

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO



Facultad De Ciencias Físico - Matemáticas

“Mat. Luis Manuel Rivera Gutiérrez”



División de Estudios de Posgrado

**Efecto Bactericida de Nanoestructuras Complejas de
Nanopartículas de Plata**

Tesis

Para Obtener el Grado de: Maestro en

Ciencias en Ingeniería Física

Presenta:

I. Q. Juan Andrés Medina Cervantes

Asesor:

Doctor en Ciencias Gonzalo Viramontes Gamboa

Co Asesor:

Dra. Marycarmen y Monserrat Peña Gomar

Morelia Michoacán, septiembre de 2014

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi madre por darme la vida, que supo formarme con buenos sentimientos, hábitos y valores, por estar siempre para mí a pesar de nuestras diferencias lo cual me ha ayudado a salir adelante en los momentos difíciles. Agradezco a toda mi familia por siempre estar apoyándome, por la sabiduría que cada uno de sus miembros me ha brindado. A mis tíos Tito y Jaime por apoyarme y ser para mí la figura de un hombre bueno y responsable.

Quiero agradecer a mi novia María Carmen Maciel Arreola por estar siempre a mi lado en las buenas y en las malas, por su comprensión, paciencia y amor, por todo lo que aprendo al estar a su lado, por darme ánimos de fuerza y valor para seguir adelante. Quiero agradecer a los padres de mi novia, los señores Salvador Maciel y Carmen Arreola y su familia porque son unas personas maravillosas que me han brindado su apoyo, su amistad y por quien siento mucho cariño y aprecio.

Quiero agradecer a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por el apoyo económico brindado para el primer semestre de estudio de la maestría y por permitirme pertenecer a esta honorable casa de estudio.

Al programa de Maestría en Ciencias en Ingeniería Física, por darme la oportunidad de ingresar, poder adquirir nuevos conocimientos y desarrollar nuevas técnicas de investigación.

Quiero agradecer al Dr. Gonzalo Viramontes Gamboa por su amistad y permitirme trabajar bajo su tutela en este trabajo, por sus valiosas sugerencias que enriquecen el escrito final, gracias por brindarme incondicional apoyo.

Al Dr. Mariano Hernández por su amable colaboración como sinodal, por su apoyo y sugerencias que hicieron posible la realización de este trabajo.

A la Dra. Marycarmen y Monserrat Peña Gomar, por su amable colaboración como sinodal, por permitirme trabajar en su laboratorio para llevar a cabo la realización de este trabajo.

Quiero agradecer a todos los profesores e investigadores de este programa por formar parte de mi formación académica y profesional.

A mis queridos amigos del programa de maestría: Irma, Yuri, Pavel, León, Miguel y Claudia que compartieron buenos y malos momentos a lo largo de estos dos años y a quienes quiero de todo corazón.

A todas aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron en la realización de este trabajo.

Por último, más no el menos importante quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado para realizar mis estudios.

INDICE

RESUMEN	VIII
ABSTRAC	IX
CAPITULO 1	
INTRODUCCION	1
1.1 HIPOTESIS	2
1.2 JUSTIFICACION	3
1.3 OBJETIVOS	3
<i>Objetivo general</i>	<i>3</i>
<i>Objetivos Particulares:</i>	<i>3</i>
1.4 ANTECEDENTES	3
1.4.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS NANOPARTÍCULAS METÁLICAS.....	4
1.4.2 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA	7
a) <i>Síntesis por métodos físicos</i>	<i>9</i>
b) <i>Síntesis por métodos químicos</i>	<i>10</i>
c) <i>Síntesis de nanopartículas de plata a partir de complejos cianurados.....</i>	<i>11</i>
1.4.3 CARACTERIZACIÓN	14
a) <i>Espectroscopía Uv-Vis.....</i>	<i>14</i>
b) <i>Microscopía electrónica de transmisión.....</i>	<i>17</i>
1.4.4 APLICACIONES Y USOS ACTUALES EN MEDICINA Y BIOLOGÍA DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA	20
1.4.5 BACTERIAS Y SUS EFECTOS	29
a) <i>Lactobacillus Casei Shirota.....</i>	<i>30</i>
b) <i>Escherichia Coli</i>	<i>32</i>
c) <i>Dermatitis Atópica</i>	<i>33</i>
CAPITULO 2	
METODOLOGIA	35
2.1 <i>SÍNTESIS DE FIBRAS DOPADAS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA</i>	<i>35</i>
2.2 <i>SÍNTESIS DEL COMPLEJO AGCN.....</i>	<i>38</i>
2.3 <i>CULTIVO DE BACTERIAS</i>	<i>39</i>
2.3.1 <i>PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO</i>	<i>39</i>
2.3.2 <i>INOCULACIÓN</i>	<i>40</i>

2.3.3 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE POBLACIONES DE BACTERIAS POR ESPECTROSCOPÍA UV-VIS.....	41
--	----

CAPITULO 3

RESULTADOS Y CARACTERIZACION	44
3.1 FIBRAS SINTETIZADAS	44
3.2 CULTIVO DE BACTERIAS	49
3.3 EFECTO BACTERICIDA	50
3.3.1 BACTERIA LACTOBACILLUS CASEI SHIROTA	50
3.3.2 BACTERIA DERMATITIS ATÓPICA.....	56
3.3.3 BACTERIA ESCHERICHIA. COLI	59
3.3.4 FIBRA DOPADA DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN PRESENCIA DE ORINA Y SALIVA HUMANA	61

CAPITULO 4

CONCLUSIONES	63
REFERENCIAS.....	65

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1. FOTOMICROGRAFÍAS DE LAS NANOESTRUCTURAS SINTETIZADAS A PARTIR DE $Ag(CN)_2^-$ UTILIZANDO SULFITO DE SODIO COMO REDUCTOR [LÓPEZ MIRANDA, A., ET AL., 2013].	2
FIGURA 1.2. CLASIFICACIÓN DE NANOMATERIALES: A) NANOPARTÍCULAS DE ORO; B) 1-D, FIBRAS POLIMÉRICAS; C) 2-D, PELÍCULAS POLIMÉRICAS Y D) 3-D, SUPERRED OBTENIDA POR AUTOENSAMBLAJE DE PARTÍCULAS DE ORO [GUTIÉRREZ-WING., C., ET AL., 2001].	4
FIGURA 1.3. VASO DE LYCURGUS. COMPUESTO DE VIDRIO CON NANOPARTÍCULAS METÁLICAS. VISTA CON A) LUZ REFLEJADA, Y B) LUZ TRANSMITIDA [RAO., ET AL., 2007].	6
FIGURA 1.4. PUBLICACIONES RELACIONADAS CON “NANOPARTÍCULAS DE PLATA”. FUENTE: WWW.SCOPUS.COM.....	8
FIGURA 1.5. MÉTODOS PRINCIPALES DE SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS [BIROL., ET AL., 2013].	9
FIGURA 1.6. ARREGLO EXPERIMENTAL UTILIZADO EN LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS A PARTIR DEL COMPLEJO CIANURADO.	12
FIGURA 1.7. DIAGRAMA DE ESPECIACIÓN AG-CN. $1 \times 10^{-3} M AgNO_3$, $25^\circ C$	13
FIGURA 1.8. PLASMÓN DE RESONANCIA SUPERFICIAL CARACTERÍSTICO DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN LA REGIÓN UV-VIS [MANIKAM., ET AL., 2011].....	15
FIGURA 1.9. CURVAS SPR DE LAS NANOPARTÍCULAS SINTETIZADAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SDS. $1 \times 10^{-3} M AgNO_3$ Y $4.5 \times 10^{-4} M Na_2SO_3$ A $90 \mu\text{MOL}/\text{MIN}$ [LÓPEZ MIRANDA, A., 2013].	17
FIGURA 1.10. ESQUEMA GENERAL DE UN MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE TRANSMISIÓN.	19
FIGURA 1.11. DEPOSICIÓN PRÁCTICA Y ROBUSTA DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN	

TELA DE ALGODÓN. 20

FIGURA 1.12. CURVA DE CRECIMIENTO EN MEDIO LIQUIDO LURIA-BERTANI CON *E. COLI*, MUESTRA A TELA DE ALGODÓN SIN RECUBRIMIENTO, B 30 MG DE PLATA, C 50 MG DE PLATA Y D 70 MG DE PLATA.

22

FIGURA 1.13. (A): ESPUMA DE POLIURETANO SIN NANOPARTÍCULAS. (B): ESPUMA DE POLIURETANO CON NANOPARTÍCULAS. EL COLOR AMARILLO DORADO EN B, ES DEBIDO A LA SATURACIÓN DE LA COBERTURA POR LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA.

.....
23

FIGURA 1.14. RESULTADOS DE PRUEBA DE TUBO PARA UNA SOLUCIÓN 10^{-2} DE *E. COLI* DURANTE 5 MINUTOS DE EXPOSICIÓN. A) INICIO DE EXPOSICIÓN, B) DESPUÉS DE EXPOSICIÓN A LA PURA ESPUMA DE POLIURETANO, C) DESPUÉS DE EXPOSICIÓN A LA ESPUMA DE POLIURETANO RECUBIERTA POR NANOPARTÍCULAS DE PLATA. EL BRILLO CARACTERÍSTICO DE LA *E. COLI* ES CLARAMENTE VISIBLE EN A Y B, MIENTRAS QUE EL RECuento DE BACTERIAS FUE DE CERO EN C. 24

FIGURA 1.15. EL EFECTO DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN LA TRANSICIÓN DIMORFICA DE *C. ALBICANS*. A) CONTROL DE LEVADURA SIN 20 % DE FBS Y NANOPARTÍCULAS, B) SIN NANOPARTÍCULAS DE PLATA, C) CON 2 MG/ML DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA [KIM, K. J., ET AL., 2008]. 26

FIGURA 1.16. NÚMERO DE COLONIAS DE *E. COLI* COMO UNA FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN PLACAS DE AGAR LB EXPRESADA COMO UN PORCENTAJE DEL NÚMERO DE COLONIAS CRECIDAS EXENTAS DE PLATA EN PLACAS. LA FIGURA MUESTRA PLACAS CON LURIA-BERTANI A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NANOPARTICULAS DE PLATA: (A) 0, (B) 10, (C) 20 Y (D) 50 $\mu\text{G/ML}$ [IVAN SONDI ET AL, 11]. 27

FIGURA 1.17. CURVAS DE CRECIMIENTO DE *E. COLI* EN MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDO LURIA-BERTANI CON 10^7 CFU DE BACTERIA EN LA PRESENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA: 0 MG/CM^3 , 10 MG/CM^3 , 50 MG/CM^3 Y 100 MG/CM^3 28

FIGURA 1.18. MICROGRAFÍAS TEM DE CÉLULAS DE *E. COLI* EN CALDO LURIA-BERTANI (A) Y CÉLULAS TRATADAS CON 50 MG/CM^3 DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN CALDO LURIA-BERTANI POR 4 HORAS [SONDI, I., ET AL., 2004]. 29

FIGURA 1.19. IMAGEN OBTENIDA MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DE CEPA DE *LACTOBACILLUS CASEI SHIROTA* [BOONE, R., ET AL., 2001]. 31

FIGURA 1.20. IMÁGENES DE CEPA DE *E. COLI* UTILIZANDO UN MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO [HARTMANN, M., ET AL., 2010]. 33

FIGURA 1.21. LA IMAGEN MUESTRA LA PIERNA DE UN NIÑO CON *DERMATITIS ATÓPICA*.

.....

34

FIGURA 2.1. ARREGLO EXPERIMENTAL UTILIZADO EN LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS A PARTIR DEL COMPLEJO DE AGCN.....	37
FIGURA 2.2. FASES DEL CRECIMIENTO BACTERIANO [BROCK, T., ET AL., 1993].	42
FIGURA 3.1. FOTOMICROGRAFÍAS TEM DE LAS FIBRAS DOPADAS.....	46
FIGURA 3.2. DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE LAS NANOPARTÍCULAS CONTENIDAS EN LA FIBRA DOPADA.....	47
FIGURA 3.3. FIBRAS SINTETIZADAS DOPADAS POR NANOPARTÍCULAS DE PLATA.	48
FIGURA 3.4. FOTOMICROGRAFÍA SEM DEL POLÍMERO NO DOPADO DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA.	49
FIGURA 3.5. INOCULACIÓN DE LA BACTERIA <i>LACTOBACILLUS CASEI SHIROTA</i> EN MRS AGAR (A), INOCULACIÓN DE LAS BACTERIAS <i>E. COLI</i> Y <i>DERMATITIS ATÓPICA</i> EN LURIA-BERTANI (B Y C).....	50
FIGURA 3.6. ESPECTROS DE ABSORCIÓN PARA LA BACTERIA <i>LACTOBACILLUS CASEI SHIROTA</i> INOCULADA EN MRS, MRS CON FIBRA DOPADA Y MRS CON POLÍMERO.	51
FIGURA 3.7. CURVAS DE CRECIMIENTO BACTERIANO VERSUS TIEMPO PARA LA BACTERIA <i>LACTOBACILLUS CASEI SHIROTA</i> EN MRS, MRS CON FIBRA DOPADA Y MRS CON POLÍMERO NO DOPADO.....	53
FIGURA 3.8. ESPECTROS DE ABSORCIÓN PARA LA BACTERIA <i>LACTOBACILLUS CASEI SHIROTA</i> INOCULADA EN MRS CON FIBRA DOPADA.....	54
FIGURA 3.9. CURVAS DE CRECIMIENTO BACTERIANO VERSUS TIEMPO PARA LA BACTERIA <i>LACTOBACILLUS CASEI SHIROTA</i> EN MRS CON FIBRA DOPADA.	55
FIGURA 3.10. ESPECTROS DE ABSORCIÓN PARA LA BACTERIA <i>DERMATITIS ATÓPICA</i> INOCULADA CON LURIA-BERTANI, LURIA-BERTANI CON FIBRA DOPADA Y LURIA-BERTANI CON POLÍMERO NO DOPADO.....	57
FIGURA 3.11. CURVAS DE CRECIMIENTO BACTERIANO VERSUS TIEMPO PARA LA BACTERIA <i>DERMATITIS ATÓPICA</i> EN MEDIO LURIA-BERTANI, LURIA-BERTANI CON FIBRA DOPADA Y LURIA-BERTANI CON POLÍMERO NO DOPADO.	58
FIGURA 3.12. CURVAS DE CRECIMIENTO BACTERIANO VERSUS TIEMPO PARA LA BACTERIA <i>E. COLI</i> EN MEDIO LURIA-BERTANI, LURIA-BERTANI CON FIBRA DOPADA Y LURIA-BERTANI CON POLÍMERO NO DOPADO.	60

