de la actuación de las nanopartículas de plata sobre una bacteria

2.2.3 EFECTOS SOBRE LA SALUD Y MEDIO AMBIENTE

Exceptuando la enfermedad argiria (cambio de color de la piel por exposición continuada a la plata), la plata es relativamente no tóxica para las células de los mamíferos.

Las nanopartículas de plata poseen propiedades diferentes a la plata en estado masivo y, por tanto, es necesario investigar sobre las implicaciones toxicológicas que conllevan su empleo, especialmente en el caso del desarrollo de aplicaciones de uso cotidiano de las nanopartículas. (X. Chen, H. J. Schluesener, 2007).

Recientemente se ha llevado a cabo una revisión sobre los modos de interacción de las nanopartículas de plata con los tejidos humanos y las rutas principales de exposición (sistema respiratorio, piel, tracto intestinal y otros tejidos). En estos estudios se pone de manifiesto que las nanopartículas de plata pueden presentar citotoxicidad a través de la interacción de las nanopartículas con proteínas y enzimas a nivel intracelular. Cuando se usan en cantidades razonables, no tienen efectos negativos en el cuerpo humano.

Otro aspecto de gran interés es el impacto que las nanopartículas en general y, las de plata en particular, podrán generar en el futuro sobre el medio ambiente. El empleo de nanopartículas de plata en aplicaciones cotidianas como, por ejemplo, en textiles o electrodomésticos, puede producir un efecto de aumento de concentración de nanopartículas en aguas residuales. Esta situación choca frontalmente con el empleo de bacterias nitrificantes en la depuración de aguas residuales ya que el aumento de la concentración de nanopartículas de plata produciría un efecto bactericida sobre estas bacterias beneficiosas disminuyendo su capacidad. (O. Choi et al, 2008).

2.3 DIÓXIDO DE TITANIO (TiO_2)

El TiO_2 es un óxido cerámico semiconductor con propiedades fotocatalíticas que presenta polimorfismo con tres fases cristalinas: Anatasa (tetragonal), Rutilo (tetragonal) y Broquita (ortorrómbica); cada fase con propiedades físicas diferentes, las cuales presentan diferente banda prohibida y actividad química, en la cual la fase anatasa siempre se ha encontrado como mejor fotocatalizador. (Marinas A. et al, 2001).

La fotocatálisis heterogénea, específicamente con TiO_2 , ha atraído mucha atención por sus múltiples aplicaciones ambientales, ya que el TiO_2 tiene alta estabilidad química y no es tóxico; además la fotocatálisis heterogénea no es selectiva y puede tratar mezclas complejas de contaminantes.

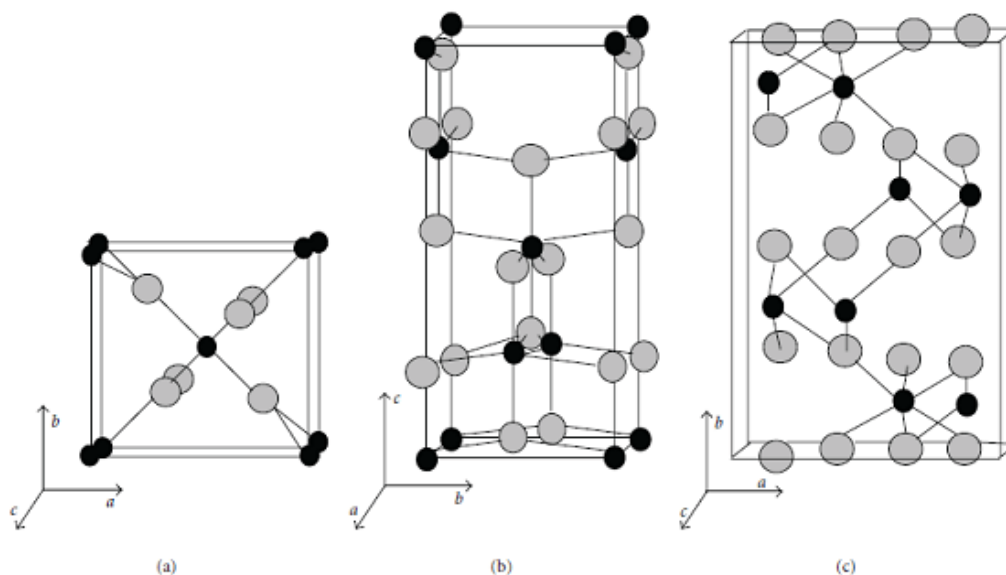


FIGURA 2 Estructuras cristalinas del TiO_2 a) Rutilo, b) Anatasa y c) Broquita (Jin-Chung, Sze-Mun., 2012).

El TiO_2 tiene un sinfín de aplicaciones fotocatalíticas, por ejemplo:

- Alta actividad biocida. (Barajas-Ledesma et al., 2009).
- Películas con propiedades de autolimpieza (Stamate, M. Lazar, G. 2007).
- Degradación de compuestos orgánicos. (Contreras, R; García, R., 2009).
- Purificación de aire. (Ao, C; Lee, S. 2004).

La seria desventaja de la fotocatalisis heterogénea con TiO_2 es que puede ser usado como fotocatalizador sólo con radiación UV ($\lambda < 387 \text{ nm}$).

2.3.1 SÍNTESIS SOL-GEL

El método más comúnmente utilizado es el sol-gel, es el más exitoso en la síntesis de nanopartículas de TiO_2 porque permite controlar el tamaño de partícula por simples variaciones en las condiciones experimentales, como la velocidad de hidrólisis y los precursores. El método sol-gel consiste, de manera general, en la preparación de un sol, gelación del sol y remoción del solvente. (Burda, C; Qiu, X. 2007).

2.3.2 MICROONDAS

La utilización de radiación microondas para la síntesis de sólidos inorgánicos presenta grandes beneficios: ahorro energético, tiempos cortos de procesamiento, mayor rendimiento, procedimiento económico y amigable con el medio ambiente (H.M Kingston y col., 1997). En un proceso de síntesis por microondas existe un perfil inverso de temperatura comparado con los métodos convencionales: el calentamiento ocurre por conversión en lugar de por transferencia de energía.

El fotón de microondas corresponde en promedio a 2.45 GHz, energía cercana a 0.0016 eV. Las microondas son ondas electromagnéticas compuestas de un campo eléctrico y otro magnético. Para propósitos relacionados con el calentamiento con microondas, el componente eléctrico es el importante y para el caso de los materiales magnéticos las interacciones del campo magnético también tienen relevancia (Adán, D. 2008).

Existen dos efectos principales de la irradiación con microondas:

- Efectos térmicos resultado de la polarización dipolar y conducción iónica.
- Efectos electrostáticos polares que llevan a interacciones dipolo-dipolo entre las moléculas dipolares y las cargas del campo eléctrico. Este fenómeno es el origen de efectos no térmicos específicos de microondas.

Los componentes eléctricos provocan calentamiento por dos mecanismos: polarización dipolar y conducción iónica.

La interacción del campo eléctrico con moléculas polares es llamada mecanismo de polarización dipolar. Cuando son expuestas a frecuencias de microondas, los dipolos moleculares se alinean con respecto al campo eléctrico aplicado. A medida que el campo eléctrico oscila, el campo dipolar intenta seguir estas oscilaciones y hay pérdida de energía en forma de calor a través de la fricción molecular. La cantidad de calor generado por este proceso es directamente proporcional con la habilidad de la molécula de alinearse con la frecuencia del campo aplicado. Si el dipolo no tiene suficiente tiempo para realinear o la reorientación es demasiado lenta no ocurre calentamiento.

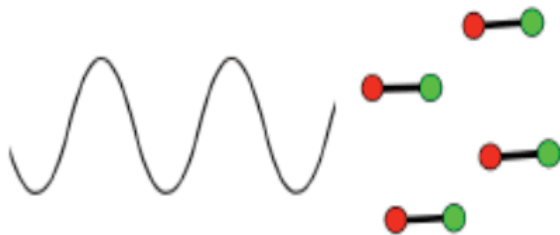


FIGURA 3 Interacción dipolar

El segundo mecanismo de generación de calor es la conducción iónica, en la cual los iones oscilan de abajo a arriba por la influencia del componente eléctrico de la irradiación de microondas. Estos colisionan con moléculas y átomos vecinos causando agitación o movimiento, creando calor. El principio de conductividad es un efecto más fuerte que el mecanismo de rotación dipolar con respecto a la capacidad generadora de calor. Es por esto que un medio que contiene iones es calentado más eficientemente por microondas que solamente usando solvente polares (Adán, D. 2008).

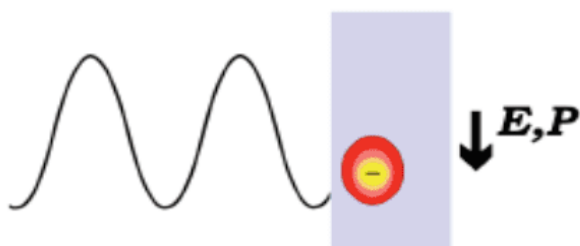


Figura 4 Conducción Iónica

Existen tres fenómenos que mejoran los procesos asistidos por microondas con respecto a los fenómenos térmicos convencionales.

1. Efectos térmicos: en la mayoría de los casos la razón de la mejora en de los procesos químicos es meramente un efecto térmico. Esto significa que la alta temperatura de reacción adquirida rápidamente bajo irradiación de microondas de materiales polares provoca un incremento en la constante de reacción.
2. Efectos térmicos específicos de microondas: Además de los efectos térmicos, hay efectos de microondas que son causados por la naturaleza única del

calentamiento dieléctrico por microondas. Estos efectos deben ser definidos como aceleraciones de transformaciones químicas en microondas que no se puede lograr o duplicar por calentamiento convencional.

2.1. Efecto de supercalentamiento del solvente. El calentamiento mediante micro ondas de líquidos hace que su punto de ebullición esté por arriba que su punto de ebullición a presión atmosférica. Este efecto es debido a que la energía irradiada se disipa por todo el volumen del solvente y no existe una interface líquido-gas para que se libere la energía mediante la ebullición del líquido.

2.2. Efecto de pared: mediante calentamiento por microondas la superficie de la pared del reactor generalmente no se calienta debido a que la energía es disipada en todo el volumen de la mezcla de reacción.

Sin embargo, la temperatura en el interior de la pared del reactor es menor que la del líquido.

2.3. Calentamiento volumétrico: otro fenómeno característico del calentamiento por microondas es el rápido y prácticamente sin gradientes de temperatura calentamiento por toda la mezcla de reacción.

2.4. Calentamiento selectivo heterogéneo: si una muestra contiene más de un componente, solo aquella que acopla con las microondas es calentada selectivamente.

3. Efectos no térmicos específicos de microondas: resultado de la interacción del campo eléctrico con moléculas específicas en el medio de reacción y el efecto electrostático polar.

Incremento en el factor A de la ecuación de Arrhenius: la ecuación de Arrhenius:

$$k = A e^{\left(\frac{-E_a}{RT}\right)} \quad [\text{ecuación 2}]$$

Dónde:

k = constante cinética de reacción.

A = factor pre exponencial o de frecuencia.

E_a = energía de activación.

R = constante universal de los gases.

T = temperatura absoluta.

El factor A pre-exponencial que representa la probabilidad de un impacto molecular. El número de eventos de colisiones puede verse afectado por la orientación de las moléculas polares involucradas en la reacción. Dado que este factor depende de la frecuencia de las vibraciones de los átomos en la interface de reacción se puede afirmar que el campo de microondas influye en este.