FIGURA 3.13. FOTOMICROGRAFÍAS TEM DE LAS FIBRAS DOPADAS EN ORINA HUMANA.
..... 61

FIGURA 3.14 FOTOMICROGRAFÍAS TEM DE LAS FIBRAS DOPADAS EN SALIVA HUMANA.
..... 62

RESUMEN

En la presente tesis se sintetizan nanoestructuras complejas de nanopartículas de plata en medio acuoso utilizando NaSO_3 como agente reductor a partir del complejo $\text{Ag}(\text{CN})$. Estas nanoestructuras complejas son utilizadas para estudiar experimentalmente su efecto bactericida sobre tres poblaciones de bacterias:

- a) *Lactobacillus Casei Shirota*
- b) *Escherichia Colí,*
- c) *Dermatitis Atópica*

Para ello, se obtienen curvas de crecimiento utilizando el medio de cultivo adecuado para cada una de ellas con y sin la presencia de AgNanoC , con el objetivo de cuantificar su efecto bactericida utilizando espectroscopía Uv-Vis. Los resultados mostraron que las nanoestructuras complejas inhiben el crecimiento de las tres bacterias en un 100 %.

Palabras clave: Nanopartículas de plata, Efecto bactericida, *Lactobacillus Casei Shirota*, *Escherichia Colí*, *Dermatitis Atópica*.

ABSTRAC

In this research thesis, synthesis of complex nanostructures of silver nanoparticles in aqueous medium is undertaken using NaSO_3 as a reducing agent for the complex $\text{Ag}(\text{CN})$. These complex nanostructures are used to experimentally study its bactericidal effect on three populations of bacteria:

a) *Lactobacillus Casei Shirota*

b) *Escherichia Coli*,

c) *Atopic Dermatitis*

To do so, growth curves were obtained using the appropriate culture medium for each with and without the presence of AgNanoC , in order to quantify the bactericidal effect using Uv-Vis spectroscopy. The results showed that complex nanostructures inhibit the growth of all three bacteria in 100%.

Keywords: Silver nanoparticles, Bactericidal effect, *Lactobacillus Casei Shirota*, *E. coli Infectious*, *Atopic Dermatitis*

CAPITULO 1

INTRODUCCION

En el presente trabajo se realiza un estudio del efecto bactericida de nanoestructuras complejas de nanopartículas de plata (AgNanoC), sintetizadas mediante el método de reducción química, propuesto por Armando López Miranda [López-Miranda, A., et al., 2013], las cuales se muestran en la figura 1.1. Esta imagen muestra las nanoestructuras de plata lineales, su principal característica es que tiene un gran número de partículas embebidas en presencia de una fase orgánica (Figura 1.1 c-d). Además de observarse ciertos arreglos lineales de partículas muy compactos con formas esféricas y amorfas (Figura 1.1 e-f). El tamaño promedio de las nanopartículas que conforman estas estructuras lineales es de 10 ± 3.4 nm. El análisis del efecto bactericida se hace utilizando distintas técnicas de análisis y caracterización como la espectroscopía Uv-Vis.

Primeramente se realiza la síntesis de nanopartículas de plata mediante reducción química a partir de cianuro de plata y sulfito de sodio, para reproducir las estructuras obtenidas por Armando López Miranda [López Miranda, A., et al., 2013]. Posteriormente se obtiene la curva de crecimiento bacteriano por medio de espectroscopía Uv-Vis y su comportamiento ante la presencia de las fibras dopadas y no dopadas de nanopartículas de plata. El efecto bactericida de estas nanopartículas se estudia utilizando cultivos de tres tipos de bacterias, *Lactobacillus Casei Shirota*, que son bacterias probióticas, anaeróbicas que se extraen de muestras de Yakult® comercial y bacterias patógenas como son *Dermatitis Atópica*, bacteria que se encuentra en áreas seborreicas y la bacteria *E. Coli* que está en el intestino. Sparado y colaboradores [Sparado, J., et al., 1974] mostraron que iones plata y compuestos a base de plata son altamente tóxicos para los microorganismos, mostrando tener fuertes efectos biocidas en

un máximo de 16 diferentes tipos de bacterias, entre las cuales se encuentran las ya mencionadas.

Posteriormente, se colocan diferentes cantidades de fibra dopada de AgNanoC y se mezclan con los cultivos de la bacteria *Lactobacillus Casei Shirota*, *E. Coli* y *Dermatitis Atópica* y se realizan las pruebas correspondientes para demostrar su efecto bactericida.

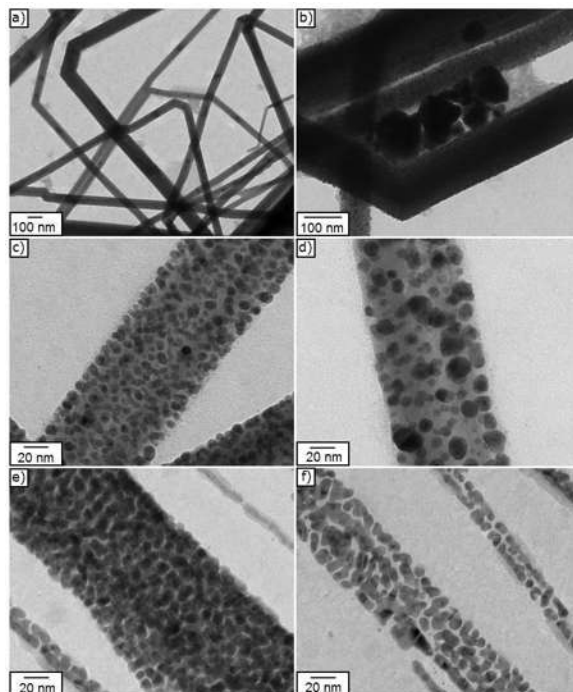


Figura 1.1. Fotomicrografías de las nanoestructuras sintetizadas a partir de $\text{Ag}(\text{CN})_2^-$ utilizando sulfito de sodio como reductor [López Miranda, A., et al., 2013].

1.1 HIPOTESIS

Las fibras de nanopartículas de plata particulares con las que experimentaremos tienen efecto bactericida. Esta hipótesis se basa en el hecho de que algunas nanopartículas de plata, distintas a las nuestras, presentan dicho efecto bactericida y hay muchos estudios que así lo sustentan [Kim, J. S., et al., 2007], [Haes, A. J., et al., 2002], [Kim, K. J., et al., 2008], [Lee, H. Y., et al., 2007], [Singh, M., et al., 2008].

1.2 JUSTIFICACION

El efecto bactericida de las fibras dopadas de nanopartículas de plata no ha sido estudiado aun y por lo tanto no se tiene información alguna en la bibliografía, en ningún trabajo o artículo publicado y su estudio va a ser abordado en esta tesis por primera vez, siendo su estudio la contribución principal de este trabajo de tesis. El método de síntesis es completamente nuevo, por ello se quiere corroborar su efecto bactericida para posibles aplicaciones en el área de la salud, los alimentos, etc.

1.3 OBJETIVOS

Objetivo general

Investigar el efecto bactericida de fibras dopadas de nanopartículas de plata, sintetizadas a partir de cianuro de plata.

Objetivos Particulares:

- a) Hacer revisión bibliográfica para contextualizar el estado actual del conocimiento relacionado a las diversas aplicaciones de nanopartículas de plata.
- b) Aprender métodos experimentales para sintetizar nanopartículas de plata.
- c) Aprender métodos de crecimiento de bacterias.
- d) Aprender técnicas de análisis físicas y químicas para entender el comportamiento bactericida de nanoestructuras de plata.

1.4 ANTECEDENTES

En esta sección se realiza una revisión bibliográfica para conocer el estado del arte de las nanopartículas de plata, métodos de síntesis, aplicaciones y sus

efectos bactericidas. Así mismo, se hace una descripción detallada de los efectos a la salud de las 3 bacterias analizadas en esta tesis.

1.4.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

De acuerdo al número de dimensiones que se encuentren en el régimen nanométrico, los nanomateriales se pueden clasificar en cuatro tipos, como se observa en la figura 1.2:

- a) Materiales de dimensión cero: Las tres dimensiones se ubican en el régimen nanométrico, a esta corresponden las nanopartículas.
- b) De una dimensión: Tienen una longitud variable, conservan una sola dimensión en el régimen de nanómetros, como es el caso de nanoalambres y nanotubos.
- c) De dos dimensiones: Son estructuras de tamaño indefinido, mantienen su espesor en el orden de 1 a 100 nm, como en el caso de películas delgadas.
- d) De tres dimensiones: Son sólidos tridimensionales que están formados por unidades nanométricas, como los autoensamblados de nanopartículas de oro.

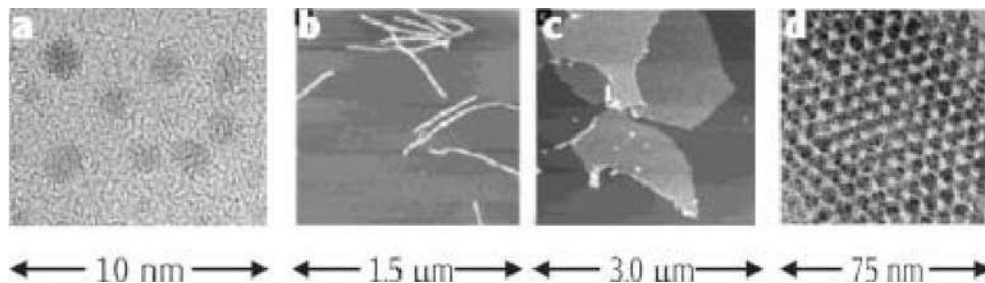


Figura 1.2. Clasificación de nanomateriales: a) nanopartículas de oro; b) 1-D, Fibras poliméricas; c) 2-D, películas poliméricas y d) 3-D, superred obtenida por autoensamblaje de partículas de oro [Gutiérrez-Wing., C., et al., 2001].

Aunque el interés por el estudio de los nanomateriales surgió con gran fuerza en las últimas décadas, han existido por siempre. Algunos ejemplos son las partículas de humo y las nanopartículas dentro de las bacterias.

En algunas civilizaciones antiguas se utilizaban aprovechando sus propiedades ópticas y medicinales. Las nanopartículas metálicas en particular, poseen propiedades interesantes con aplicaciones en diversas áreas tecnológicas. Por ejemplo en medicina se utilizan en gasas para quemaduras serias o heridas crónicas.

Estas gasas están recubiertas de nanopartículas de plata y la plata es un bactericida, que en forma de nanopartículas incrementa el área superficial mejorando la eficiencia antibacteriana contra organismos patógenos como lo son *Escherichia Coli*, *Shigella Boydii*, *Salmonella Arizona*, *Listeria Monocytogenes*, *Haemophilus Influenzae*, *Moraxella Guanajuatensis*, *Enterobacter Aerogenes*, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Klebsiella Pneumoniae* [Guozhong, C., et al., 2004], incluyendo los resistentes a drogas. Se utilizan actualmente en más de 100 de los 120 hospitales para quemados en Norteamérica [Herndon, D, N., et al., 2012]. En el área de deportes se utilizan las nanopartículas metálicas en pelotas de golf para corregir vibraciones y pequeños corrimientos, en pelotas de tenis recubiertas de nanopartículas para alargar su duración [Domínguez-Domínguez, S., et al., 2011]. En el área de la higiene se utilizan en desinfectantes de grado militar, en los aviones para combatir el problema del SARS (síndrome respiratorio agudo severo) a base de nanoemulsiones [Guozhong, C., et al., 2004].

Respecto a sus primeros usos puede citarse el caso de la cultura egipcia, que empleaba nanopartículas de oro como coloides medicinales para conservar la juventud y mantener buena salud (actualmente se siguen utilizando para tratamientos de artritis). La civilización china, además de utilizarla con fines curativos, también las empleaba como colorantes inorgánicos en porcelanas [Guozhong, C., et al., 2004].

Un caso de gran interés es el vaso *Lycurgus*, creado por los romanos en el siglo IV D.C, que quizás por accidente contenía nanopartículas. Este vaso aún se muestra en exhibición en el Museo Británico y tiene una característica muy

interesante: su color es verde si la luz con la que se observa es reflejada, y cambia a rojo si la luz es transmitida a través de él (figura 1.3).



Figura 1.3. Vaso de Lycurgus. Compuesto de vidrio con nanopartículas metálicas. Vista con a) luz reflejada, y b) luz transmitida [Rao., et al., 2007].

El análisis de este vaso muestra que está compuesto de una matriz de vidrio que contiene una pequeña cantidad de nanopartículas metálicas (de ~70 nm) de oro y plata en una relación molar aproximada de 14:1, y estas son las responsables de este fenómeno óptico [Marzan, L. L., et al., 2004]. Aun cuando se tenían antecedentes de la utilización de nanopartículas metálicas, no es hasta 1857 que Faraday realiza el primer estudio sistemático de nanopartículas, presentando un estudio de la síntesis y propiedades de coloides de oro [Turkevich, J. P., et al., 1951].

Desde esa época hasta la fecha, se han logrado grandes avances en el conocimiento de las nanopartículas metálicas. Se han desarrollado diversos métodos de síntesis químicos y físicos, con la finalidad de poder diseñar sus dimensiones, forma, composición y modificadores de superficie, buscando con esto controlar su comportamiento frente a diversos estímulos [Singh, H., et al., 2001].

Asimismo, se ha profundizado en el conocimiento de su estructura electrónica con base en el número de átomos que las conforman, y su efecto en las propiedades del material.

A medida que la dimensión de las partículas se reduce, sobre todo en el intervalo de 1 a 10 nm los efectos de tamaño y de su superficie son cada vez más notables. Entre los efectos de tamaño más importantes, se ha determinado el confinamiento de los electrones, y esto en nanopartículas metálicas y semiconductoras tiene interesantes implicaciones, como es la manifestación de efectos cuánticos en el material, que pueden percibirse a través de sus propiedades magnéticas y/o de conducción eléctrica. Por ejemplo, así como de algunas propiedades termodinámicas, como la capacidad calorífica. Es por esto que a este tipo de partículas se les ha conocido también como puntos cuánticos [Borovitskaya, E., et al., 2002].

Por otra parte, también los efectos de superficie son de gran importancia, ya que se tiene en las partículas pequeñas un incremento en áreas superficiales por unidad de volumen y en energías libres superficiales respecto los sólidos volumétricos [Israelachvili, J., 2011]. Debido a que los átomos en la superficie de la nanopartícula están menos “enlazados” que el resto de sus átomos, y su esfera de coordinación está incompleta, se incrementa su energía libre superficial, afectando propiedades como su temperatura de fusión y su reactividad química. Se ha reportado por ejemplo, que la temperatura de fusión de nanopartículas de Pt se reduce de 1773 °C en un sólido volumétrico a 600 °C en nanopartículas de 8 nm en promedio [Israelachvili, J., et al., 2011].

1.4.2 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA

Entre los diversos tipos de nanopartículas que han sido sintetizadas a lo largo de los últimos años, las nanopartículas de plata han sido objetos de numerosas investigaciones debido a sus propiedades ópticas y electrónicas, además de la estabilidad química que presentan.

Prueba de ello es el aumento exponencial en la cantidad de publicaciones relacionadas con nanopartículas de plata en la última década como se muestra en la figura 1.4.

Las nanopartículas de plata son conocidas principalmente por su efecto antibacterial, por lo cual son ampliamente utilizadas en dispositivos médicos, productos de consumo del área de la salud y la industria textil [Tolaymat., et al., 2010].

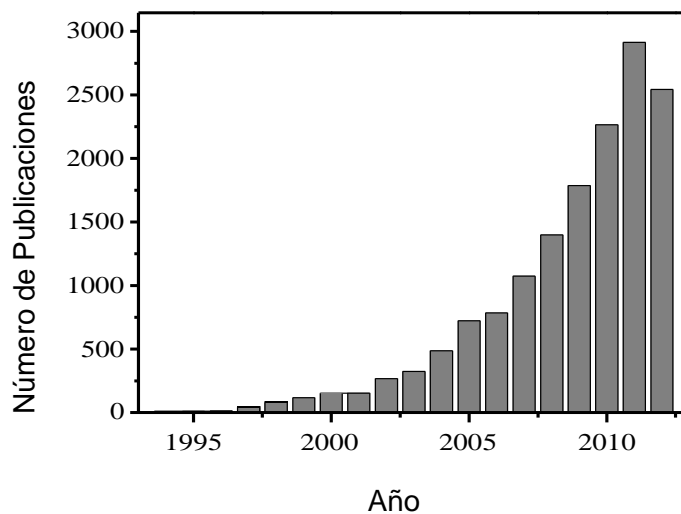


Figura 1.4. Publicaciones relacionadas con “Nanopartículas de plata”. Fuente: www.scopus.com

Las nanopartículas metálicas pueden ser preparadas mediante dos rutas, la primera es utilizando un enfoque físico que utiliza diferentes métodos como evaporación-condensación y ablación laser.

El segundo es utilizando un enfoque químico en el cual iones metálicos en solución son reducidos en condiciones específicas favoreciendo la subsecuente formación de pequeños grupos o agregados [Sondi, I., 2004]. En la figura 1.5 se puede ver la comparación esquemática de ambas técnicas.

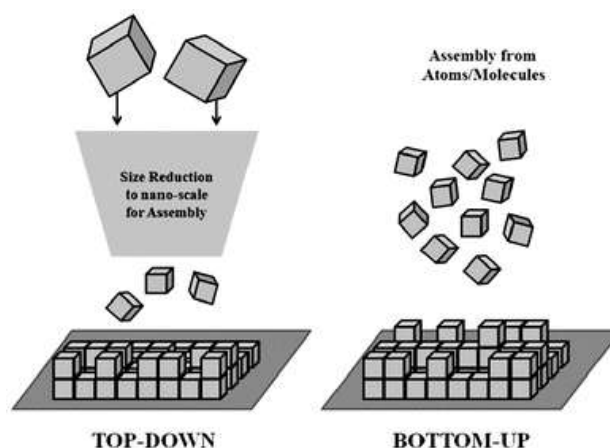


Figura 1.5. Métodos principales de síntesis de nanopartículas [Biol., et al., 2013].

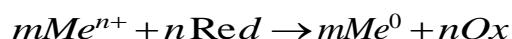
a) Síntesis por métodos físicos

En los métodos físicos, las nanopartículas metálicas son generalmente sintetizadas mediante evaporación-condensación, este proceso se puede llevar a cabo utilizando un horno de tubo a presión atmosférica. Nanopartículas de varios materiales como oro, plata, sulfuro de plomo y fullerenos han sido producidos previamente utilizando este proceso [Kholoud M. M., et al., 2010]. La principal desventaja de los métodos físicos es debido al costo y en la complejidad de los equipos requeridos, además del pobre control en la forma y tamaño de las partículas [Kholoud M. M., et al., 2010].

Por otra parte, una de las principales ventajas de estos métodos es la pureza del producto final, la cual depende únicamente del material precursor utilizado. Entre los métodos físicos más utilizados se encuentran: Condensación por Gas Inerte, Arco Eléctrico, Pulverización Catódica, Pirólisis y Molienda Mecánica.

b) Síntesis por métodos químicos

La reducción química es el método más frecuentemente aplicado para la preparación de nanopartículas de plata como dispersiones coloidales estables, en agua o disolventes orgánicos. Los reductores orgánicos más utilizados son el borohidruro, citrato, ascorbato e hidrógeno elemental. La reducción de iones Ag^+ en solución acuosa generalmente produce plata coloidal con diámetros de partícula de varios nanómetros [Kholoud M. M., et al., 2010]. Una de las principales características de los procesos químicos es su versatilidad, ya que por medio de ellos ha sido posible sintetizar diferentes materiales nanoestructurados en sólidos embebidos, líquidos o espumas. La principal desventaja de los métodos químicos, es que debido a la presencia de diferentes agentes químicos es necesario implementar etapas de purificación después de la síntesis. Entre los métodos químicos más comunes se encuentran: Reducción Química, Electroquímica, Micelas Inversas, Reducción Fotoquímica, Radiolítica, Sonoquímica, Termólisis [Kholoud M. M., et al., 2010], etc. Sin duda alguna, la reducción química es el método de síntesis más ampliamente utilizado debido tanto a su factibilidad técnica como económica. La reducción de especies metálicas oxidadas a átomos neutros, que son los elementos constituyentes de las partículas metálicas, es el resultado de reacciones redox en las cuales los electrones de un agente reductor son transferidos a la especie metálica de acuerdo a la siguiente reacción [Goia., et al., 1998]:



Faraday en 1850 fue el primero en reportar el uso de este método de síntesis en la producción de coloides de oro.

En la década de los 1950's, Turkevich estableció las primeras metodologías reproducibles para la síntesis de partículas de oro mediante la

reducción química del ión AuCl_4^- utilizando citrato de sodio como reductor [Turkevich, J. P., et al., 1951].

c) Síntesis de nanopartículas de plata a partir de complejos cianurados

En esta sección se describe el método propuesto por Armando López Miranda [López Miranda, A., et al., 2013] para sintetizar nanopartículas de plata a partir de complejos cianurados, utilizando un método de reducción química en el que se basa el presente trabajo para la producción de las nanoestructuras de nanopartículas de plata.

Los materiales y equipos utilizados para la síntesis fueron los siguientes:

- Agente precursor: El agente precursor utilizado fue el complejo dicianoargentato $\text{Ag}(\text{CN})_2^-$, el cual fue preparado a partir de nitrato de plata (AgNO_3), marca Fermont de pureza 99.2 %, y de cianuro de sodio (NaCN) J.T. Baker.
- Solución reguladora de pH: Hidróxido de sodio (NaOH), marca J.T. Baker. Soluciones 0.1 M y 0.01 M.
- Agente estabilizador: El principal estabilizador utilizado en esta síntesis fue el dodecil sulfato de sodio ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4\text{Na}$), marca Caledón y pureza 99.5%. Es un compuesto orgánico de cadena hidrocarbonada de 12 carbonos y un grupo polar de sulfato.
- Agente reductor: El agente reductor utilizado en esta etapa de la investigación fue: Sulfito de sodio (Na_2SO_3): Marca JT. Baker. Pureza 98.2%.
- Bomba de infusión: KdScientific modelo KDS100.
- Equipo de Laboratorio: matraz redondo de 500 ml de tres bocas esmeriladas Pyrex 24/40, condensador Graham esmerilado Pyrex 24/40, tapones de teflón con o-ring, agitadores magnéticos y demás cristalería de uso general.

- Agua desionizada: Todas las soluciones acuosas fueron preparadas con agua desionizada con una resistividad de 18 Megaohm/cm y fue obtenida después de pasar agua destilada por un desionizador marca Barnstead E-Pure.
- Parrilla de calentamiento: Fisher Scientific modelo Isotemp®.

El arreglo experimental utilizado se muestra en la figura 1.6 utilizando 100 ml como volumen total del sistema.



1. Matraz redondo esmerilado de tres bocas.
2. Parrilla de calentamiento.
3. Baño de glicerina.
4. Condensador Graham esmerilado.
5. Tapón de eteflón con o-ring.

Figura 1.6. Arreglo experimental utilizado en la síntesis de nanopartículas a partir del complejo cianurado.

Las concentraciones utilizadas de los reactivos fueron seleccionadas de acuerdo al diagrama de especiación Ag-CN, mostrado en la figura 1.7. El diagrama permite conocer que forma del compuesto predomina de acuerdo al pH del medio en el que se encuentra, se utiliza para identificar la formación de especies sólidas o cristalinas.

Básicamente el método de preparación óptimo del precursor, consistió primeramente en la disolución del AgNO_3 durante 5 minutos aproximadamente.

Posteriormente se modificó el pH de la solución con NaOH, donde la solución cambió de color, de incoloro a amarillo fuerte, indicando la formación de hidróxidos de plata. Finalmente se agregó el NaCN en forma sólida, tornándose la solución totalmente clara. Cabe destacar la importancia de que la adición del NaCN al sistema, una vez ajustado el pH, sea lo más rápido posible para evitar la formación de precipitados de óxido de plata, los cuales son muy difíciles de disolver nuevamente.

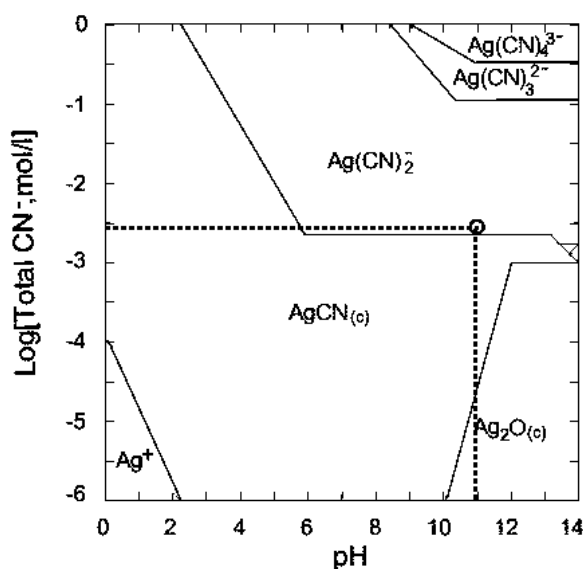


Figura 1.7. Diagrama de especiación Ag-CN. 1×10^{-3} M $AgNO_3$, $25^\circ C$.

Una vez que fue preparado el precursor, se agregó el SDS en forma sólida (4×10^{-3} M) y la solución permaneció en agitación por 10 minutos más. Posteriormente, el sistema se sometió a calentamiento, hasta ebullición, en el baño de glicerina, a una temperatura aproximadamente de $97^\circ C$.

Una vez que el sistema alcanzó dicha temperatura, se agregó en forma controlada el agente reductor a través de la bomba de infusión, comenzando de esta forma la reacción química.