2.3.3 SÍNTESIS HIDROTÉRMICA

Los procesos hidrotérmicos se pueden definir como cualquier reacción química heterogénea en la presencia de un solvente (acuoso o no acuoso) que se realiza por arriba de la temperatura ambiente y a una presión mayor a 1 atm en un sistema cerrado. (Byrappa, K; Adschiri, T., 2007)

El tratamiento hidrotérmico tiene varias ventajas: la obtención de un producto altamente cristalino y homogéneo a una temperatura relativamente baja ($< 150^{\circ}\text{C}$); esto favorece la baja aglomeración entre partículas, un homogéneo tamaño de partícula y el control de la morfología de la partícula; también ofrece una composición uniforme, partículas monodispersadas y control en la forma y en el tamaño de las partículas.

2.4 BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS

Las bacterias forman el grupo de microorganismos más importante y son indispensables para el ciclo de nutrimentos de un ecosistema. Las bacterias patógenas son las causantes de enfermedades. Son organismos microscópicos unicelulares, se les encuentra en el agua residual, el suelo y el aire, la leche, en plantas (frutas y vegetación), animales y humanos (piel y tracto intestinal). Se reproducen por fisión binaria y se caracterizan por su forma, tamaño, estructura y disposición celular. Las bacterias tienen una de tres formas : esférica (cocos), cilíndrica o con aspecto de bastón (bacilos) y espiral

(espirilos). Las células bacterianas se pueden acomodar en grupos tales como pares, racimos y cadenas. (J.P. M. T. Madigan, et all, 2004).

La clasificación de las bacterias según los manuales de Bergey son cuatro categorías; eubacterias gram negativas, eubacterias gram positivas, micoplasmas y arqueobacterias.

Las bacterias Grampositivas, el peptidoglucano está inmerso en una matriz que representa el 20-60 % de la pared celular, su matriz está compuesta por polímeros aniónicos: ácidos teicoicos, ácidos lipoteicoicos y ácidos teicurónicos que suministran cargas negativas, son receptores para bacteriofagos y tienen capacidades antigénicas, son el antígeno O somático.

Las bacterias Gram negativas presentan una membrana externa y periplasma donde se sitúa el peptidoglucano, la membrana externa es una bicapa lipoproteica con proteínas integrales, altamente asimétricas: la lámina externa contiene 60% de proteínas y 40 % de lipopolisacárido (LPS) que es una molécula exclusiva de Gram negativas.

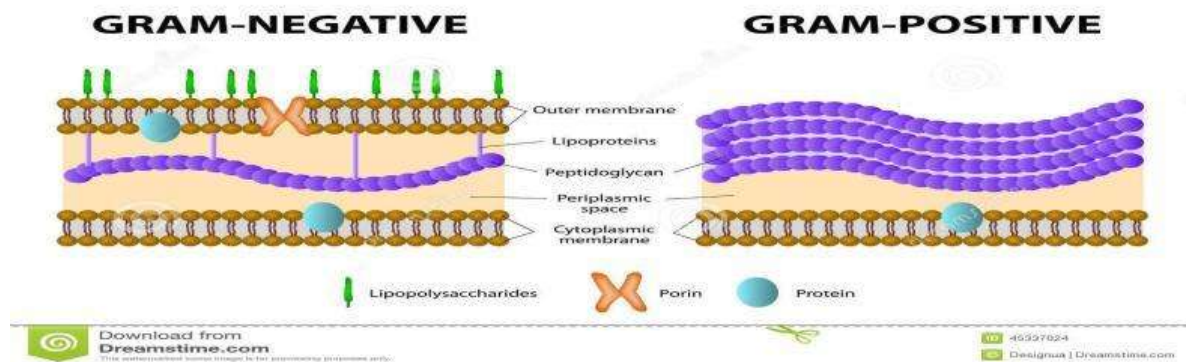


FIGURA 5 Pared celular de las bacterias gram-negativas y gram-positivas.

2.4.1 *ESCHERICHIA COLI*

Escherichia coli es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae, tribu Escherichia, cuyas principales características bioquímicas se indican en el cuadro I:

Cuadro I
IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE ESCHERICHIA COLI

<i>Prueba bioquímica</i>	<i>% de positividad</i>
Oxidasa	0
Producción de indol	98
Rojo de metilo	99
Voges-Proskauer	0
Citrato de Simmons	1
H ₂ S (TSI)	1
Hidrólisis de urea	1
Utilización de malonato	0
Acido de glucosa	100
Gas de glucosa	95
Fenilalanina desaminasa	0
Lisina descarboxilasa	90
Arginina dihidrolasa	17
Ornitina descarboxilasa	65
Movilidad a 36 °C	95
Hidrólisis de gelatina a 22 °C	0
KCN crecimiento en	3
Fermentación de lactosa	95
Fermentación de la sacarosa	50
Fermentación de D-manitol	98
Fermentación de D-sorbitol	94
Fermentación de mucato	95
Fermentación de dulcitol	60
Fermentación de salicina	40
Fermentación de adonitol	5
Fermentación de Inositol	1
Fermentación de L-arabinosa	99
Fermentación de la rafinosa	50
Fermentación de L-ramnosa	80
Fermentación de maltosa	95
Fermentación de D-xilosa	95
Fermentación de trealosa	98
Fermentación de celobiosa	2
Fermentación de α -metil-D glucósido	0
Fermentación de eritritol	0
Hidrólisis de la esculina	35
Fermentación de melobiosa	75
Fermentación de D-arabitol	5
Fermentación de D-manosa	98
Fermentación de glicerol	75
Nitrato a nítrito	100
Tartrato de Jordán	95
Utilización de Acetato	90
Lipasa (aceite de malz)	0
DNasa a 25 °C	0
ONPG	95

Modificado de: Farmer III JP

Este microorganismo presenta diferentes factores de virulencia que son responsables de una amplia gama de enfermedades diarreicas. (J.P. Nataro, J.B. Kaper, 1998). Se encuentra generalmente en los intestinos animales, por cual resulta fácil que se deposite en aguas negras, las cuales son llevadas a medios nutritivos, principalmente provenientes de las aguas de riego. La *E. coli* puede causar algunas enfermedades en los humanos entre las que destacan la diarrea y la disentería. Se encuentra en los intestinos de la mayor parte de los mamíferos sanos, es el principal organismo anaerobio facultativo del sistema digestivo. En individuos sanos; es decir, si la bacteria no adquiere elementos genéticos que codifican factores virulentos, la bacteria actúa como un comensal formando parte de la flora intestinal ayudando así a la absorción de nutrientes. (M. en C. Guadalupe Rodríguez-Ángeles 2002).

2.5 TÉCNICAS PARA LA EVALUACIÓN DE INHIBICIÓN BACTERIANA

La evaluación de las propiedades de los materiales con potencial antimicrobiano se puede hacer, tanto de manera cualitativa, como cuantitativa. En la evaluación se utilizan microorganismos modelo y se usan diferentes métodos: determinación de la concentración mínima inhibitoria, determinación de la concentración mínima bactericida, método de difusión en disco, método de inhibición del crecimiento, procedimiento del conteo de colonias, prueba del halo de inhibición, método de dilución en agar o en caldo, método turbidimétrico y el método de microdilución. En esta investigación se realizaron las siguientes técnicas para evaluar las propiedades de los materiales.

2.5.1 MÉTODO DE DILUCIÓN EN AGAR

El antibiograma disco-placa es uno de los métodos que el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los agentes antimicrobianos. El antibiograma disco-placa consiste en depositar, en la superficie de agar de una placa de petri

previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde hacia el agar radialmente formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición. La concentración de antibiótico en la interface formada entre las bacterias en crecimiento y las bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se aproxima a la concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenida por métodos de dilución. Sin embargo, los métodos disco-placa no permiten una lectura directa del valor de la CMI. (A.W. Bauer et al, 1966).

2.5.2 MÉTODO DE DILUCIÓN EN CALDO

En la dilución en caldo se colocan concentraciones decrecientes del agente antimicrobiano, generalmente diluciones 1:2 en tubos con un caldo de cultivo que sostenga el desarrollo del microorganismo. El NCCLS recomienda, para la mayoría de los microorganismos, utilizar caldo Mueller-Hinton, al que se añadirán los suplementos necesarios para asegurar el crecimiento de organismos exigentes. Se emplea por cada combinación microorganismo/antimicrobiano una batería de tubos. Regularmente se prepara la batería de tubos con 1mL de medio estéril sin antimicrobiano. Al primero de ellos se añade 1 ml de la solución inicial del tubo de antimicrobiano hasta conseguir la concentración más alta a estudiar (teniendo en cuenta que este primer paso supone la dilución a la mitad de la solución madre, y que una vez inoculados los tubos, con 1 mL de inóculo, se diluirá nuevamente la concentración del antimicrobiano a la mitad). Tras mezclar adecuadamente, se pasa 1 mL al siguiente tubo; el proceso se repite tantas veces como diluciones se quieran estudiar, eliminando del último tubo de la serie 1 mL de medio con agente antimicrobiano con objeto de mantener el volumen final igual a 1 mL. Para cada paso de dilución se debe emplear una pipeta diferente. La

serie de tubos se completa con uno de control sin agente antimicrobiano que solamente tiene 1 mL de caldo. (M07-A9, 2012).

3 JUSTIFICACIÓN E HIPOTESIS

3.1 JUSTIFICACIÓN

Dada la virulencia que caracteriza a la bacteria *Escherichia coli* responsable de una amplia gama de enfermedades gastrointestinales es necesario darle un tratamiento para inhibirlos de aguas residuales, de riego y potable; además de alimentos y bebidas. Por presentarse en heces fecales de animales de sangre caliente tiende a propagarse de una forma inadecuada y de ahí la necesidad de encontrar nuevas alternativas efectivas para su inhibición.

Las nanopartículas de plata son uno de los métodos más eficientes para la inhibición de bacterias y al soportarse en un material de características mesoporosas permite la recuperación del material sin la necesidad de perderlo evitando gastos innecesarios y costosos.

3.2 HIPOTESIS

Es posible inhibir a la bacteria *Escherichia coli* empleando nanopartículas de plata soportadas en nanopartículas de dióxido de titanio (Ag/TiO_2), obtenidas a partir de dos métodos de síntesis: método sol-gel asistido por microondas y síntesis hidrotérmica impregnadas por vía húmeda incipiente, conservando las propiedades bactericidas de las nanopartículas de plata. Los sistemas nanoestructurados Ag/TiO_2 promoverán eficientemente la inhibición de la bacteria y recuperación de los materiales.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar la inhibición de la bacteria *Escherichia coli* empleando nanopartículas de plata soportadas en materiales mesoporosos de TiO_2 , obtenidos mediante dos métodos de síntesis: síntesis sol-gel asistida por microondas y síntesis hidrotérmica.

4.2 Objetivos particulares

- Estudiar la efectividad para soportar nanopartículas de plata en dióxido de titanio por dos métodos de obtención: síntesis hidrotérmica y síntesis sol-gel asistida por microondas.
- Estudiar la efectividad en las dos formas de síntesis del dióxido de titanio soportando las nanopartículas de plata a diferentes concentraciones inhibiendo a la bacteria *Escherichia coli*.
- Estudiar el efecto de la forma y tamaño de las nanopartículas de plata en el soporte a diferentes concentraciones.
- Evaluar el efecto bactericida del Ag/TiO_2 en presencia de energía del espectro UV con respecto al material sin presencia de la energía del espectro UV.

5 DESARROLLO EXPERIMENTAL

En este capítulo se describen los métodos de preparación para el dióxido de titanio utilizados como soporte de nanopartículas de plata, así como el método de impregnación de las nanopartículas de plata. De igual forma se describen las técnicas de caracterización de los materiales.

La composición de los materiales de TiO_2 fue pensada bajo la premisa que las nanopartículas de plata pudieran adherirse fácilmente y fueran compatibles. Además de que ya se han realizado experimentos con estos materiales para inhibir microorganismos. Esto obedece a la necesidad de saber qué cantidad de material es idóneo para la inhibición y cuál es la mejor ruta de síntesis de TiO_2 para ser utilizado como soporte. Los materiales de dióxido de titanio fueron preparados por los métodos síntesis sol-gel asistida por microondas y síntesis hidrotérmica para ser usados como soporte de nanopartículas de plata impregnadas a través del método de vía húmeda incipiente.

La síntesis e impregnación de los materiales se realizaron en los laboratorios de posgrado de ingeniería química de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo la supervisión del Dr. J. Ricardo Rangel Segura.

5.1 SÍNTESIS SOL-GEL DE TiO_2 ASISTIDA POR MICROONDAS

Se comienza con la disolución de la sal precursora de propóxido de titanio en agua, calentando a una temperatura de 60°C , con agitación constante durante 2 horas, mientras que en otro vaso de precipitado, se tiene etilenglicol en agua, bajo las mismas condiciones, la función de etilenglicol será como agente gelificante. Una vez cumplido el tiempo y efectuada la hidrólisis, se procede a mezclar las dos soluciones con agitación continua gota a gota. Se lleva al tratamiento asistido por microondas a las siguientes condiciones: 150°C por 20 minutos a 18 atm de presión, 600 watts a una rampa de calentamiento de 5°C . Posteriormente se seca durante 24 horas a $100\text{-}120^\circ\text{C}$; el polvo es macerado suavemente y tamizado, posteriormente se coloca en un crisol, sometiéndose a calcinación durante 4 horas

a 450°C y permitiendo que el material se enfríe en la misma mufla. El siguiente esquema muestra de manera general lo descrito anteriormente.

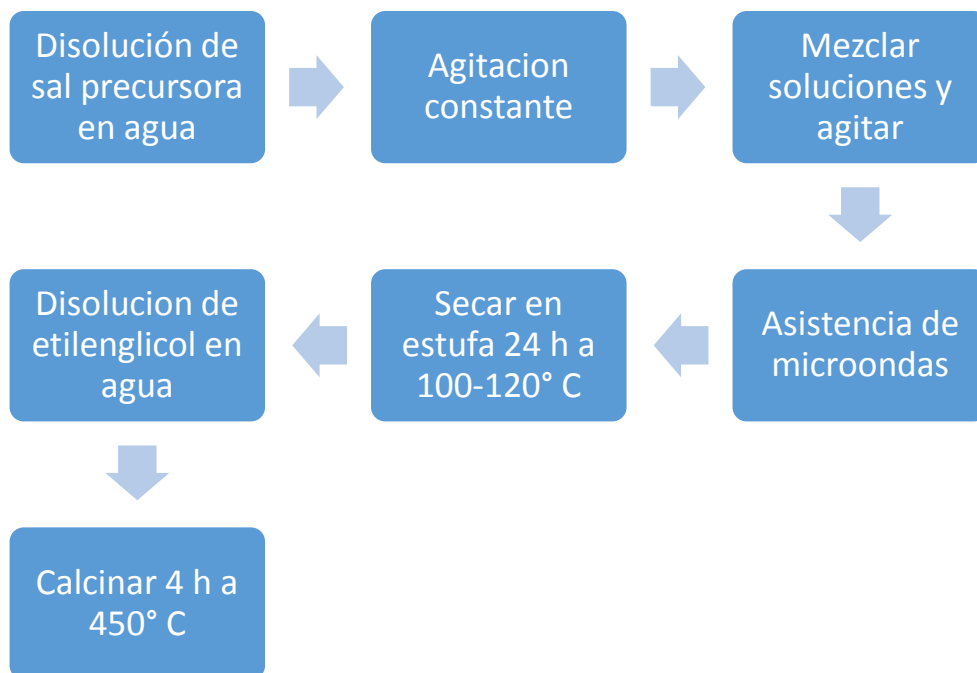


Figura 6 Diagrama general de síntesis sol-gel de TiO_2 .



Figura 7 Reactor de microondas marca Anton Paar modelo Synthos 3000

5.2 SÍNTESIS HIDROTÉRMICA DE TiO_2

Se comienza con la disolución de la sal precursora de propóxido de titanio en 10 mL de agua, calentando a una temperatura de 60°C , con agitación constante hasta disolución, posteriormente se transfiere al reactor con 10 mL de hidróxido de sodio. Posteriormente, se cierra el reactor herméticamente y se lleva a la estufa a una temperatura de 180°C durante 48 horas. Pasadas las 48 horas se retira y se deja atemperar para lavar con agua el pp hasta un pH neutro. Posteriormente, se seca durante 12-24 horas a $100\text{-}120^\circ\text{C}$; el polvo es macerado suavemente y tamizado, posteriormente se coloca en un crisol, sometiéndose a calcinación durante 4 horas a 350°C y permitiendo que el material se enfríe en la misma mufla. El siguiente esquema muestra de manera general lo descrito anteriormente.

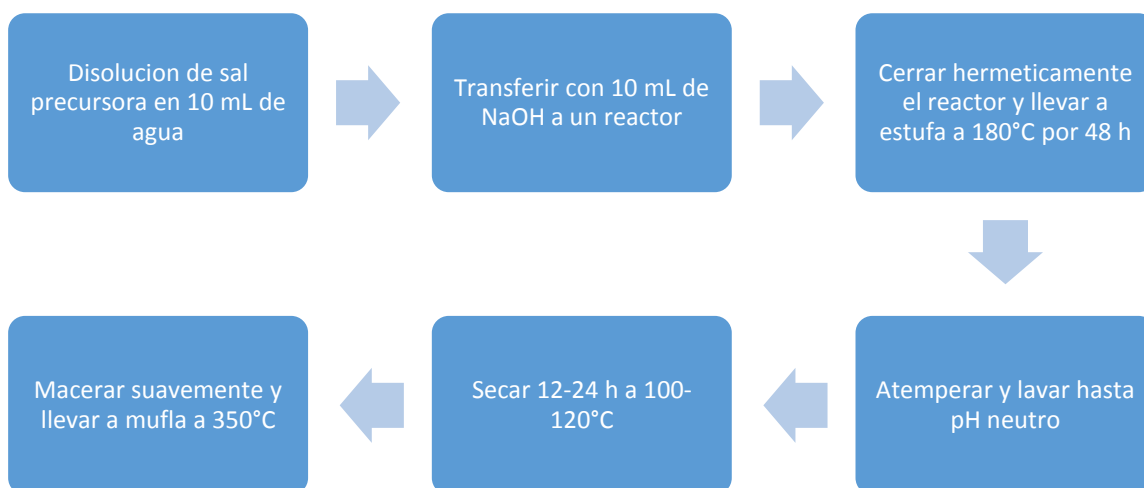
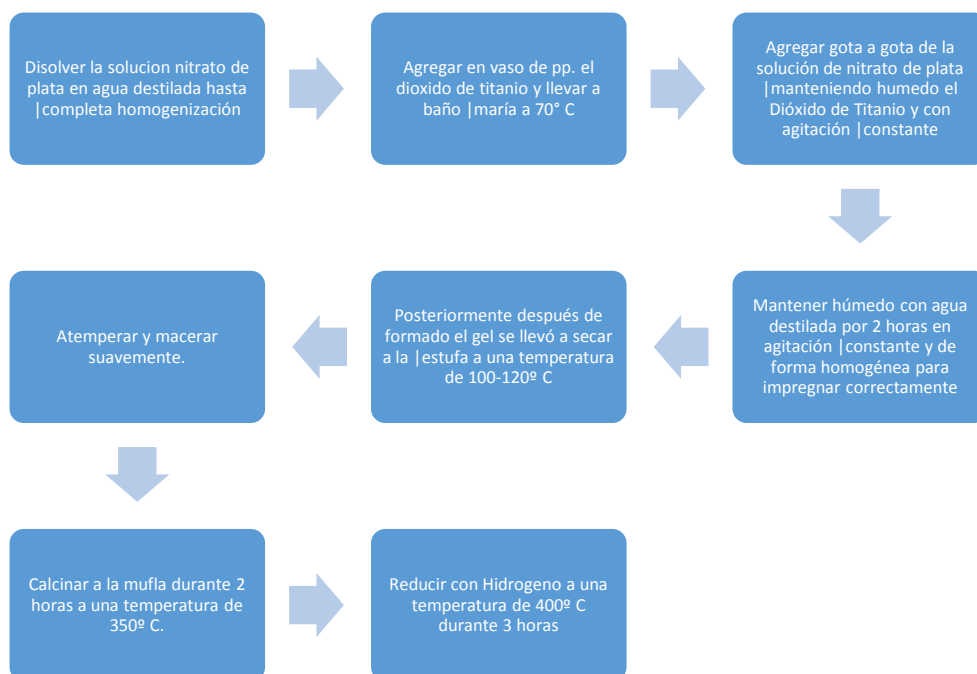


Figura 8 Diagrama general de síntesis hidrotérmica de TiO_2 .

5.3 IMPREGNACIÓN POR VIA HUMEDA INCIPIENTE

Disolver la sal de Nitrato de Plata en agua destilada hasta completa homogenización, mientras en otro vaso de precipitado, el Dióxido de Titanio se llevara a baño maría a una temperatura de 70°C. Posteriormente agregar gota a gota la solución de Nitrato de Plata manteniendo húmedo el Dióxido de Titanio en agitación constante, al momento de terminar la solución de Nitrato de Plata, mantener en humedad constante con agua destilada durante 2 horas y con agitación constante y de forma homogénea para mantener una impregnación total. Pasadas las dos horas después de formado el gel secar en estufa a 100-120°C, macerar suavemente y llevar a sinterizar a la mufla a 350°C por 2 horas, atemperar el crisol y el polvo obtenido será reducido con gas de Hidrogeno por 3 horas a una temperatura de 400°C.



5.4 CARACTERIZACIÓN

A continuación, se presentan las técnicas empleadas en la caracterización de los materiales obtenidos.

5.4.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB).

Las espectroscopias electrónicas (MEB, MET, etc.) se basan en el análisis de la distribución de energía de los electrones emitidos desde la superficie de un sólido, presentando energías características propias que dependen de los tipos de átomos que hay en la superficie y de las interacciones electrónicas que existen entre ellos. La microscopía electrónica es una técnica que permite obtener información local de la muestra objeto de estudio. En un microscopio electrónico de barrido, el haz pasa a través de las lentes condensadoras y objetivos, y es barrido a lo largo de la muestra por las bobinas de barrido, mientras que un detector cuenta el número de electrones secundarios de baja energía emitidos por cada punto de la superficie dando morfología y topografía a la superficie de estudio. Para el análisis se usó un microscopio electrónico de barrido modelo JSM-6400 JEOL Noran Instruments a 15keV y 10^{-6} mmHg.