1.4.3 CARACTERIZACIÓN

La caracterización tiene por objetivo revelar las características físicas y químicas del material que se sintetiza como su tamaño, forma, textura y composición. Algunas de las técnicas más utilizadas en la caracterización de nanomateriales y en específico de las nanopartículas son las siguientes:

- Espectroscopía Uv-Vis
- Microscopía Electrónica de Transmisión
- Microscopía Electrónica de Barrido
- Microscopía de Fuerza Atómica
- Espectroscopía Infrarroja y Ramán
- Difracción de Rayos X
- Dispersión de Luz Dinámica
- Potencial Zeta

Se utiliza además la microscopía electrónica de transmisión para llevar a cabo un análisis de forma y tamaño de las nanopartículas utilizando los programas ImageJ y Origin 8.

a) Espectroscopía Uv-Vis

Las nanopartículas metálicas, como las de oro y plata, tienen la característica de interactuar de manera muy importante con ciertas longitudes de onda de la luz. Esta interacción provoca la aparición de una banda de absorción característica en el rango visible del espectro electromagnético, llamada banda de resonancia de plasmón superficial (SPR por sus siglas en inglés).

La aparición de la banda de SPR es el resultado de la interacción de la radiación electromagnética incidente sobre la superficie de las nanopartículas con los electrones de conducción del metal [Krutzyakov, Y. A., et al., 2008].

De todos los metales, la plata tiene la banda más intensa, la cual aparece generalmente en un rango de 380 a 490 nm y se muestra en la figura 1.8, su forma depende de diversos factores como el tamaño, la forma y las condiciones de reacción utilizadas [Rao and Trivedi., et al., 1993].

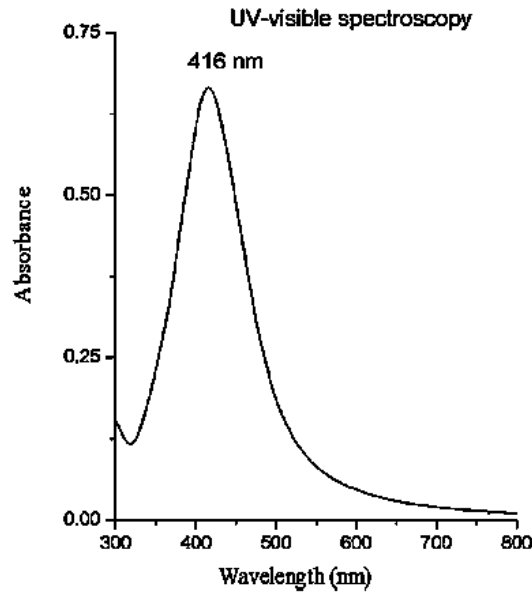


Figura 1.8. Plasmón de resonancia superficial característico de las nanopartículas de plata en la región Uv-Vis [Manikam., et al., 2011].

Para partículas mayores de 50 nm, al igual que para partículas “faceteadas” denominadas “nanodiscos” pueden aparecer otros modos de excitación del plasmón como el cuadrupolar, en el cual la mitad de la nube de electrones se mueve de forma paralela al campo aplicado y la otra mitad de forma perpendicular [Kelly., et al., 2003]. Este es acompañado por la aparición de bandas de SPR adicionales en el espectro Uv-Vis característico [Krutyakov., et al., 2008].

Ninguna de estas resonancias características se observan en partículas menores de 2 nm así como tampoco en partículas micro a macrométricas [Goakov, Y.A., et al., 2008].

En el caso de las partículas menores de 2 nm, debido a la pequeña cantidad de átomos que conforman la nanopartícula, los espacios entre los niveles adyacentes de energía (denominados como *gap*) se vuelven comparables a la energía térmica, kT , especialmente a temperaturas bajas. Esto resulta en un cambio en las propiedades conductoras del material, de metálico a semiconductor e incluso aislante [Fahlman., 2008].

Para partículas micrométricas el plasmón de superficie tampoco puede ser observado debido a la gran cantidad de átomos presentes, lo cual ocasiona un solapamiento de los orbitales moleculares formando una banda continua de conducción, característica de los elementos metálicos. Por lo que al disminuir el tamaño de la partícula, la banda continua de energía del material micro es transformada en un conjunto de niveles discretos de energía.

Debido a estas características, la espectrofotometría Uv-Vis es una herramienta muy importante para la identificación, caracterización y estudio de este tipo de partículas. La técnica es utilizada para cuantificar la luz que es absorbida y dispersada por una muestra. En su forma más simple, una muestra es colocada entre una fuente de luz y un fotodetector, midiéndose la intensidad del haz de luz antes y después de su paso a través de la muestra.

Cada espectro es corregido utilizando un “blanco”, es decir el espectro únicamente del medio de dispersión, para garantizar que las características espectrales de la muestra de estudio no estén alteradas por las del medio de dispersión.

La fuente de radiación UV es una lámpara de deuterio o de hidrógeno, las cuales emiten radiación en el rango de 160 a 375 nm. En el caso del visible, se trata de una lámpara de tungsteno la cual puede ser utilizada en un rango de longitudes de onda de 350 a 2500 nm.

Los recipientes para las muestras o celdas deben de estar contruidos por un material que deje pasar la radiación de la región espectral de interés.

Para trabajar en la región ultravioleta (debajo de 350 nm) se requiere cuarzo o sílice fundida. En la región visible pueden utilizarse recipientes de vidrio o de plástico y el mismo cuarzo. La figura 1.9 muestra las curvas de SPR para nanopartículas sintetizadas a diferentes concentraciones de SDS, donde además se muestra el valor de λ_{\max} para cada una de las curvas. En la figura 1.9 se puede observar que la banda correspondiente al plasmón de resonancia en 350 nm disminuye con la concentración de SDS. Esto indica que las partículas con tamaño menor a 50 nm se forman en mayor proporción al incrementar la concentración del estabilizador.

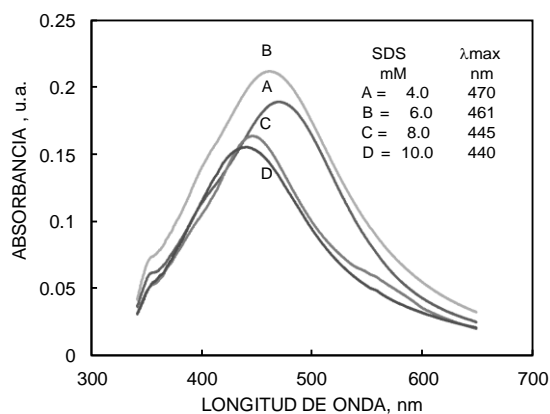


Figura 1.9. Curvas SPR de las nanopartículas sintetizadas a diferentes concentraciones de SDS. 1×10^{-3} M AgNO_3 y 4.5×10^{-4} M Na_2SO_3 a $90 \mu\text{mol}/\text{min}$ [López Miranda, A., 2013].

b) Microscopía electrónica de transmisión

La interacción de los electrones con la materia es un fenómeno complejo de múltiples efectos, los cuales son controlados mediante las técnicas apropiadas y así aprovechados para conocer la estructura interna de los materiales.

La técnica de microscopía electrónica de transmisión se ocupa de la información contenida en aquellos electrones que traspasan una muestra sólida sobre la que se ha hecho incidir un haz electrónico coherente y a gran velocidad.

La distribución heterogénea de densidad electrónica presente en la muestra provoca en la radiación transmitida la formación de imágenes de interferencia, que adecuadamente interpretadas, revelan sus características morfológicas y estructurales.

Este es así mismo el fundamento de la microscopía óptica y el avance que supone la microscopía electrónica respecto a ella es en última instancia una consecuencia de la distinta naturaleza de la radiación que se emplea en cada caso. Debido al fenómeno de difracción inherente a toda interacción onda-materia, la resolución que se consigue en el análisis microscópico viene limitada por la longitud de la radiación empleada. Para el fotón esta cota se encuentra alrededor de los 200 nm mientras que para el electrón, con una longitud de onda del orden de 10^4 - 10^5 veces más pequeña, llega a ser inferior a los 0.2 nm. El desarrollo de instrumentos precisos y provistos de eficaces dispositivos correctores ha conseguido establecer este nivel de resolución como especificación típica de los microscopios electrónicos que se comercializan en la actualidad. La microscopía electrónica se configura así como una técnica capaz de resolver estructuras a nivel atómico. Aunque la microscopía electrónica de transmisión ha encontrado su máxima expresión en la observación de materiales biológicos, su papel en el estudio de la estructura de materiales tecnológicos es sin duda alguna sobresaliente y hoy en día se le considera indispensable en este sentido. Metales, cerámicos y polímeros vienen siendo explorados con el microscopio electrónico como único medio para conocer la relación entre la morfología y la estructura a nivel atómico o molecular.

Los electrones que se transmiten a través de la muestra sobre la que se ha hecho incidir un haz electrónico coherente se catalogan en tres tipos:

- a) Electrones no desviados con cinética idéntica a la de los incidentes.
- b) Electrones desviados elásticamente.
- c) Electrones inelásticos, que son desviados cediendo parte de su energía a la muestra.

Los electrones no desviados y los elásticos son los únicos que contribuyen constructivamente a la formación de la imagen. La fracción inelástica es por otra parte la responsable del ruido de fondo presente en toda imagen de microscopía electrónica. Una parte de los electrones rebotan o son absorbidos por el objeto y otros la atraviesan formando una imagen aumentada de la muestra sobre una pantalla fluorescente. El esquema general de un TEM se muestra en la figura 1.10.

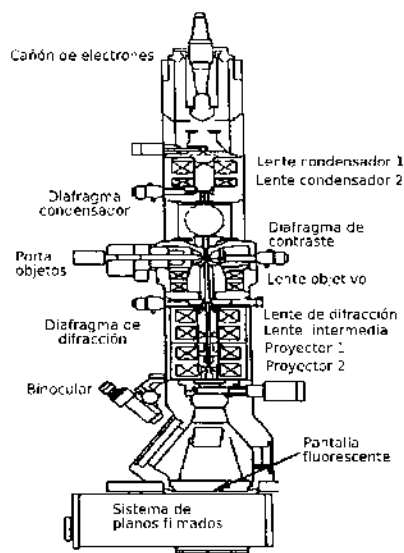


Figura 1.10. Esquema general de un microscopio electrónico de transmisión.

Utilizando esta técnica se puede obtener información estructural específica de la muestra según las pérdidas específicas de los diferentes electrones del haz. Se puede evaluar detalladamente las estructuras físicas y biológicas proporcionando 1, 200,000 aumentos sobre la muestra.

1.4.4 Aplicaciones y usos actuales en medicina y biología de las nanopartículas de plata

Como ya se ha mencionado, las partículas metálicas de tamaño nanométrico muestran propiedades físicas y químicas únicas, que además permiten la creación de nuevos materiales, herramientas y sistemas de nano tamaño con múltiples aplicaciones en física, biología, medicina y química, entre otras áreas.

En medicina, Lee, H. Y., y colaboradores [Lee, H. Y., et al., 2007], desarrollaron un método de síntesis para depositar nanopartículas en tela de algodón para aplicaciones biomédicas y análisis de irritación de piel en cerdos de nueva guinea. La síntesis se basó en introducir tela de algodón en una solución etanólica de nitrato de plata y butilamina, esto produjo que iones Ag^+ fueran absorbidos en los grupos funcionales OH^- que se encuentran en la superficie de la tela de algodón actuando como semillas para la deposición de Ag reducida. En la figura 1.11, se muestra un esquema propuesto por los autores que muestra el mecanismo de la deposición de iones plata. La tela de algodón se cortó en pequeñas partes de 2.5 cm x 2.5 cm x 4 mm para su recubrimiento con nanopartículas.

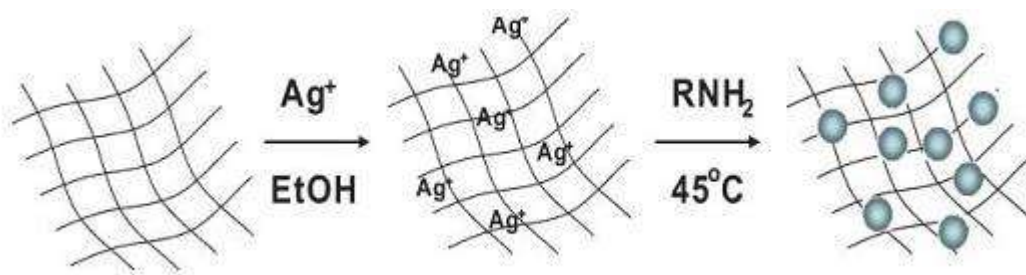


Figura 1.11. Deposición práctica y robusta de nanopartículas de plata en tela de algodón.

Después de ser recubiertas las telas de algodón, se procedió a realizar un estudio de su efecto bactericida en presencia de la bacteria *E. Coli* resistente a la ampicilina en caldo Luria-Bertani, utilizando la espectroscopía Uv-Vis como

método de análisis del crecimiento de la población bacteriana. La resistencia a antibióticos se introdujo en el cultivo de *E. Coli* por transformación del plásmido pGEX-2T con el gen resistente a la ampicilina. Los autores llevaron a cabo el estudio colocando las telas recubiertas de nanopartículas a diferentes concentraciones en celdas que contenían la bacteria inoculada en caldo Luria-Bertani y se introdujeron en el equipo donde se hizo un barrido durante 4 horas. De los espectros de absorbancia que obtuvieron se realizaron gráficas de curvas de tiempo vs absorbancia como la que se muestra en la figura 1.12. Esta figura, muestra el comportamiento del crecimiento de la población de bacterias con y sin nanopartículas de plata, en el eje y se encuentra la absorbancia y en el eje x el tiempo.