Figura 9 Microscopio Electrónico de Barrido JSM-6400 JEOL Noran Instruments

Antes de introducir la muestra a analizar se realizó un recubrimiento metálico con cobre para que haya conductividad eléctrica. Una vez metalizadas, las muestras se adhirieron con cinta de carbono en un portamuestras para finalmente ser introducidas en el microscopio.

5.4.2 DIFRACCIÓN DE RAYOS X (DRX)

El método de difracción de rayos-X de polvo cristalino es capaz de suministrar información cualitativa y cuantitativa sobre la composición de las fases cristalinas presentes en una muestra sólida. Las estructuras cristalinas poseen planos, producidos por ordenamientos repetitivos de átomos, que son capaces de difractar rayos-X. El fundamento de esta técnica se debe a la ley de William Bragg para interferencias constructivas. Bragg desarrolló una explicación de lo que sucedía cuando un haz monocromático de rayos-X llegaba a un cristal. Cuando un haz de rayos-X incide con un ángulo θ en una estructura ordenada la ley establece que para que las ondas reflejadas estén en concordancia de fase, y por tanto den lugar a una interferencia constructiva (difracción), es necesario que la diferencia de camino recorrido de las dos reflexiones sea múltiplo entero de la longitud de onda del haz incidente. Estas observaciones se traducen matemáticamente en la ecuación 3:

$$2d \sin \theta = n \lambda \quad (\text{ecuación 3})$$

Donde d es la distancia interplanar, n un número entero que representa el orden de difracción y λ la longitud de onda de la fuente de rayos-X.

Los sólidos que poseen suficiente orden periódico son cristalinos y por tanto dan lugar a patrones de difracción bien definidos. Las distancias entre los diferentes planos que definen la red cristalina determinan el valor del ángulo de Bragg, cuya posición se considera como “huella única” del sólido ordenado. De este modo, los patrones de difracción suministran información inequívoca de la estructura cristalina. La posición angular de los máximos de difracción se relaciona con los parámetros de la celda unidad mientras que las intensidades reflejan la simetría de la red y la densidad electrónica dentro de la celda unidad.

Esta caracterización se hizo en un equipo de difracción de rayos-X marca SIEMENS modelo D-500 usando radiación $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1.54 \text{ nm}$)



Figura 10 Equipo de Difracción de rayos-X marca SIEMENS modelo D-500

Para llevar a cabo cada análisis, se molieron los polvos de los catalizadores a un tamaño inferior a 200 mallas ($74\ \mu\text{m}$); se colocaron en el portamuestras y se introdujeron en el aparato. Las condiciones de operación fueron un paso de 0.02° en un intervalo de análisis de $10\text{--}80^\circ$, un voltaje de 35 KeV y una corriente de 30 mA.

5.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL

Las pruebas microbiológicas fueron realizadas en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental y de Servicios en la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la supervisión del Dr. Roberto Guerra González.

5.5.1. MATERIAL BIOLÓGICO

El caldo soya tripticaseína se preparó según las indicaciones del fabricante. Después de esterilizar el caldo en autoclave, éste se dejó enfriar hasta la

temperatura ambiente en forma estéril bajo campana de flujo laminar horizontal (Lumistell LH-120). Posteriormente se agregaron 10 mL de caldo en tubos de ensaye con tapa roscada, en condiciones asépticas. Por otro lado, el caldo de Mueller-Hinton (MH) se preparó siguiendo las indicaciones del fabricante y suplementado con Ca^{2+} y Mg^{2+} , ajustando a una concentración final de 25 mg de Ca^{2+} /L y 12.5 mg de Mg^{2+} /L de caldo.

Los agares soya tripticaseína, Müller-Hinton y MacConkey, se prepararon según las indicaciones del fabricante. Después de esterilizarse, se dejaron enfriar en un baño de agua a 45-50 °C (en forma estéril bajo campana de flujo laminar con energía ultravioleta). Se vertieron 20 mL de los preparados en cajas Petri de 100 mm de diámetro, para dar un espesor uniforme de aproximadamente 5 mm. Las placas se dejaron solidificar a temperatura ambiente, evitando la acumulación de gotas de condensación en la tapa. Las placas preparadas se envolvieron en plástico, para minimizar el secado de los agares, y se almacenaron en refrigerador a 4 °C.

Se utilizó una cepa de *Escherichia coli* (*E. coli*) con el Número de Colección de Cepas Americana en ingles American Type Culture Collection (ATCC) 25922. La cepa fue obtenida del Laboratorio Estatal de Salud Pública de Michoacán, la cual se hizo crecer en cuñas de agar soya tripticaseína a 37 °C por 24 h y se resembraron cada 12 h por 5 días para garantizar la fase exponencial de crecimiento. Esta cepa fue conservada a 4 °C, con el fin de mantener la viabilidad. Se realizó coloración de Gram para verificar pureza de la cepa de *E. coli*, observando su morfología en microscopio óptico a 100x.

Se realizó el frotis correspondiente sobre la cepa a analizar con cristal violeta y una solución de yodo, todas se tiñeron de un color violáceo. Posteriormente se les trató con una solución de decolorante (alcohol-cetona), las bacterias gram-positivas retuvieron el colorante, debido a la composición de su pared, mientras que las Gram-negativas no lo retuvieron, siendo el colorante eliminado. A continuación, se les trató con un colorante de contraste (fucsina diluida), las

bacterias Gram-negativas se tiñeron, lo que asegura que se trata de bacterias Gram-negativas.

Para estandarizar la densidad del inóculo se usó una suspensión de sulfato de bario como estándar de turbidez (0.5 de la escala de McFarland). Las pruebas de turbidez se realizaron en un espectrofotómetro UV-Vis Varian Cary 4000. Se midió la absorbancia a 625 nm, incubándose bajo las mismas condiciones hasta alcanzar un crecimiento en un rango comprendido entre 0.7 y 0.8 de densidad óptica. Los estándares se mantuvieron almacenados a temperatura ambiente al abrigo de la luz.

Para la preparación de los inóculos se tomaron 3 colonias aisladas del mismo tipo de morfología de las cepas mantenidas en cuñas de agar soya tripticaseína, y se hicieron crecer en tubos con 5 mL de caldo de soya tripticaseína a 37 °C hasta alcanzar la turbidez estándar. Esta suspensión contiene aproximadamente 1×10^6 Unidad Formadora de Colonias (UFC)/mL de *E. coli*. Los inóculos se resembraron cada 12 h por 5 días para confirmar la fase exponencial de crecimiento. Estas cepas fueron conservadas a 4 °C, con el fin de mantener la viabilidad.

Para valorar la capacidad bactericida de los materiales se empleó la técnica de ensayo de dilución en caldo MH, la cual proporcionó información preliminar acerca de la actividad antimicrobiana. Las pruebas de dilución en agar, se llevaron a cabo de acuerdo con el manual de procedimientos para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos en bacterias aisladas del CLSI. La relación inicial para los ensayos de la inhibición fue de 10mg/mL.

Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) se realizaron diluciones seriadas 1/10 de material en caldo MH. Se emplearon dos controles: el primero fue el control positivo (caldo MH al que se añadió la suspensión bacteriana) y el segundo fue el control negativo (caldo MH sin antimicrobiano y sin suspensión bacteriana). Los tubos inoculados con una cantidad calibrada de los microorganismos y los materiales bactericidas se incubaron por 24 h a una temperatura de 37 °C. En aquellos tubos donde la bacteria se desarrolló, se observó una turbidez (Figura 11).

La CMI fue interpretada como la concentración de antimicrobiano, contenida en el tubo, de la serie que inhibió el crecimiento visible de la bacteria, para lo cual fue necesario comparar cada uno de los tubos con los controles positivo y negativo. Los tubos en donde no hubo crecimiento fueron sembrados en agar MH, para determinar la concentración mínima bactericida (CMB).

Para determinar la CMB se extrajeron 100 μL de los tubos en los cuales no se observó crecimiento visible de la bacteria (inhibición de crecimiento); esta suspensión fue inoculada en placas Petri con agar MH debidamente rotuladas con la concentración correspondiente. Se utilizó como control positivo agar MH con 100 μL de inóculo sin antimicrobiano, y como control negativo, agar MH sin inóculo y sin antimicrobiano. Las placas se dejaron incubar durante 24 horas a 37 °C. La lectura de los resultados se realizó en aquellas placas donde el antimicrobiano fue capaz de eliminar completamente el desarrollo bacteriano o que eliminó al 80% de bacterias, comparándolo con el control positivo.

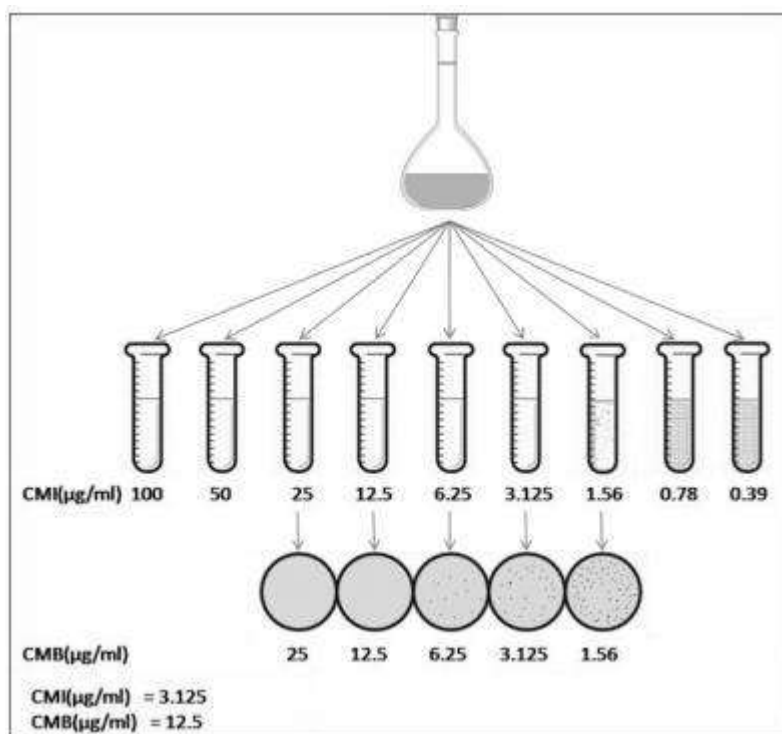


Figura 11. Metodología para la determinación de la CMI y CMB

La CMB de los materiales se determinó a través de la técnica de difusión en agar (método de Kirby-Bauer). Para ello, se inoculó una cantidad estandarizada de

bacterias de *E. coli* sobre la superficie de una placa de agar Müller-Hinton. Se pusieron en contacto con discos de papel filtro impregnados con diferentes cantidades conocidas del material bactericida a evaluar.

Las bacterias fueron sembradas mediante la técnica de inoculación con el uso del replicador de Steer, el cual permite sembrar varias cepas en forma rápida y simultánea en el agar.

El replicador se calibró para depositar alícuotas de 2 μ L de cada inóculo sobre la superficie del agar.

En cada ensayo se inoculó, como control, una placa sin material bactericida, al comienzo y al final, para determinar viabilidad (pureza) y detectar posibles contaminaciones durante el procedimiento. Las placas se mantuvieron a temperatura ambiente hasta secar el inóculo. Luego se incubaron invertidas a 36 °C por 24 h en atmósfera aeróbica.

Las CMI y CMB obtenidas por los dos métodos ensayados (macrodilución en líquido y microdilución en agar) no presentaron diferencias significativas.

5.5.2. CRECIMIENTO BACTERIANO EN PRESENCIA DE LOS MATERIALES

Se determinó el crecimiento de la bacteria en presencia de los materiales biocidas. Para ello, se valoró la capacidad bactericida de los materiales en relación con el tiempo y la CMB promedio. Se enfrentó un inóculo normalizado a concentraciones fijas de antimicrobiano en un caldo. Se inoculó 0.5 mL de muestra de los sistemas líquidos con bacterias (*E. coli*), en 5 mL de caldo de soya tripticaseína contenido en tubos de ensaye con tapa rosca. Se agregó una cantidad de material biocida (cantidad determinada como CMB promedio) a cada tubo incubándose a 37 °C con agitación a 30 rpm. Se tomaron muestras a diferentes tiempos (0, 15, 30, 60, 90, 120, 180 y 240 min). La muestra tomada se sembró en cajas Petri con 20 mL de agar MacConkey por la técnica de estriado en placa. Como control, una placa se inoculó con cultivo sin material bactericida, al comienzo y al final. Las placas se incubaron invertidas a 37 °C por 24 h en atmósfera aeróbica y se realizó el conteo de colonias.

6 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES

Enseguida se muestran los resultados obtenidos mediante la aplicación de las diferentes técnicas empleadas para caracterizar los materiales sintetizados.

Para poder caracterizar los materiales primeramente se hicieron pruebas inhibitorias en presencia de *E. coli*, esto para evitar gastos excesivos en las mismas y poder corroborar que la cantidad de nanopartículas de plata usadas en los diferentes soportes presentaran efecto inhibitorio en la bacteria.

Primeramente se probaron los soportes de dióxido de titanio por ambos métodos de obtención impregnados con una cantidad del 0.5% en peso de nanopartículas de plata. El material sintetizado a través del método sol-gel presentó CMI al 1/100 mientras que el material por síntesis hidrotérmica presentó CMI al 1/1000. La rugosidad y la dispersión de nanopartículas en el soporte son parámetros cruciales que afectan las propiedades biocidas de los materiales (Enrique lima et all, 2013), siendo no viable para su uso en la prueba de CMB por lo tanto se procedió a realizar DRX en el material sintetizado por el método sol-gel. El análisis mostró un resultado con el cual se puede sugerir que la concentración de partículas de plata es insuficiente para impregnarse en la totalidad de la superficie del dióxido de titanio.

El rendimiento del material se determina por la cantidad de plata en el soporte, la distribución en la superficie (microporos y superficie externa), el tamaño de las partículas y la dimensión fractal de las partículas metálicas, (Roberto Guerra et all, 2012), lo cual nos confirma que la síntesis sol-gel (nanoesferas) son mejores soportes que la síntesis hidrotérmica (nanobarras) para el efecto inhibitorio de las nanopartículas de plata.

Por consecuente se determina solo usar como soporte el material sintetizado por el método sol-gel y aumentar el porcentaje de las nanopartículas de plata a 1.5%

porcentaje en peso dados los resultados y la viabilidad de las primeras pruebas, esto para reducir costos, tiempos y usar el material que fue más viable.

6.1.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)

A continuación, se presentan las micrografías para el Ag/TiO₂ al 1.5%.

En la figura 12 las imágenes (a), (b), (c) y (d) corresponden al Ag/TiO₂ 1.5% antes de ser utilizado en la inhibición de *E. coli* con aumentos de 2000X, 5000X, 40000X y 100000X, respectivamente. A bajas magnificaciones se puede apreciar una vista del soporte y las nanopartículas de plata impregnadas uniformemente, donde estas aparecen de forma brillante sobre la superficie. A una mayor magnificación podemos observar el tamaño de las partículas de plata que oscilan entre los 25 y 30 nm.

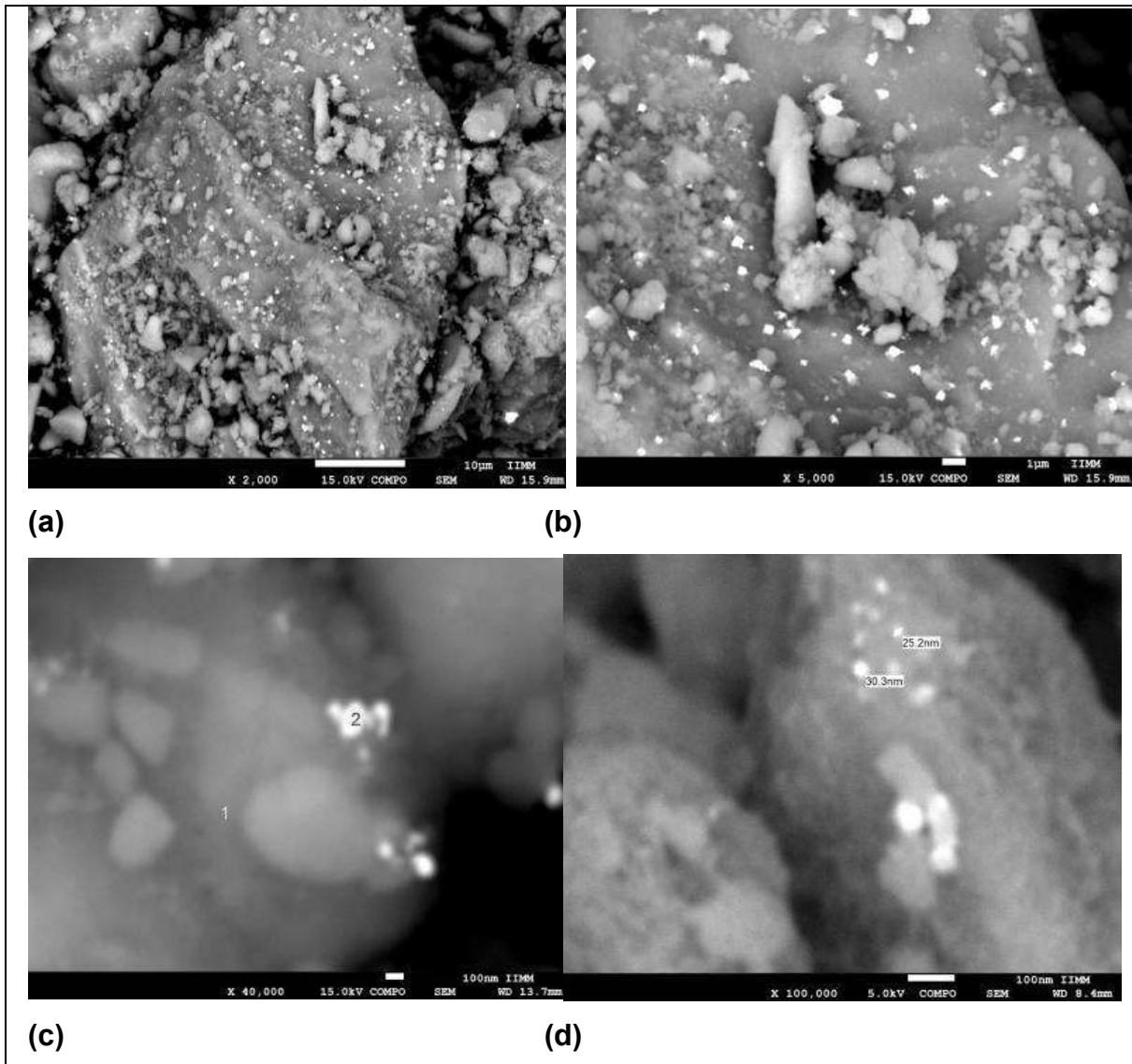


FIGURA 12 Micrografías de Ag/TiO₂ (1)2000X, (2)5000X, (3)40000X Y (4)100000X.

En la figura 13 las imágenes (1), (2), (3) y (4) corresponden al Ag/TiO₂ 1.5% recuperado después de ser utilizado en la inhibición de *E. coli* con aumentos de 2000X, 10000X, y 100000X, respectivamente. A bajas magnificaciones se puede apreciar una vista del soporte y las nanopartículas de plata impregnadas uniformemente, donde se puede apreciar que no hay un cambio conformacional del material. A una mayor magnificación podemos observar el tamaño de las partículas de plata que oscilan entre los 30 y 32 nm.

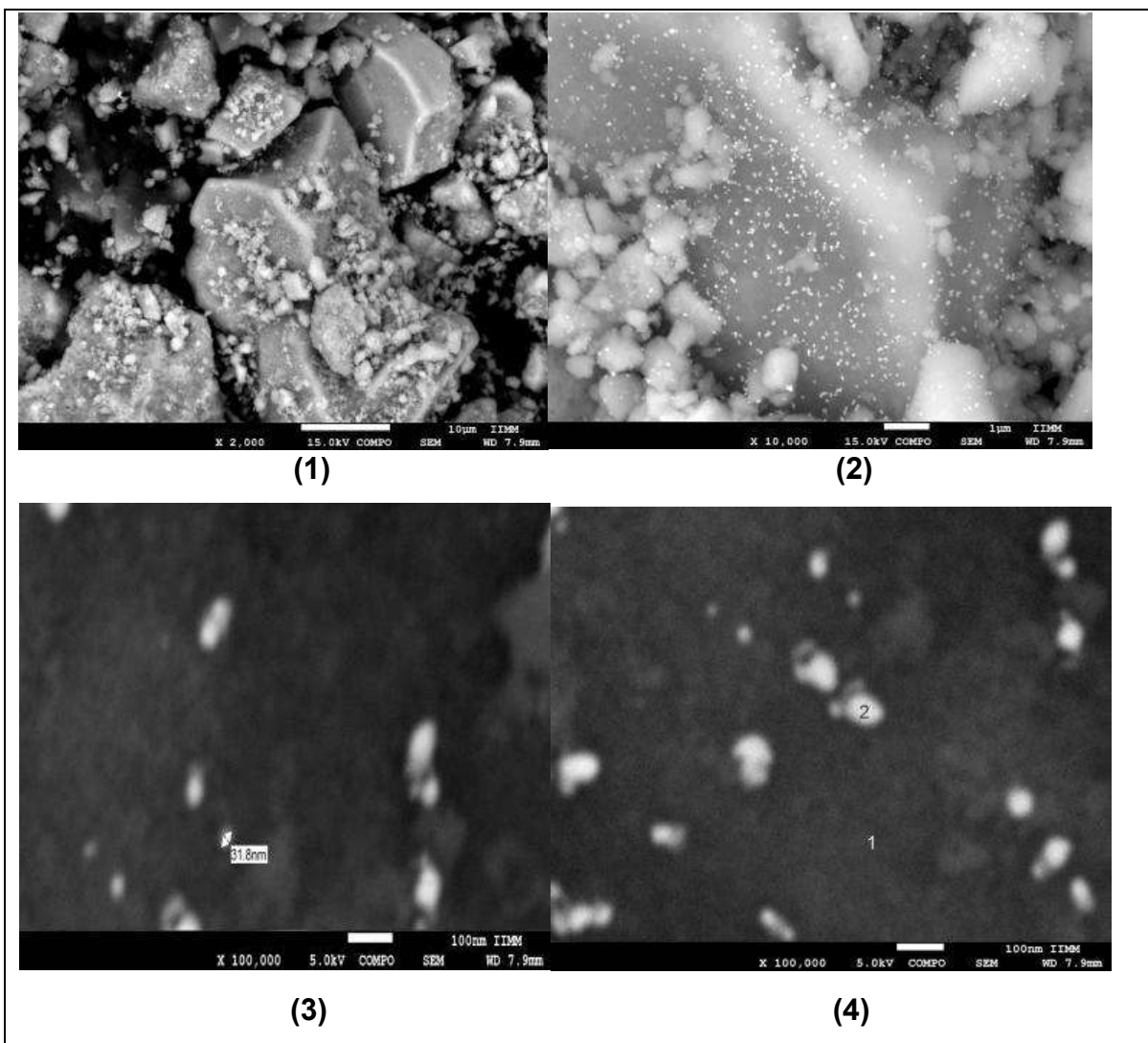


FIGURA 13 Micrografías de Ag/TiO₂ Recuperado (1)2000X, (2)10000X, (3)100000X Y (4)100000X.