En la gráfica se muestran 5 curvas, la curva etiquetada como control indica el comportamiento del crecimiento de la población de bacterias en el medio de cultivo sin la presencia de nanopartículas. La curva etiquetada como A, muestra el crecimiento de la población de bacterias en el medio de cultivo con tela de algodón sin nanopartículas, se puede observar que no hay inhibición en el crecimiento de la bacteria. La curva etiquetada como B corresponde a bacteria en el medio de cultivo con 30 mg de tela de algodón recubierta de nanopartículas de plata, la curva muestra que con esa cantidad se inhibió en un 33 % el crecimiento de la bacteria. La curva etiquetada como C, la cual contiene 50 mg de tela de algodón recubierta, muestra que aumento la inhibición del crecimiento de la bacteria hasta un 55 %. La inhibición total del crecimiento de la bacteria se puede ver en la curva D, la cual contiene 70 mg de tela recubierta de nanopartículas de plata. Concluyeron que la inhibición al 100% de la bacteria *E. Coli* resistente a la ampicilina solo se logra utilizando 70 mg de tela de algodón recubierta de nanopartículas.

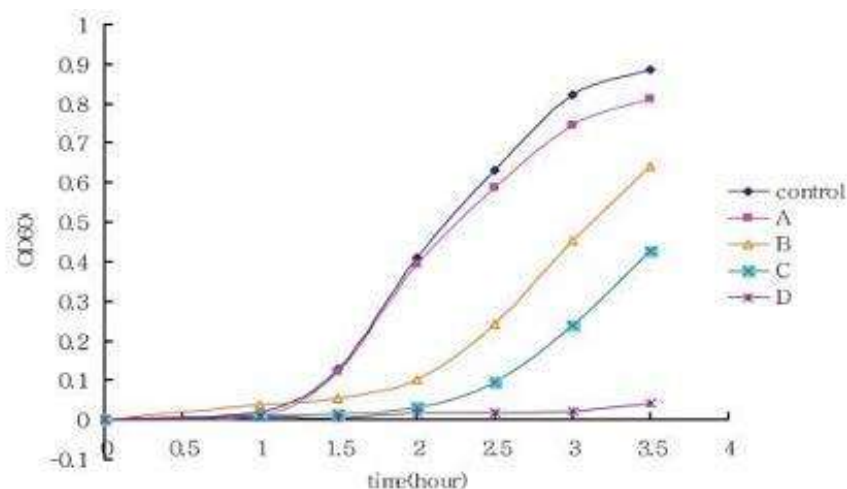


Figura 1.12. Curva de crecimiento en medio líquido Luria-Bertani con *E. Coli*, muestra A tela de algodón sin recubrimiento, B 30 mg de plata, C 50 mg de plata y D 70 mg de plata.

Por último realizarán pruebas de irritación de piel en puercos de nueva guinea a los que se les afeito la espalda y se les colocó una muestra de tela recubierta por nanopartículas. Los autores observaron que la tela no causaba irritación o edema alguna, por lo que concluyeron que la tela de algodón recubierta por nanopartículas de plata es útil en quemaduras o cortes por su propiedad antiséptica.

En otro estudio Jain, P., y colaboradores [Jain, P., et al., 2004], realizaron un análisis del efecto bactericida de espuma de poliuretano recubierta por nanopartículas de plata para utilizarla como filtro de agua potable, donde la contaminación bacteriana del agua es un riesgo para la salud humana.

El método de síntesis de nanopartículas de plata usado por estos autores se realizó a partir de una solución de nitrato de plata a 5 mM como agente precursor, calentada hasta ebullición. Entonces se agregó 5 ml al 1% de una solución de citrato de sodio como agente reductor y se continuó con calentamiento hasta que el color fue amarillo pálido. Este cambio de coloración se debe a la formación de nanopartículas de plata. Después la solución se enfrió

a temperatura ambiente y se caracterizaron las nanopartículas mediante espectroscopia Uv-Vis, la que confirmó su presencia mediante la aparición del Plasmón de Resonancia Superficial característico.

La espuma de poliuretano se recortó en tamaños de 20 cm x 25 cm y 8 mm de grueso y se introdujo en la solución de nanopartículas durante toda la noche, transcurrido este proceso se observó un cambio de coloración de blanca a amarilla debido a la presencia de las nanopartículas de plata. Esto se puede observar en la figura 1.13, que muestra dos imágenes, la imagen A, muestra la espuma de poliuretano sin nanopartículas y la B con nanopartículas.

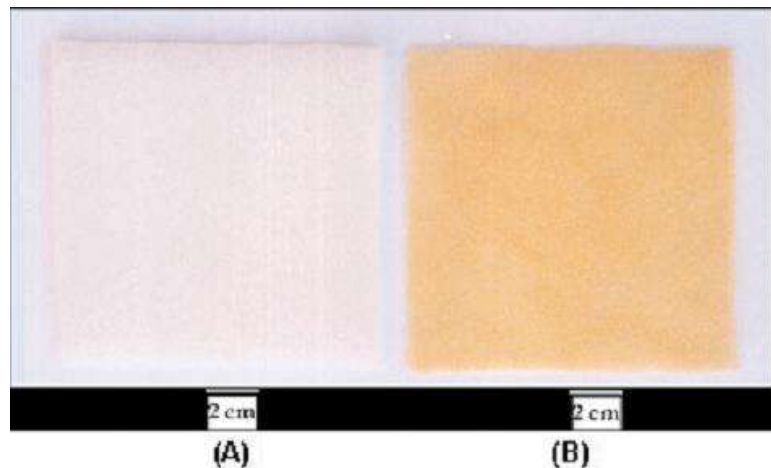


Figura 1.13. (A): Espuma de poliuretano sin nanopartículas. (B): Espuma de poliuretano con nanopartículas. El color amarillo dorado en B, es debido a la saturación de la cobertura por las nanopartículas de plata.

Para comprobar el efecto bactericida de la espuma recubierta de nanopartículas de plata, se tomaron muestras de 10 ml de una suspensión de *E. Coli* en agua destilada y se colocaron en tubos de ensayo esterilizados. Después, espuma de poliuretano de dimensiones 1 cm x 9 cm x 0.6 cm se introdujo en cada uno de los tubos de ensayo. Después de 5 y 10 minutos, se tomaron las muestras de espuma de los tubos y se colocaron en tubos vacíos.

Las espumas fueron exprimidas para retirarles el agua, que posteriormente se utilizó para hacer un revestimiento utilizando el método de dilución en serie para 10^0 , 10^{-2} , y 10^{-4} con agar nutritivo y m-Endo agar. El revestimiento se hizo también para el conteo inicial de unidades formadoras de colonias (CFU) y de solución con espuma de poliuretano sin nanopartículas. Por cada dilución, se inocularon 10 μ L. El revestimiento se hizo por el método de vertido en placa. Las cajas Petri que contenían las bacterias fueron incubadas a 37 °C por 24 horas.

La figura 1.14 muestra los resultados obtenidos del análisis, dichos resultados mostraron, que después de un tiempo de contacto de 5 y 10 minutos con la espuma de poliuretano recubierta con nanopartículas de plata, no se detectó la presencia de la bacteria en el agua. Se observó que el conteo de CFU fue de cero para todas las diluciones. Observaron un crecimiento sustancial de la bacteria cuando solo se utilizó la espuma sin nanopartículas.

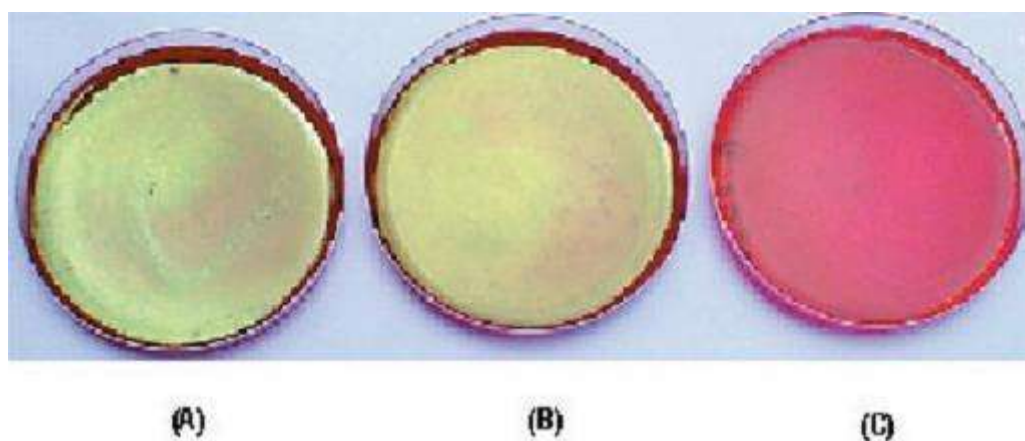


Figura 1.14. Resultados de prueba de tubo para una solución 10^{-2} de *E. Coli* durante 5 minutos de exposición. A) Inicio de exposición, B) Después de exposición a la pura espuma de poliuretano, C) Después de exposición a la espuma de poliuretano recubierta por nanopartículas de plata. El brillo característico de la *E. Coli* es claramente visible en A y B, mientras que el recuento de bacterias fue de cero en C.

Kim, K. J., y colaboradores [Kim, K. J., et al., 2008] realizaron un estudio para investigar el efecto antifúngico de nanopartículas de plata esféricas en 44

tipos de hongos patógenos de la piel, como son: *C. Albicans*, *C. Tropicalis* y *C. Krusei*. La forma de hacerlo fue:

Primeramente sintetizaron las nanopartículas partiendo de 100 g de plata disuelta en 100 ml de ácido nítrico al 100 % a 90 °C, después se vertió en 1 L de agua destilada. Al añadir cloruro de sodio a la solución los iones de plata se reducen y se autoensamblan formando nanopartículas dispersas en el medio acuoso. Debido a que la concentración de plata coloidal era de 60,000 ppm, la solución fue diluida, y se tomaron muestras a distintas concentraciones para investigar el efecto antifúngico de las nanopartículas de plata.

El efecto antifúngico se comprobó en la transición dimórfica de las bacterias analizadas, por ejemplo de la bacteria *C. Albicans* de su forma levaduriforma en su forma micelial. La *C. Albicans* es una bacteria comensal que reside en las membranas mucosas de las cavidades oral y vaginal, así como en el tracto gastrointestinal del ser humano. Normalmente es inofensiva en el huésped sano, pero su patogenicidad se dispara en el huésped inmunocomprometido. Puede adoptar distintas formas, pero su forma micelial es considerada más virulenta [Panizo, M. M., et al., 2001]. Las células de *C. Albicans* se mantuvieron mediante subcultivo periódico en un medio de levadura líquida de extracto/peptona/dextrosa (YPD por sus siglas en inglés). Cultivos de levadura (blastoconidios) se mantuvieron en un medio de levadura líquida (YPD) a 37 °C, para inducir la formación micelial, los cultivos se suplementaron directamente con 20 % de suero bovino fetal (FBS por sus siglas en inglés). La transición dimórfica de *C. Albicans* fue investigada usando cultivos que contenían 2 µg/ml de nanopartículas de plata, que fueron incubados por 48 horas a 37 °C, la transición fue detectada mediante un microscopio de contraste de fases (Nikon, Eclipse TE 300, Tokio, Japón). Los autores observaron que la transición dimórfica de esta bacteria es responsable de la patogenicidad, encontrando formas de micelio predominantemente durante la invasión al tejido huésped.

La figura 1.15 muestra tres imágenes, en la imagen A se observa la *C. Albicans* en su forma levaduriforma sin 20 % de FBS y nanopartículas. La

imagen B muestra a la *C. Albicans* en su forma micelial. La transición de la forma micelial fue inhibida de forma significativa en presencia de las nanopartículas de plata, esto se observa en la imagen C, pero la micelial formada era normal en la ausencia de las nanopartículas (imagen B). Estos resultados les sugirieron que las nanopartículas de plata son un componente potencial en el tratamiento de enfermedades infecciosas fúngicas.

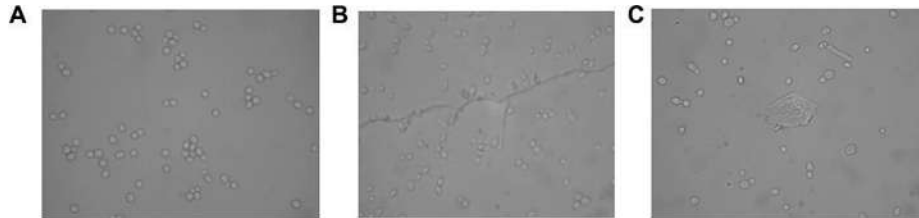


Figura 1.15. El efecto de nanopartículas de plata en la transición dimórfica de *C. Albicans*. A) Control de levadura sin 20 % de FBS y nanopartículas, B) Sin nanopartículas de plata, C) Con 2 $\mu\text{g/ml}$ de nanopartículas de plata [Kim, K. J., et al., 2008].

En otro estudio, la actividad antimicrobiana de nanopartículas de plata contra la *E. coli*, se investigó como un modelo para las bacterias Gram negativa. Sondi, I., y colaboradores [Sondi, I., et al., 2004], llevaron a cabo pruebas bacteriológicas utilizando el medio de cultivo Luria-Bertani, el cual se utiliza para el crecimiento de bacterias en muestras de agar sólido y sistemas líquidos, suplementados con diferentes concentraciones de nanopartículas de plata de tamaño nanométrico.

Las nanopartículas se prepararon a partir de 90 cm^3 de una solución que contiene 5% en peso de Daxal 19 y nitrato de plata con una concentración de 0.33 mol/dm^3 . Después se colocó en agitación y se le agregó 10 cm^3 de una solución de ácido ascórbico 1 mol/dm^3 a una velocidad de 3 cm^3/min . Posteriormente se aumentó la agitación a 900 rpm a temperatura ambiente. Para remover el surfactante y el exceso de iones de plata, el precipitado de plata fue lavado cinco veces con agua desionizada.

Finalmente, las nanopartículas fueron obtenidas en forma de polvo seco, el cual se redispersó en agua desionizada mediante sonicación y se prepararon soluciones acuosas a distintas concentraciones.

Para examinar el efecto bactericida de las nanopartículas de plata en bacterias Gram negativa, realizaron dos estudios. En el primero se tomaron aproximadamente 10^5 CFU de cepas de *E. Coli* y se cultivaron en cajas Petri que contenían agar Luria-Bertani suplementadas con nanopartículas de plata a concentraciones de 10 a $100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$. Las cajas Petri fueron incubadas durante 24 horas a 37°C y se contó el número de colonias. El segundo estudio consistió en examinar la tasa de crecimiento bacteriano y determinar la curva de crecimiento en presencia de nanopartículas cultivando la bacteria *E. Coli* en 100 cm^3 de caldo Luria-Bertani con 10, 50 y $100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ y utilizando espectroscopía Uv-Vis. Las curvas de crecimiento que se hicieron a distintas concentraciones fueron determinadas mediante densidad óptica (DO) a 600 nm cada 30 minutos (DO de 0.1 corresponde a una concentración de 10^8 células por cm^3).

La figura 1.16, muestra el número de colonias que crecieron en las cajas Petri como función de la concentración de nanopartículas de plata. La presencia de estas nanopartículas a una concentración de $10 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ inhibió el crecimiento de la bacteria en un 70 %. El tamaño de las colonias bacterianas crecidas en las cajas con más de $20 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ de nanopartículas fue significativamente reducido y las colonias fueron localizadas en su mayoría en las orillas de las cajas Petri. Concentraciones de 50 a $60 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ causaron el 100 % de inhibición de crecimiento de la bacteria.

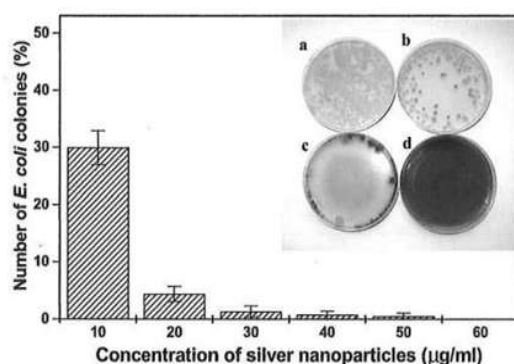


Figura 1.16. Número de colonias de *E. Coli* como una función de la concentración de nanopartículas de plata en placas de agar LB expresada como un porcentaje del número de colonias crecidas exentas de plata en placas. La figura muestra placas con Luria-Bertani a diferentes concentraciones de nanopartículas de plata: (a) 0, (b) 10, (c) 20 y (d) $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ [Ivan Sondi et al, 11].

La figura 1.17, muestra una gráfica donde aparecen cuatro curvas que corresponden al crecimiento de bacteria *E. Coli* en medio líquido en presencia de distintas concentraciones de nanopartículas. La gráfica de cuados blancos corresponde solamente al crecimiento de la bacteria en el medio de cultivo. La gráfica de círculos negros corresponde a bacteria en el medio de cultivo con 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ de nanopartículas, esta cantidad inhibió el crecimiento en un 8.5 %. La gráfica de triángulos negros corresponde a bacteria en el medio de cultivo con 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, esta cantidad inhibió el crecimiento en un 20 %, la curva de cuadros negros contiene 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ e inhibo el crecimiento hasta un 55 %.

De esta gráfica concluyeron, que las nanopartículas de plata en medio líquido incluso a altas concentraciones causaban solo retraso en el crecimiento de la bacteria. Esto se debe a que la concentración de las nanopartículas gradualmente disminuye ocasionando que se reanude el crecimiento de las células bacterianas.

Este proceso es regido por la interacción de estas nanopartículas con sustancias intracelulares de las células destruidas, causando su coagulación y eliminación del sistema líquido.

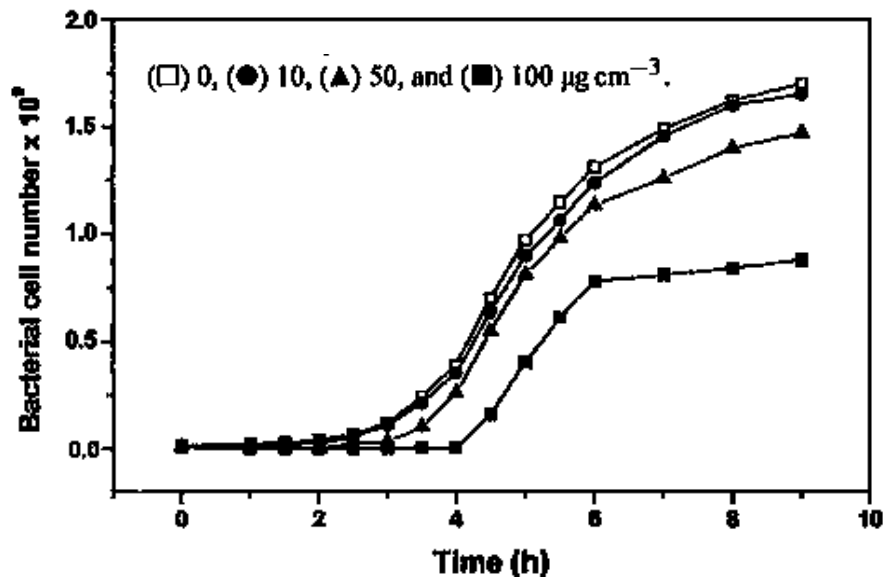


Figura 1.17. Curvas de crecimiento de *E. Coli* en medio de cultivo líquido Luria-Bertani con 10^7 CFU de bacteria en la presencia de diferentes concentraciones de nanopartículas de plata: 0 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ y 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$.

Por último utilizaron la técnica de caracterización de microscopía electrónica de barrido para evaluar la superficie morfológica de la bacteria *E. Coli* nativa y tratada con nanopartículas.

La figura 1.18, muestra que las paredes de las células de la bacteria sufrieron un daño significativo que identificaron por la formación de numerosos hoyos en las paredes de las células.

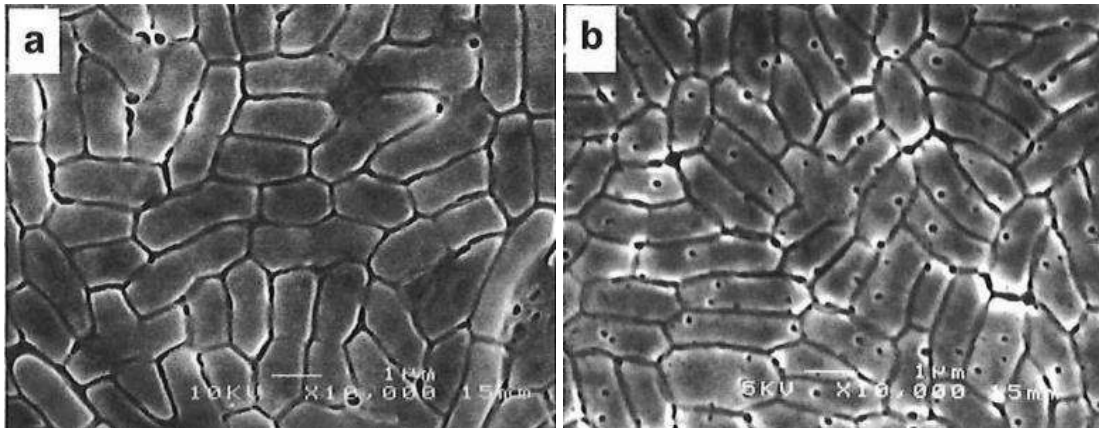


Figura 1.18. Micrografías TEM de células de *E. Coli* en caldo Luria-Bertani (A) y células tratadas con $50 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ de nanopartículas de plata en caldo Luria-Bertani por 4 horas [Sondi, I., et al., 2004].

Todos estos estudios muestran claramente que las nanopartículas de plata pueden ser preparadas en forma simple y rentable, pueden ser útiles para la formulación de nuevos materiales bactericidas. La plata ha demostrado tener una alta toxicidad con al menos 16 tipos de bacterias entre ellas como ya se dijo la *E. Coli*, la *Staphylococcus Aureus*, la *Listeria Monocytogenes*, *Moraxella Guanajuatensis* y *Lactobacillus Casei Shiota*. Es por eso que se espera que la nanotecnología abra nuevos caminos para combatir y prevenir enfermedades mediante la ingeniería de los materiales a escala nanométrica.

1.4.5 BACTERIAS Y SUS EFECTOS

Las bacterias son microorganismos unicelulares que se reproducen por fisión binaria. Consiste en la división del ADN, seguidas de la división del citoplasma,

dando lugar a dos células hijas. La mayoría son de vida libre, bacterias que se han adaptado a vivir libremente en la tierra y el agua. Tienen requerimientos más simples y vías metabólicas más complejas a excepción de algunas que son de vida intracelular obligada, como *Chlamydias* y *Rickettsias*. Tienen los mecanismos productores de energía y el material genético necesarios para su desarrollo y crecimiento.

El conocimiento de las diferentes estructuras y composición ha permitido comprender como muchas bacterias se relacionan con el hombre, ya sea como integrantes de la flora normal o como agresoras para el mismo. El descubrimiento de que muchas estructuras bacterianas bien identificadas son inmunógenos importantes, permitió el desarrollo de vacunas que han sido verdaderos avances en la medicina. Ejemplo de ello son las vacunas contra microorganismos causantes de meningoencefalitis supurada como *Haemophilus Influenzae* tipo b y *Neisseria meningitidis* (meningococo) A, B y C. El conocimiento de la composición bioquímica de las diferentes estructuras bacterianas, junto al conocimiento del metabolismo bacteriano, permite hoy la comprensión del mecanismo de acción de los diferentes antibióticos [Prescott, H. K., et al., 1994].

a) Lactobacillus Casei Shirota

Lactobacillus Casei Shirota es una bacteria láctica, Gram positiva, no esporulada (Figura 1.19) que pertenece al Phylum Firmicutes, Clase Basili, Orden Lactobacillales. El metabolismo de *Lactobacillus Casei Shirota* es heterofermentativo gracias a que posee una enzima llamada fosfoacetolasa, que le permite poder seguir la vía de las pentosas convirtiendo hexosas (principalmente glucosa) en pentosas y teniendo como productos finales una variedad de compuestos reducidos además de lactato, como ácido acético, etanol, bióxido de carbono y además a partir de piruvato produce peróxido de hidrógeno [Boone, R., et al., 2001].

Es una bacteria anaerobia facultativa, es decir crece de manera óptima en condiciones anóxicas, pero puede presentar crecimiento si la concentración de oxígeno es baja, debido a que posee enzimas como NADH oxidasa, NADH peroxidasa que minimizan la toxicidad de compuestos activados por el oxígeno. Es considerada como una bacteria GRAS (generalmente reconocida como segura) y un microorganismo probiótico [Boone. R., et al., 2001].

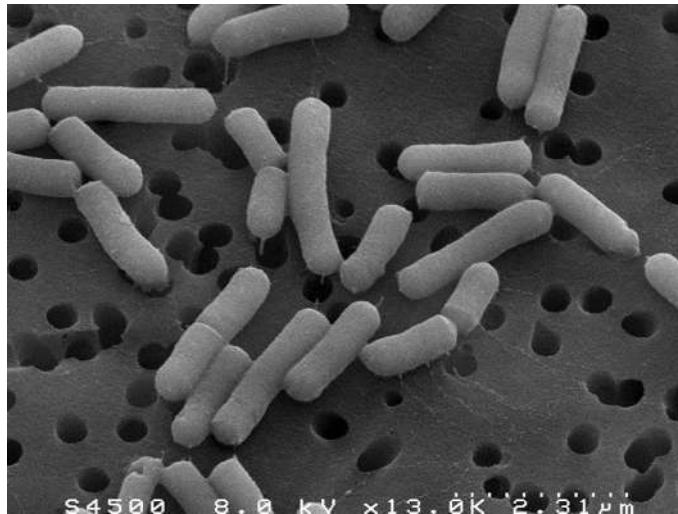


Figura 1.19. Imagen obtenida mediante microscopía electrónica de barrido de cepa de *Lactobacillus Casei Shiota* [Boone, R., et al., 2001].

Se le han comprobado beneficios como: inhibir microorganismos patógenos (*Salmonella*, *Shigella* y *Helicobacter*), reducir la intolerancia a la lactosa y aumentar la respuesta inmunológica. Además previene los malestares intestinales, mantiene el balance de la microflora intestinal y disminuye la actividad enzimática fecal [Magariños, H., et al., 2008].

La incorporación de los cultivos probióticos a los alimentos no ha sido tan sencilla, esto es por las condiciones que dichos microorganismos necesitan para desarrollarse, entre ellas se destacan atmósferas anaeróbicas, pH entre 5 y 7. Hasta la fecha han sido muchos productos lácteos (yogur, helado, leches fermentadas y queso) que han servido de vehículo para las bacterias probióticas [Heenan, C. N., et al., 2004]. Las bacterias probióticas se han aplicado a muchos

productos a nivel mundial (yogur, jugos frutales, oji desayuno africano, salsas secas para carne). Han sido adicionadas a los alimentos, en productos farmacéuticos y en la alimentación de los animales.