En la figura 14 las imágenes (1), (2), (3) y (4) corresponden al Ag/TiO₂ 1.5% después de ser irradiado y utilizado en la inhibición de *E. coli* con aumentos de 5000X, 10000X, y 100000X, respectivamente. A bajas magnificaciones se puede apreciar una vista del soporte y las nanopartículas de plata impregnadas uniformemente, donde se puede apreciar que hay un cambio en las partículas de plata al verse aglomeradas en forma de triángulos sobre el soporte. A una mayor magnificación podemos observar el tamaño de las partículas de plata que oscilan entre los 19 y 42 nm.

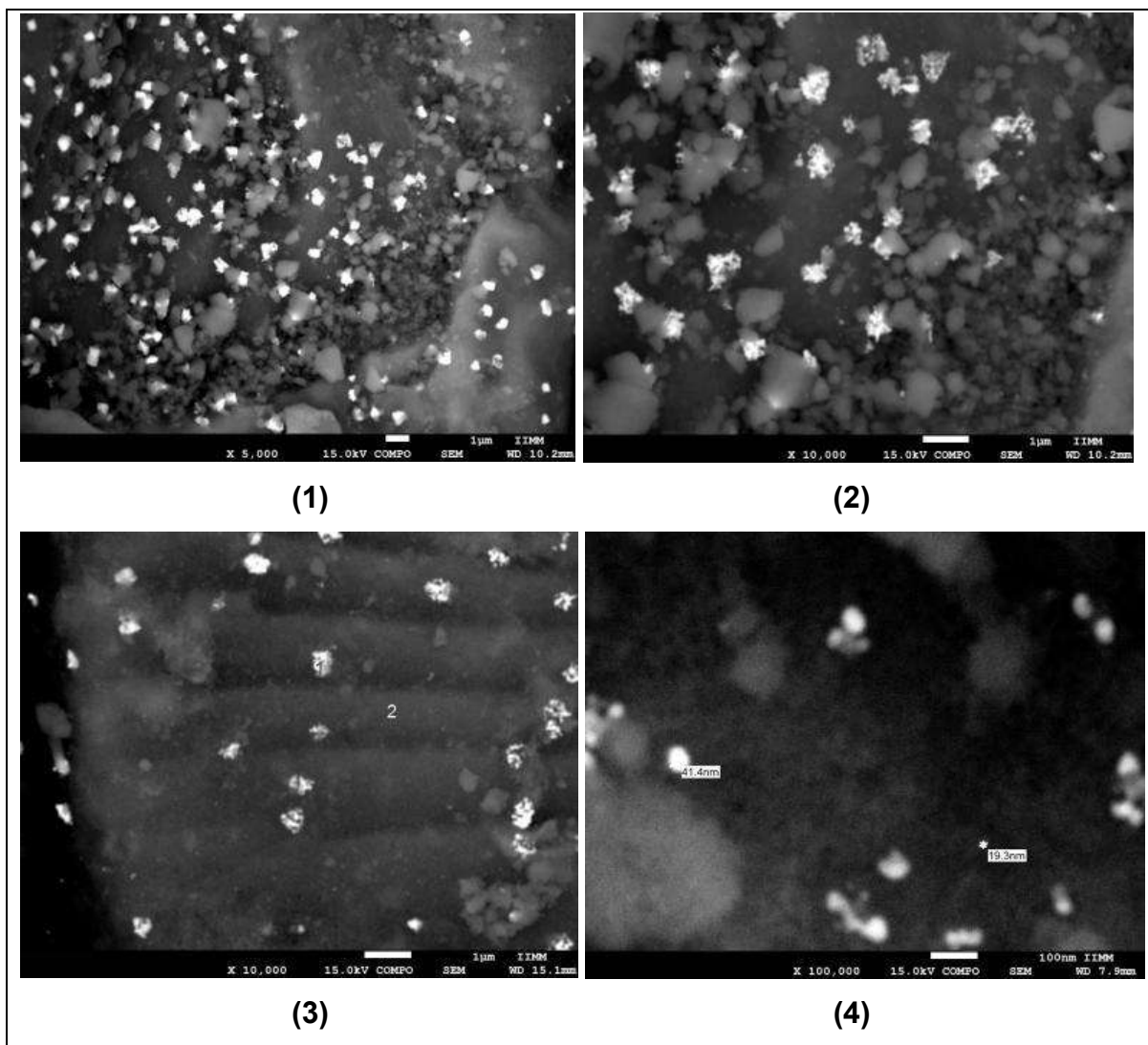


FIGURA 14 Micrografías de Ag/TiO₂ con energía UV (1)5000X, (2)10000X, (3)10000X Y (4)100000X.

A continuación, se presentan las micrografías de un mapeo para el Ag/TiO₂ al 1.5% recuperado que fue irradiado con energía UV para la prueba de inhibición.

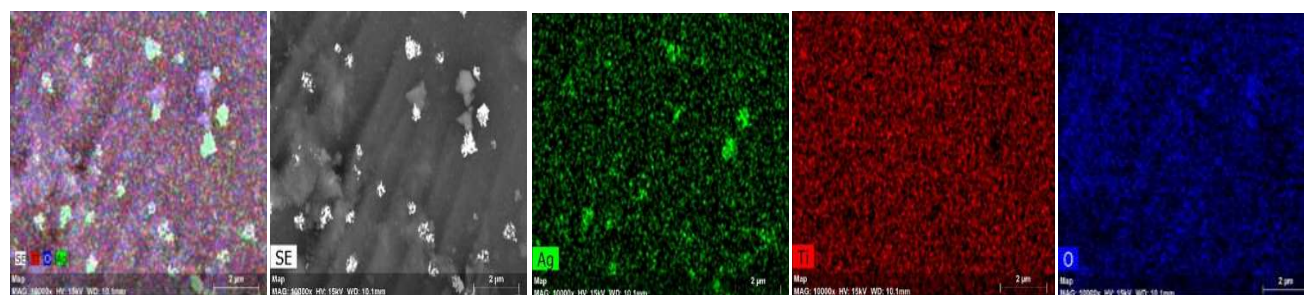


FIGURA 15 Mapeo de muestras irradiadas con energía UV

6.1.2 DIFRACCIÓN DE RAYOS X (DRX)

En el difactograma (Figura 16) de los materiales, se identifica al TiO_2 en fase anatasa y en menor proporción al rutilo y que la plata queda indicada en el valor $2\theta = 38$ grados demostrando que no es suficiente concentración para inhibir a la bacteria.

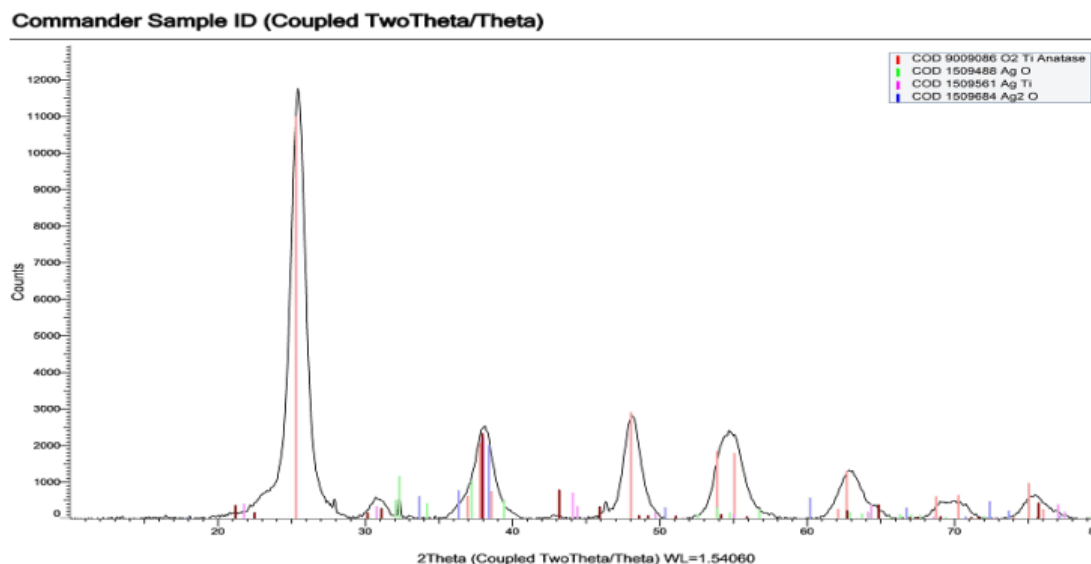


FIGURA 16 Difractograma DRX de la muestra $\text{TiO}_2\text{-Ag}$

6.2 EVALUACIÓN ANTIBACTERIAL

Los métodos para evaluar la actividad antibacteriana se clasifican en tres grupos principales: métodos de difusión, métodos de dilución y métodos de autobiografía. En algunas fuentes se considera a la técnica conductimétrica como un cuarto método. Como regla general pero no exhaustiva, el método de difusión se utiliza para estudiar compuestos polares y el método de dilución para estudiar compuestos polares y no polares. En el caso de nuestro estudio, se decidió utilizar el método de dilución en caldo. Como ya se mencionó en los antecedentes, el método de dilución en caldo se utiliza para determinar tanto la concentración mínima bactericida (CMB) como la concentración mínima inhibitoria (CMI). Definiendo como CMI la concentración más baja que

puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de incubar por 24 horas; y CMB como la concentración más baja que puede prevenir el crecimiento de un microorganismo después de subcultivar en un medio libre del compuesto evaluado. Cabe mencionar que, los materiales en esta investigación, pueden modificarse al ser usados y perder sus propiedades antibacteriales por pérdida del material, en este caso las nanopartículas de plata que es el agente activo. Así, resulta interesante analizar los resultados de las pruebas antibacteriales de los materiales posterior a la prueba de dilución en caldo, esto para saber si sus propiedades se conservaron, se potenciaron o desaparecieron. De igual forma, se procedió a irradiar con energía del espectro UV, pero, a diferencia de otras investigaciones el material fue irradiado antes de aplicarlo a la bacteria, y analizado de la misma manera para observar sus propiedades durante y posterior a la prueba de dilución en caldo.

En la tabla 1 se muestran los resultados de CMI y CMB del Ag/TiO₂ al 1.5% contra las cepas de *Escherichia coli* utilizando el método de dilución y siembra en agar también conocido como antibiograma por 24 horas a una temperatura de 37°C.

En la tabla 2 se muestran los valores en el conteo de colonias con respecto al tiempo de acción del Ag/TiO₂ al 1.5% contra las cepas de *Escherichia coli* utilizando el método de dilución y siembra en agar para cada uno de los tiempos de exposición. Con fines de reproducibilidad las determinaciones se hicieron por triplicado para la bacteria.

En la Tabla 3 se observa el efecto inhibitorio en placa microbiana de las bacterias de *E. coli* expuestas al material de Ag/TiO₂.