Una consideración muy importante es que los productos contengan una dosis efectiva de células viables durante toda su vida de anaquel, aún no existe un acuerdo que establezca cual es la mínima concentración de microorganismos probióticos en un producto para obtener beneficios en la salud. Sin embargo, se ha establecido por diversos estudios que la concentración mínima deberá ser mayor a 10^8 CFU/ml [Donkor, O. N., et al., 2006].

b) Escherichia Coli

La *Escherichia Coli* (*E. Coli*) es una bacteria que se encuentra en el sistema digestivo de los animales y los seres humanos. Aunque generalmente son inofensivas, algunas veces pueden contaminar alimentos, el agua y el medio ambiente. Cientos de miles de personas se enferman cada año a causa de esta bacteria y esto produce cientos de muertes. En los últimos años, ha habido un aumento de brotes de *E. Coli*, con un impacto significativo en los sistemas de salud y producción agrícola de acuerdo al Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC) señalando a Hamburgo como foco de la infección y reportándose casos en Austria, Republica Checa, Dinamarca, Francia, Holanda, Noruega, Suecia, Suiza, Reino Unido e incluso Estados Unidos [ECDC., 2011].

La figura 1.20 muestra dos imágenes de una cepa de *E. Coli* vista mediante microscopía electrónica de barrido [Hartmann, M., et al., 2010].

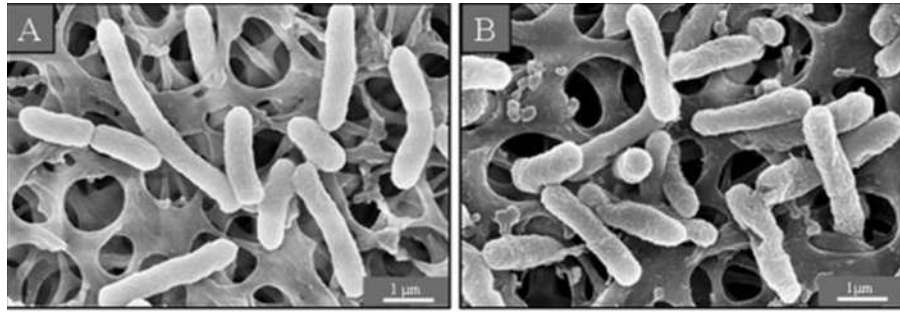


Figura 1.20. Imágenes de cepa de *E. Coli* utilizando un microscopio electrónico de barrido [Hartmann, M., et al., 2010].

Debido a su alta presencia en el intestino, se utiliza como indicador principal para detectar y medir la contaminación fecal en la evaluación de la inoculación del agua y los alimentos. Considerados comensales inofensivos, las cepas de *E. Coli* constituyen alrededor del 1% de la población microbiana normal del intestino. Las diferentes cepas de *E. Coli* que producen enfermedades se clasifican de acuerdo con el tipo de síntomas que pueden producir en los seres humanos. La cepa *E. Coli Shigatoxigénica* (STEC) es una de estas variedades. Provoca síntomas que van desde una diarrea suave hasta una grave con sangre. En casi el 10% de los pacientes (especialmente niños pequeños y adultos mayores), la infección puede transformarse en una enfermedad con riesgo vital, como el síndrome hemolítico urémico.

c) **Dermatitis Atópica**

Otro tipo de bacteria patógena es la *Dermatitis Atópica*, es una bacteria anaerobia Gram positiva productora de coagulasa y catalasa, es el patógeno que coloniza la piel de la mayoría de los seres humanos principalmente en los codos, rodillas, cuero cabelludo, cara y torso. La figura 1.21, muestra la imagen de la extremidad inferior de un niño infectado por esta bacteria [McGiffen S. P., 2005].



Figura 1.21. La imagen muestra la pierna de un niño con *Dermatitis Atópica*.

La ruptura de la piel o de las mucosas por traumatismos u operaciones puede dar origen a infecciones localizadas en la piel y tejidos blandos, en ocasiones los microorganismos invaden la sangre y producen ampollas, secreción o sangrado del oído, enrojecimiento o inflamación de la piel. Este microorganismo puede afectar a pacientes inmunocompetentes, como a individuos con una disminución de las defensas a causa de operaciones, quemaduras o adicción a drogas intravenosas. El síndrome de la piel escaldada, afecta con más frecuencia a los lactantes y a los niños pequeños. Suele comenzar con un eritema perioral (formación de protuberancias rojas alrededor de la boca). La enfermedad comienza con una infección cutánea localizada.

CAPITULO 2

METODOLOGIA

En este capítulo se describe la metodología química que se utilizó para la síntesis de nanoestructuras complejas de nanopartículas de plata a partir de la preparación del complejo AgCN. Esta técnica es una modificación de la técnica propuesta por [López-Miranda, A., et al., 2013] para sintetizar nanopartículas de plata utilizando un método de reducción química y que se describe en la sección 1.4.2 inciso C. Además se describe la metodología para el cultivo de las bacterias: *Lactobacillus Casei Shirota* en caldo MRS, *Escherichia Colí* y *Dermatitis Atópica* en caldo Luria-Bertani, así como el procedimiento que se siguió para la determinación de la cinética de crecimiento de las poblaciones de bacterias mediante espectroscopía Uv-Vis.

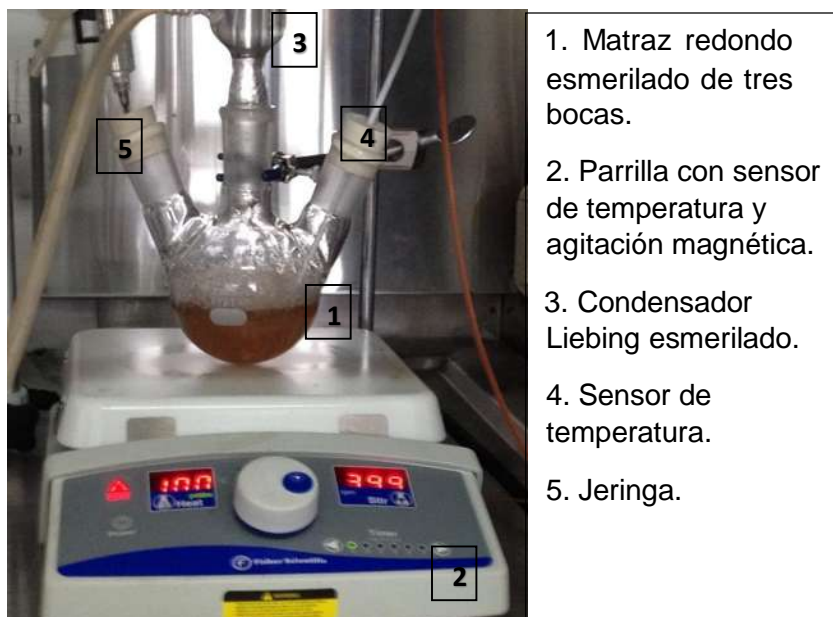
2.1 SÍNTESIS DE FIBRAS DOPADAS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA

Los materiales y equipos que se utilizaron para la síntesis son los siguientes:

- Agente precursor: El agente precursor que se utilizó fue el complejo AgCN, el cual se preparó a partir de nitrato de plata (AgNO_3), marca T.J Baker de pureza 99.8 %, y de cianuro de sodio (NaCN) Fermont de pureza 99.1 %.
- Solución reguladora de pH: Hidróxido de sodio (NaOH), marca J.T. Baker. Soluciones 0.1 M y 0.01 M.
- Agente estabilizador: Dodecil sulfato de sodio ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4\text{Na}$), marca SIGMA-ALDRICH y pureza 99 %. El dodecil sulfato de sodio es un compuesto orgánico de cadena hidrocarbonada de 12 carbonos y un grupo polar de sulfato.

- Agente reductor: Sulfito de sodio (Na_2SO_3), marca GOLDEN BELL Reactivos.
- Matraz redondo de tres bocas de 250 ml esmerilado marca Pyrex.
- Parrilla con sensor de temperatura y agitación magnética marca Fisher Scientific.
- Condensador Liebing.
- Tapones de teflón.
- Bomba de caudal constante marca MasterFlex modelo 7518—00.
- Jeringa desechable de 10 ml.
- Bomba de infusión KdScientific.

La reacción de síntesis fue efectuada en el matraz redondo de 250 ml de tres bocas para un volumen total de 100 ml de solución. Una de las bocas del matraz fue utilizada para colocar el condensador Liebing que a su vez está conectado mediante mangueras de plástico a la bomba de caudal constante para el suministro de agua, la otra boca para adicionar el agente reductor y la tercera para monitorear la temperatura. El uso del condensador se debió a la necesidad de mantener el volumen de reacción constante por las altas temperaturas ($102\text{ }^\circ\text{C}$) empleadas durante la síntesis. A su vez, el matraz se colocó a dos milímetros de la superficie de la parrilla de agitación y calentamiento, equipada con un sistema de control digital de la temperatura. En la figura 2.1 se muestra el arreglo experimental.



1. Matraz redondo esmerilado de tres bocas.
2. Parrilla con sensor de temperatura y agitación magnética.
3. Condensador Liebing esmerilado.
4. Sensor de temperatura.
5. Jeringa.

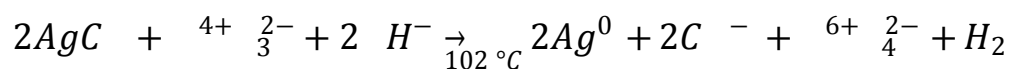
Figura 2.1. Arreglo experimental utilizado en la síntesis de nanopartículas a partir del complejo de AgCN.

La forma de llevar a cabo la síntesis es la siguiente para un volumen total de 100 ml:

1. Disolución de AgNO_3 a 2×10^{-3} M en 40 ml de agua desionizada con agitación magnética por 10 min.
2. Disolución de NaCN a 2.5×10^{-3} M en 50 ml de agua desionizada a pH 11 por 10 min.
3. Se vierte la solución de NaCN en la de AgNO_3 y se observa el cambio de color de incoloro a un color blanco, se deja agitar por 10 min y se ajusta el pH a 11.
4. Se agrega el SDS en forma sólida (4×10^{-3} M) y se continua con la agitación por 10 min.
5. Se vierte la solución en el matraz redondo esmerilado de tres bocas.
6. Se somete al sistema a calentamiento y agitación a una temperatura de 102°C y 400 rpm.

7. Una vez se alcanza dicha temperatura se agregan 10 ml de solución del agente reductor Na_2SO_3 ($1 \times 10^{-2} \text{M}$) a una velocidad de 0.17 ml/min.
8. Al agregar el agente reductor se debe observar el cambio de coloración de blanco a amarillo fuerte hasta un color verde oscuro.

La reacción se lleva a cabo aproximadamente 1 hora 30 minutos. Después se coloca la solución final en un frasco, el cual se protege de la luz y se deja reposar de 4 a 15 días para que se lleve a cabo a temperatura ambiente la formación de las fibras dopadas de nanopartículas de plata. Por lo tanto, la reacción de reducción del complejo AgCN se describe como:

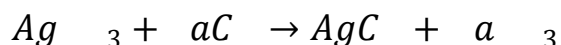


2.2 SÍNTESIS DEL COMPLEJO AGCN

La síntesis del complejo de AgCN , se lleva a cabo de la siguiente manera:

1. Disolución de AgNO_3 a $2 \times 10^{-3} \text{M}$ en 40 ml de agua desionizada con agitación magnética por 10 min.
2. Disolución de NaCN a $2.5 \times 10^{-3} \text{M}$ en 50 ml de agua desionizada a pH 11 por 10 min.
3. Se vierte la solución de NaCN en la de AgNO_3 y se observa el cambio de color de incoloro a un color blanco, se deja agitar por 10 min y se ajusta el pH a 11.

La solución coloidal que se obtiene se deja reposar durante dos semanas, al término de ese lapso se observa la aparición de partículas que se precipitan en la solución. La reacción de formación del complejo AgCN se muestra a continuación.



2.3 CULTIVO DE BACTERIAS

2.3.1 PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

Las bacterias que se estudian en el presente trabajo son tres:

- a) *Lactobacillus Casei Shirota*
- b) *Escherichia Coli*
- c) *Dermatitis Atópica*

Para cultivar bacterias se requiere de un medio de cultivo, que como se mencionó contiene los nutrientes necesarios para su reproducción. El medio de cultivo es el MRS para la *Lactobacillus Casei Shirota* y el Luria-Bertani para las otras dos bacterias. El caldo MRS fue desarrollado por Man, Rogosa y Sharpe [Man, J. D., et al., 1960], para proveer un medio que permitirá un abundante desarrollo de *Lactobacillus* y otras bacterias ácido lácticas y el caldo Luria-Bertani fue desarrollado por Giuseppe Bertani [Bertani, G., et al., 1951]. La forma de preparación del MRS y Luria-Bertani es de la siguiente manera:

1. Mezclar y agitar vigorosamente en un litro de agua 55 g de caldo en polvo.
2. Calentar y seguir con agitación magnética hervir por un minuto para que el polvo se disuelva completamente.
3. Posteriormente, se ajusta el pH de la solución a 6.5, utilizando para esto hidróxido de sodio (NaOH⁻) para subir el pH o ácido nítrico (HNO₃) para disminuirlo.
4. Esterilizar la solución en autoclave por 15 minutos a 121 °C.
5. Colocar el caldo esterilizado en tubos de ensayo esterilizados y se mantienen en refrigeración a 3 °C para su conservación.

2.3.2 INOCULACIÓN

Para llevar a cabo la inoculación de la bacteria *Lactobacillus Casei Shirota* en el medio de cultivo MRS realiza la siguiente metodología:

1. Se debe trabajar en una campana de flujo laminar y tener encendidos cuatro mecheros para evitar cualquier tipo de contaminación, además de utilizar cubre boca, guantes y bata de laboratorio.
2. Posteriormente se toma uno de los tubos de ensayo con el caldo esterilizado y se termaliza la muestra a temperatura ambiente durante 10 minutos.
3. Después se toma un haza bacteriológica y se pasa por uno de los mecheros hasta que esté al rojo vivo para esterilizarla.
4. El haza esterilizada se introduce en la muestra de Yakult e inmediatamente después en el tubo de ensayo para inocularlo. Es importante que el tubo se abra hasta ese momento, y no antes para evitar cualquier contaminación.
5. Después se coloca el tubo en una incubadora de laboratorio durante 24 horas a 32 °C para promover el crecimiento de la población de bacterias.