Tabla 1 Concentraciones CMI y CMB

Cepa/ Material biocida	Control 1	2.2 x 10 ⁻³ g/mL	3.3 x 10 ⁻³ g/mL	4.4 x 10 ⁻³ g/mL	5.5 x 10 ⁻³ g/mL	6.6 x 10 ⁻³ g/mL	7.7 x 10 ⁻³ g/mL	Control 2
CMI	+	+	+	+	-	-	-	+
CMB	+	+	+	+	-	-	-	+

+: Indica que hubo crecimiento bacteriano, -: indica ausencia de crecimiento

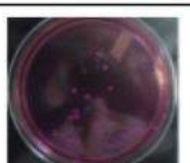


Figura 17 Antibiograma en medio solido de *Escherichia coli* en medio Müller-Hinton utilizando discos de Ag/TiO₂ sol-gel Microondas.

Tabla 2 Numero de colonias que sobrevivieron al Ag/TiO₂ 1.5% con y sin presencia de energía del espectro UV

tiempo (min)	Patrón	TiO ₂ /Ag1	TiO ₂ /Ag2	TiO ₂ /Ag1 UV1	TiO ₂ /Ag2 UV2
0	103	103	103	103	102
15	108	75	96	83	84
30	114	56	62	41	14
60	118	35	47	2	3
90	123	31	53	0	0
120	127	27	45	0	0
180	132	5	16	0	0
240	153	3	0	0	0

Tabla 3. Colonias de *E. coli* que sobrevivieron después de la exposición del medio de cultivo al material de Ag/TiO₂.

TIEMPO (min)	PATRON	Ag/TiO₂	Ag/TiO₂UV
0			
15			
30			
60			
90			
120			
180			
240			

El crecimiento microbiano y el conteo de colonias de las cepas de *E. coli*, en presencia del material bactericida, se calcularon teniendo en cuenta el número de colonias iniciales en la suspensión de microorganismos inoculados y las colonias, crecidas o eliminadas, en el transcurso del tiempo de exposición.

La valoración del efecto bactericida del material sin irradiar y el material irradiado se realizó al medir la viabilidad celular a los 0, 30, 60, 90, 120, 180 y 240 minutos después de la exposición e incubación de las bacterias con los materiales. Las pruebas se realizaron por duplicado en placas con agar McConkey. Estas pruebas permitieron definir el momento en el que el agente biocida actúa sobre el ciclo de replicación bacteriano, de tal forma que cada material presenta una gráfica diferente que va de acuerdo a su mecanismo de acción.

En la Figura 18 se aprecia que, los materiales impregnados de plata, son bactericidas para la bacteria de *E.coli*. Las curvas control demostraron que con la presencia de las nanopartículas de plata existe inhibición bacteriana corroborando que el material de Ag/TiO₂ sin presencia de energía del espectro UV tiene efecto sobre la bacteria.

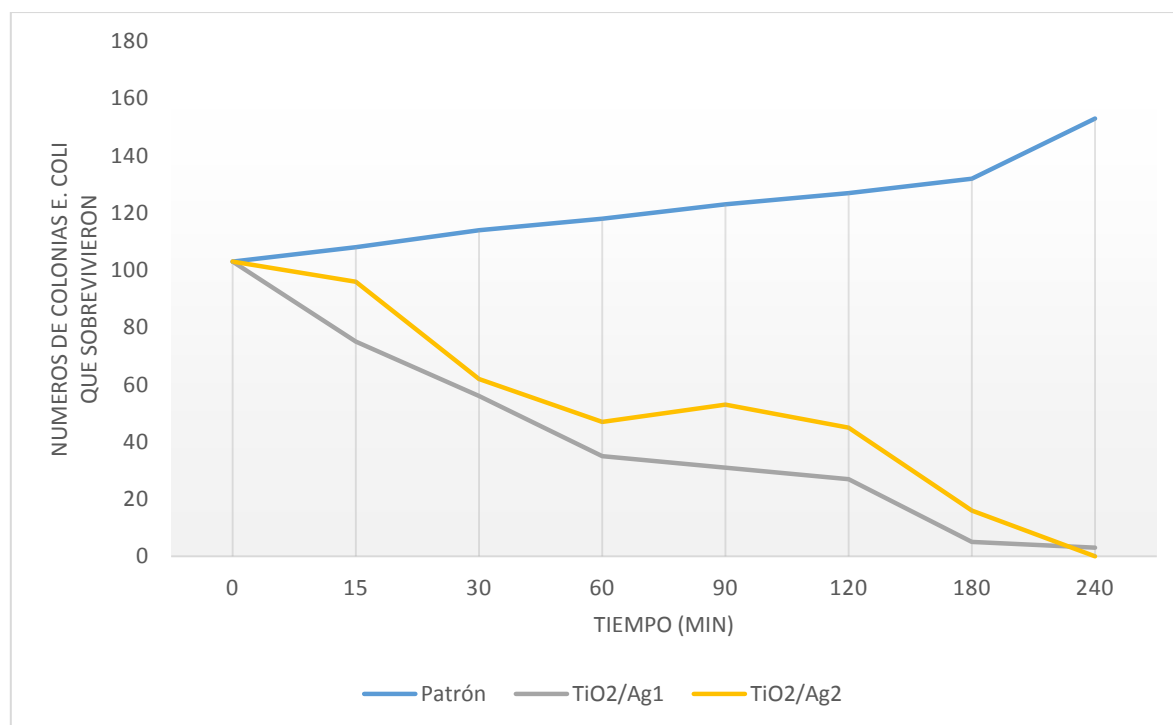


Figura 18. Efecto inhibitorio de los materiales a CMI sobre crecimiento de *E. coli*.

En la Figura 19 se aprecia que, los materiales impregnados de plata e irradiados con energía del espectro UV, son bactericidas en periodo más corto para la bacteria de *E. coli*. Las curvas control demostraron que con la presencia de las nanopartículas de plata y radiación UV existe inhibición bacteriana corroborando que el material de TiO_2 en presencia de energía del espectro UV tiene efecto biocida sobre la bacteria.

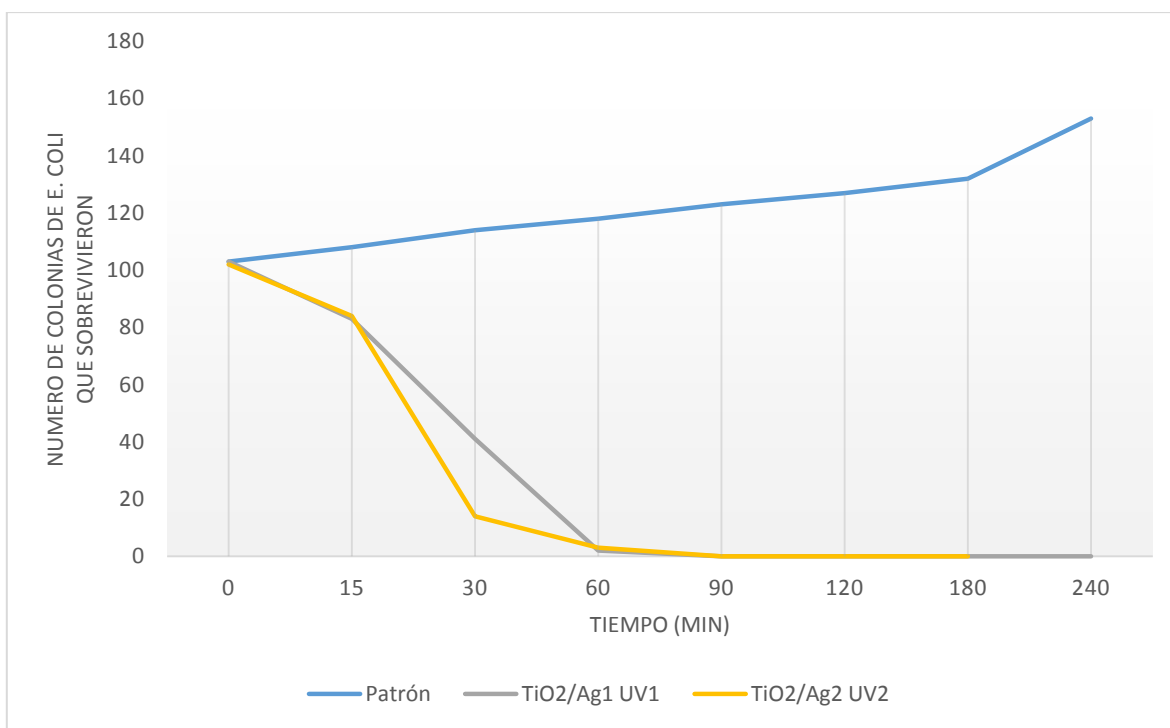


Figura 19. Efecto inhibitorio de los materiales a CMI sobre crecimiento de *E. coli*.

En la Figura 20 se aprecia que, los materiales impregnados de plata e irradiados con energía del espectro UV, tienen mejores efectos bactericidas para la bacteria de *E. coli*. Las curvas demostraron que con la presencia de las nanopartículas de plata y la energía UV hay una sinergia inhibiendo a la bacteria en un menor tiempo corroborando que el material de TiO_2 con presencia de energía del espectro UV tiene efectos bactericidas sobre la bacteria, demostrando que se puede irradiar antes de poner en contacto con la bacteria, evitando así exponer a la bacteria a los rayos de energía del espectro UV que también tienen un efecto bactericida dando resultados más viables.

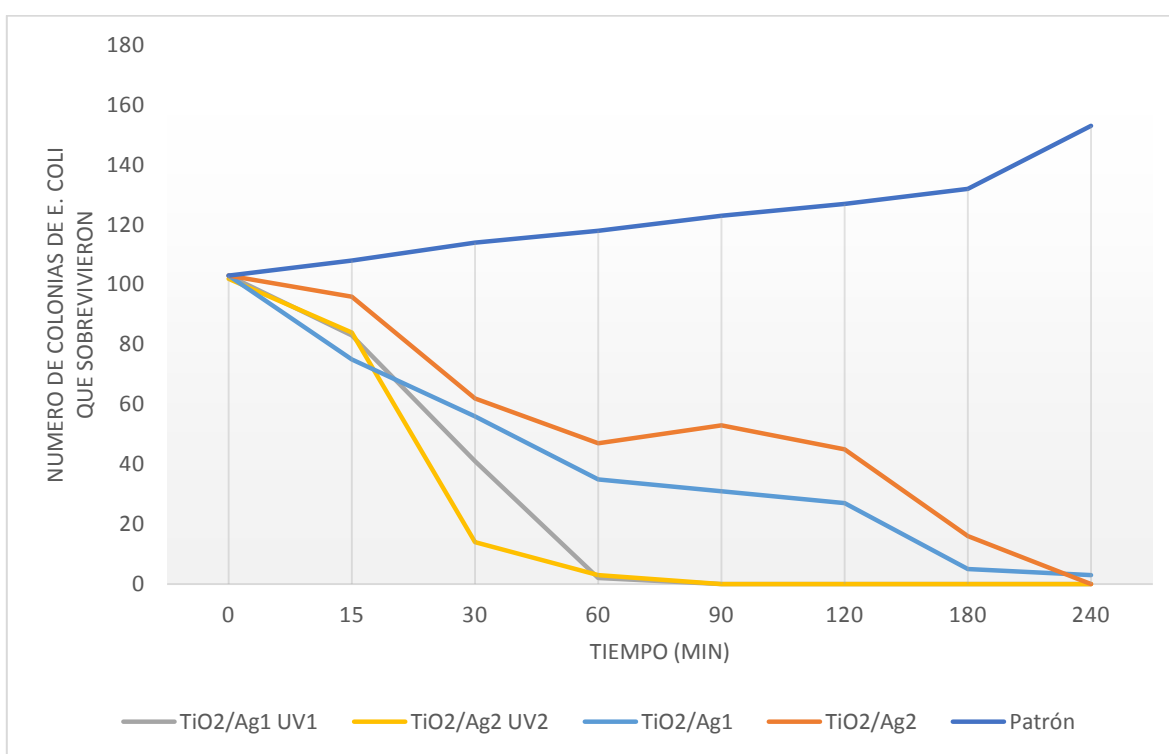


Figura 20. Comparación del efecto inhibitorio de los materiales a CMI sobre crecimiento de *E. coli*.

7 CONCLUSIONES

A través del desarrollo del presente proyecto fue posible preparar dióxido de titanio, mediante dos procesos de síntesis: sol-gel asistida por microondas y síntesis hidrotérmica, y concluir que el método por síntesis sol-gel presenta un mejor desempeño como soporte de plata, con respecto a aquel llevado a cabo mediante síntesis hidrotérmica. La síntesis sol-gel es más eficiente como soporte para la impregnación de nanopartículas de plata promoviendo una mejor dispersión que la observada cuando se empleó la síntesis hidrotérmica demostrando una mejor inhibición de *Escherichia coli*.

El conjunto de resultados y su análisis nos permite formular las siguientes observaciones;

Fue posible llevar a cabo la síntesis química del material propuesto a través del método de sol-gel asistido por microondas en un tiempo mucho menor que al método convencional de sol-gel, además fue posible llevar a cabo la síntesis química del material propuesto a través del método hidrotérmico.

Fue posible soportar nanopartículas de plata por el método de vía húmeda incipiente sobre los soportes de TiO_2 .

Se observó que la cantidad de 0.5% de nanopartículas de plata (porcentaje en peso) fue insuficiente para impregnar la totalidad de la superficie del soporte por lo que se concluye que el incremento de la cantidad de impregnación de plata al 1.5% porcentaje en peso fue el adecuado.

En las fotomicrografías de MEB obtenidas para el sistema Ag/TiO_2 al 1.5% por el método sol-gel asistido por microondas, se observan nanopartículas de plata de forma homogénea con dimensiones de nanómetros en toda la superficie del material, tanto en el material empleado en la inhibición, como el material de referencia, a excepción del material irradiado con energía del espectro UV la cual se observó aglomeraciones de nanopartículas de plata en la superficie del material.

En los análisis de DRX se observan partículas del TiO_2 tanto en su forma de anatasa como en su forma de rutilo, observandose partículas de fosforo en los

materiales de prueba el cual no interviene directamente en la inhibición de *E. coli* ya que es esencial para la síntesis de ácidos nucleicos y membranas celulares. Por consiguiente estamos seguros de la actividad inhibitoria de las nanopartículas de plata y el TiO_2 irradiado con energía del espectro UV.

Se obtuvieron resultados importantes en la prueba de Ag/TiO_2 en presencia de energía del espectro UV, para la cual se obtuvo una inhibición del 100% en 90 minutos, mientras que para el Ag/TiO_2 en ausencia de energía del espectro UV se inhibió el 99.3% en 240 minutos.

Como observación general es que es recomendable continuar investigando el tiempo en que el Ag/TiO_2 irradiado con energía del espectro UV se mantiene activado o excitado siendo un eficaz biocida y foto-degradador de colorantes orgánicos.

BIBLIOGRAFÍA.

1. F. Eugene McJunkin, "Agua y Salud Humana" 1988, EDITORIAL LIMUSA, S.A. de C.V. Balderas 95, Primer piso, 06040, México, D.F. SEGUNDA EDICION.
2. Baker, William H. " Perspectives on Acute Enteric Disease Epidemiology and Control"(Perspectivas en la epidemiología y control de las enfermedades entéricas agudas.) PanAmerican Health Organization Bulletin. 9 (2):148-156.1975.
3. Gwatkin, Davison. "How Many Die? A Set of Demographic Estimates of the Annual Number of Infant and Child Deaths in the World"(¿Cuántos mueren? Un conjunto de estimados demográficos sobre el número de muertes anuales de infantes y niños en el mundo).American Journal of Public Health. 70:1286-1289.1980
4. NORMA Oficial Mexicana NOM-112-SSA1-1994, Bienes y servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable.
5. Chopra, "The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern?" Journal of Antimicrobial Chemotherapy 59 (2007) 587.
6. H. Chen, C. Nanayakkara, V. Grassian. Chem. Rev., 112, 5919–5948 (2012).
7. Nakajima, S. Koizumi, T. Watanabe, K. Hashimoto, J. Photoch. Photobio. A, 146, 129-132, (2001).
8. Miguel Monge, "NANOPARTICULAS DE PLATA: METODOS DE SINTESIS EN DISOLUCION Y PROPIEDADES BACTERICIDAS". 2009
9. P. Christopher, D. Ingram, S. Linic. J. Phys. Chem. C., 114, 9173-9177 (2010). Linic,
10. P. Christopher, D. Ingram, Nat. Mater., 10 911-921 (2011).
11. Jiménez Cisneros Blanca, La contaminación ambiental en México, México: Limusa, colegio de ingenieros ambientales de México, A, C, 2001.
12. The Chemistry of Nanomaterials. Synthesis, Properties and Applications Vols. 1 and 2 (C. N. R. Rao, A. Müller, A. K. Cheetham). Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2004.
13. C. Burda, X. Chen, R. Narayanan, M. A. El-Sayed, Chem. Rev., 2005
14. H. J. Klaseen, Burns, "Plata", 2000.
15. L. S. Nair, C. T. Laurencin, "J. Biomed. Nanotechnol." 2007
16. P. C. Lee, D. J. Meisel, "Phys. Chem.", 1982, 86, 3391–3395.
17. J. A. Creighton, C. G. Blatchford, M. G. Albrecht, J. Chem. "Soc. Farad. Trans. II", 1979, 75, 790–798.
18. C. N. Lok, C. M. Ho, R. Chen, Q. Y. He, W. Y. Yu, H. Sun, P. K. H. Tam, J. F. Chiu, C. M. Che, "J. Biol. Inorg. Chem", 2007.
19. X. Chen, H. J. Schluesener, "Toxicol. Lett.", 2007.

20. O. Choi, K. K. Deng, N.-J. Kim, L. Ross, Jr., R. Y. Surampalli, Z. Hu, "Water Res", 2008.
21. Marinas A., Guillard C., Marinas J. M., Fernández-Alba A., Angüera A. y Herrmann J. M. 2001."Photocatalytic degradation of pesticide-acaricide formetanate in aqueous suspension of TiO₂". Applied Catalysis B: Environmental., 34, 241-252.
22. Jin-Chung, Sze-Mun. 2011 "Degrading Endocrine Disrupting Chemical from Wastewater by TiO₂ photocatalysis: a Review" International Journal of Photoenergy. 2012.
23. Barajas-Ledesma, E; García-Benjume, M L; Espitia-Cabrera, I; Bravo-Patiño, A; Contreras-García, M.E. 2009 "Biocide Activity of TiO₂ Nanostructured Films" Journal of Nano Research. Vol 9, 17-24.
24. Stamate, M; Lazar, G. 2007 "Aplication of Titanium dioxide photocatalysis to create self-cleaning materials" Romanian technical sciences academy. 13, 280-185.
25. Contreras, R; García, R. 2009 "Degradación fotocatalítica de azul de metileno en aguas residuales utilizando TiO₂ como catalizador" Revista latinoamericana de recursos naturales. 5 (2), 92-97
26. Yu, H; Zheng, X. 2007 "Preparation of Nitrogen -doped TiO₂ nanoparticle catalyst and its catalytic activity under visible light" Chinese journal of chemical engineering. 15, 802-807.
27. Rezaee, A; Pourtaghi, G. 2008 "Photocatalytic decomposition of gaseous toluene by TiO₂ nanoparticles coated on activated carbon" Iran journal of environmental health science and engineering. 4, 305-310.
28. Ao, C; Lee, S. 2004 "Indoor air purification by photocatalyst TiO₂ immobilized on an activated carbon filter installed in air cleaner" Chemical engineering science. 60, 103-109.
29. J.P. M. T. Madigan, J. M. Martinko, Brock Biología de los microorganismos, 10ª edición, Madrid; España, 2004.
30. J.P. Nataro, J.B. Kaper, "Diarrheagenic Escherichia coli., Clin. Microbiol." Rev. 11(1998) 142.
31. M. en C. Guadalupe Rodríguez-Angeles, "Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli", Salud Publica Mex 2002; 44: 464-475
32. Burda, C; Qiu, X. 2007 "Chemically Synthesized Nitrogen -Doped Metal Oxide Nanoparticles". Chemical Physics 339, 1-10.
33. Byrappa, K; Adschiri, T. 2007 "Hydrothermal technology for nanotechnology" Progress in crystal growth and characterization of materials. 53, 117-166.
34. A.W. Bauer, W.M. Kirby, J.C. Sherris, M. Turck, Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method., Am. J. Clin. Pathol. 45 (1966) 493.

35. M07-A9: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition, 2012.
36. H. M. Kingston., S. J. Haswell. "Microwave-enhanced Chemistry." American Chemical Society Publication. 1997. 3-20.
37. Adán, D. "Fotocatalizadores nanoestructurados de TiO_2 y Fe- TiO_2 para la degradación de compuestos aromaticos en medio acuoso empleando luz solar" 2008 Instituto de catálisis y Petroquímica. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. España.
38. S. National Committee for Clinical Laboratory, Methodology for the serum bactericidal test. Approved Guideline. Document M21-A, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa, 1999.
39. P.F. McDermott, S.M. Bodeis-Jones, T.R. Fritsche, R.N. Jones, R.D. Walker, Broth microdilution susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and the determination of quality control ranges for fourteen antimicrobial agents., J. Clin. Microbiol. 43 (2005) 6136.
40. L.D. C. M. Isada, L. K. Bernard, M. P. Goldman, J.A.A. Gray, Infectious Diseases Handbook including Antimicrobial Therapy & Diagnostic Test/Procedures, 5th ed., Lexi Comp, 2001.
41. Enrique Lima, Roberto Guerra, Víctor Lara and Ariel Guzmán; Gold nanoparticles as efficient antimicrobial agents for *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*; Rev. Chemistry Central, 2013.
42. Roberto Guerra, Enrique Lima y Ariel Guzmán; Antimicrobial supported nanoparticles: Gold versus silver for the cases of *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*, 2012
43. Roberto Guerra, Enrique Lima, Margarita Viniegra, Ariel Guzmán, Víctor Lara; Growth of *Escherichia coli* and *Salmonella typhi* inhibited by fractal silver nanoparticles supported on zeolites, 2012.
44. Verónica Janette Cedeño Garcidueñas; Tesis: Estudio de Degradación de Lignina Asistida por Fotosemiconductores TiO_2 , CeO_2 , Bi_2MoO_6 y $\text{Bi}_2\text{W}_2\text{O}_9$ Impurificados con Nitrógeno en Presencia de Energía UV y Visible, 2011.
45. Josué Daniel García Espinoza; Tesis: Síntesis de Estructuras Mesoporosas de $\text{N}_y\text{Ti}_{1-x}\text{Ce}_x\text{O}_{2-y}$ y su Actividad Fotocatalítica en la Degradación de Lignina, 2012.