Para la inoculación de las bacterias *E. Coli* y *Dermatitis Atópica* en el medio de cultivo Luria-Bertani se realiza la siguiente metodología:

1. Se realizan los primeros tres pasos de la metodología para la inoculación de la bacteria *Lactobacillus Casei Shirota*, pero utilizando para estas bacterias el medio de cultivo Luria-Bertani.
2. El haza esterilizada se introduce en una caja Petri que contiene una cepa de *E. Coli* o *Dermatitis Atópica* e inmediatamente después en el tubo de ensayo para inocularlo. El tubo de ensayo se debe abrir hasta ese momento, y no antes para evitar cualquier contaminación.
3. Después se coloca el tubo en una incubadora de laboratorio durante 24 horas a 37 °C para promover el crecimiento de la población de bacterias.

2.3.3 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE POBLACIONES DE BACTERIAS POR ESPECTROSCOPIA UV-VIS

En esta tesis se utiliza la espectroscopia Uv-Vis como método de análisis del crecimiento de bacterias, ya que este método permite la representación gráfica del crecimiento bacteriano tomando un espectro de absorción a intervalos de tiempo previamente establecidos.

Cuando las bacterias se multiplican en un medio líquido este se torna turbio o nebuloso por las células. El instrumento utilizado para medir la turbidez es un espectrofotómetro. En el espectrofotómetro un haz de luz se transmite a través de una suspensión bacteriana a una celda fotoeléctrica. Cuando la cantidad de bacteria aumenta, menos luz alcanza la celda fotoeléctrica. Este cambio de luz se registra en la escala del instrumento como porcentaje de transmisión. La transmitancia óptica se define como la fracción de luz incidente, a una longitud de onda especificada, que pasa a través de una muestra. Su expresión matemática es $T = \frac{I}{I_0}$, donde I_0 es la intensidad del rayo incidente, e I es la intensidad de luz que viene de la muestra. La transmitancia de una muestra esta normalmente dada porcentualmente, definida como: $\%T = \frac{I}{I_0} * 100\%$. La transmitancia se relaciona con la absorbancia A como: $A = -\log_{10} T = -\log_{10} \left(\frac{I}{I_0}\right)$. El término es frecuentemente intercambiable con densidad óptica, si bien este último se refiere a la absorbancia por unidad de longitud [Brock, T., et al., 1993].

Para que puedan visualizarse las primeras trazas de turbidez debe haber más de un millón de células por mililitro y se precisan de 10 a 100 millones por mililitro para que la suspensión se vuelva lo bastante turbia como para ser medida en un espectrofotómetro.

Si medimos la absorbancia de un cultivo a distintos intervalos de tiempo, la curva que relaciona estos parámetros representa la curva de crecimiento de

una población bacteriana con sus distintas fases. La figura 2.2 muestra las fases del crecimiento bacteriano.

1) Fase de latencia o retardo: Dura pocas horas, ya que la célula se adapta al medio en el que se encuentra. Puede haber muerte de algunos microorganismos.

2) Fase de aceleración positiva: En la que las células tienen gran actividad fisiológica, apareciendo el crecimiento protoplasmático.

3) Fase logarítmica: Se lleva a cabo una multiplicación exponencial de los microorganismos.

4) Fase de aceleración negativa: Dada por la competencia del alimento.

5) Fase estacionaria: Consiste en el equilibrio entre la multiplicación y muerte de los microorganismos.

6) Fase de declive: Causada por la muerte total de los microorganismos por la acumulación de sustancias de desecho.

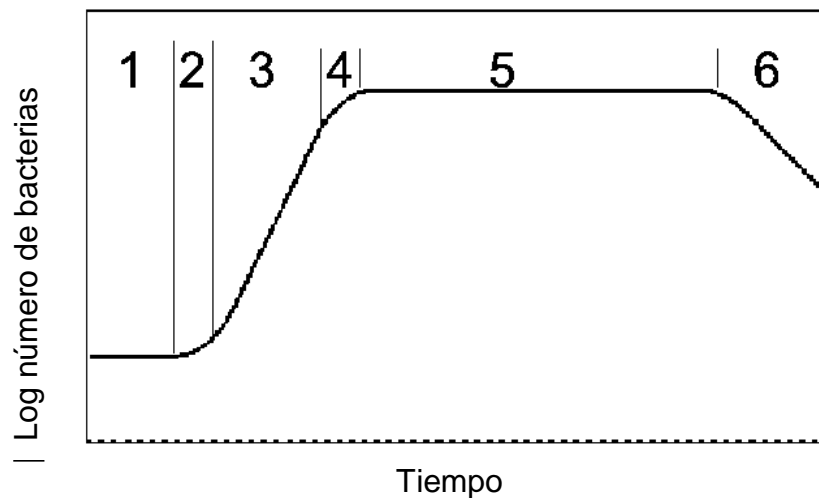


Figura 2.2. Fases del crecimiento bacteriano [Brock, T., et al., 1993].

El análisis del crecimiento de las bacterias se lleva a cabo, colocando en una celda de cuarzo o plástico una cantidad de caldo del medio de cultivo

adecuado para la bacteria a analizar. Después se inocula la bacteria en la celda y se tapa con papel parafilm. Hecho esto la celda se coloca en el equipo de UV-Vis, el cual cuenta con control de temperatura. La temperatura se ajusta a 32 °C para promover el crecimiento de las bacterias. El equipo se programa para tomar un espectro de absorción cada hora durante un periodo de 21 horas si se analizan 4 celdas o de 12 horas si son 12 celdas a analizar. El equipo que se utilizó en el presente trabajo fue un modelo Cary 5000, marca Varian con alcance en longitud de onda de 190 a 2500 nm, alcance en absorbancia de 0 a 10 y ancho de banda espectral variable de 0.04 a 5 nm, los barridos se hicieron a una velocidad de 120 nm/min.

CAPITULO 3

RESULTADOS Y CARACTERIZACION

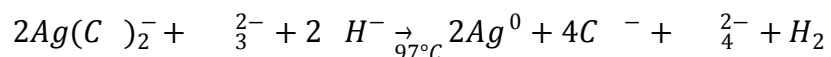
En este capítulo se analizan y muestran los resultados obtenidos de la síntesis de fibras dopadas de nanopartículas de plata, tiempo de formación, forma, así como los resultados de los estudios del efecto bactericida realizados mediante espectroscopia Uv-Vis sobre las bacterias de *E. Coli*, *Dermatitis Atópica* y *Lactobacillus Casei Shirota*.

3.1 FIBRAS SINTETIZADAS

El método para sintetizar nanoestructuras complejas de plata propuesto por Armando López Miranda [López-Miranda, A., et al., 2013] fue utilizado en el presente trabajo, pero fue necesario implementar algunas modificaciones. El método original sugerido por este autor utiliza una concentración de 1×10^{-3} M de AgNO_3 y 2.5×10^{-3} M de NaCN . Básicamente consiste en la disolución de AgNO_3 durante 5 minutos aproximadamente. Después se ajusta el pH con NaOH a 11, este es un factor importante a tomar en cuenta ya que si no es a este pH no se logra la síntesis, al hacerlo se debe observar un cambio de coloración de incoloro a amarillo fuerte indicando la formación de hidróxidos de plata. Después se agrega el NaCN en forma sólida, tornándose la solución totalmente clara. La adición de NaCN debe ser muy rápida con el pH para evitar la formación de precipitados de hidróxido de plata. Una vez preparado el precursor, se agrega el SDS en forma sólida (4×10^{-3} M) y la solución permanece en agitación por 10 minutos.

Después se somete el sistema a calentamiento, hasta ebullición, en baño de glicerina, a una temperatura de 97°C como se describe en la sección 1.4.2 inciso c.

Cuando se alcanza la temperatura de ebullición se agrega el Na₂SO₃ a través de una bomba de infusión comenzando de esta forma la reacción química que a continuación se muestra:



Al término de la adición del agente reductor se deja el sistema en funcionamiento por 24 horas. Transcurrido ese tiempo la solución se enfría y se almacena protegiéndola de la luz. Después de al menos 72 horas se observan a simple vista la aparición de pequeñas fibras suspendidas en la solución, las cuales después de una semana crecen hasta formar una red microscópica de fibras dopadas de nanopartículas entrelazadas aleatoriamente entre sí.

Al intentar reproducir en esta tesis este procedimiento no se tuvo éxito, ya que la síntesis de nanoestructuras de plata no se llevó a cabo a pesar de seguir detalladamente el procedimiento de síntesis indicada por el autor. Es posible que estos intentos fallaran debido a que se estuvieron utilizando reactivos de menor pureza de los que utilizó Armando López Miranda [López-Miranda, A., et al., 2013].

Por este motivo se modificó el método de síntesis original para finalmente llevarlo a cabo como se describe en la sección 2.1, con esto se obtienen las nanofibras dopadas de nanopartículas de plata mostradas en la figura 3.1, que muestra imágenes típicas de la estructura de esas fibras tomada con un Microscopio de Transmisión de Electrones de alta resolución. Como puede observarse la fibra consta de un polímero densamente dopado de nanopartículas.

La naturaleza de esas nanopartículas fue ampliamente estudiada por Armando López Miranda [López-Miranda, A., 2013], quien demostró que algunas nanopartículas son de plata y otras son de una estructura de AgCN que no ha sido reportada previamente en la literatura.

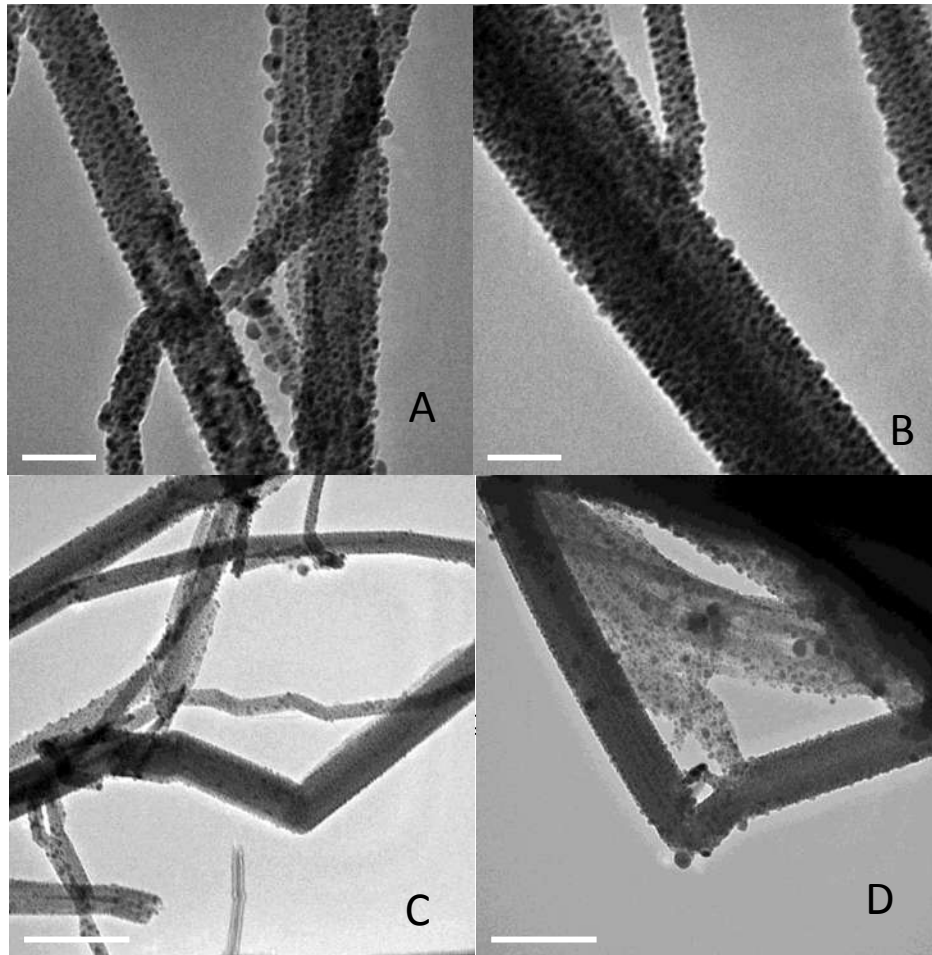


Figura 3.1. Fotomicrografías TEM de las fibras dopadas.

Las imágenes que se muestran en la figura 3.1, fueron utilizadas para determinar el tamaño de las nanopartículas de plata contenidas en la fibra dopada utilizando dos programas computacionales: ImageJ y Origin 8. ImageJ es un programa con el que se puede mostrar, editar, analizar, procesar, guardar, e imprimir imágenes. El programa puede calcular el área y las estadísticas de valor de pixel de selecciones definidas por el usuario y la intensidad de objetos umbral.

Este software permitió determinar el tamaño de las nanopartículas relacionando el área de las nanopartículas con la cantidad de pixeles de la imagen.

El programa genera un archivo al término del análisis de la imagen, que se abre utilizando el programa Origin 8, que es un graficador, y es con este programa con él que se determina el tamaño de partícula. La figura 3.2 muestra el histograma de tamaño generado con estos dos programas, que muestra una disminución en el porcentaje de partículas en función del diámetro. Se observa en el histograma un recuadro que muestra que el tamaño de nanopartículas es de 2.5 nm con una desviación estándar de 0.2137.

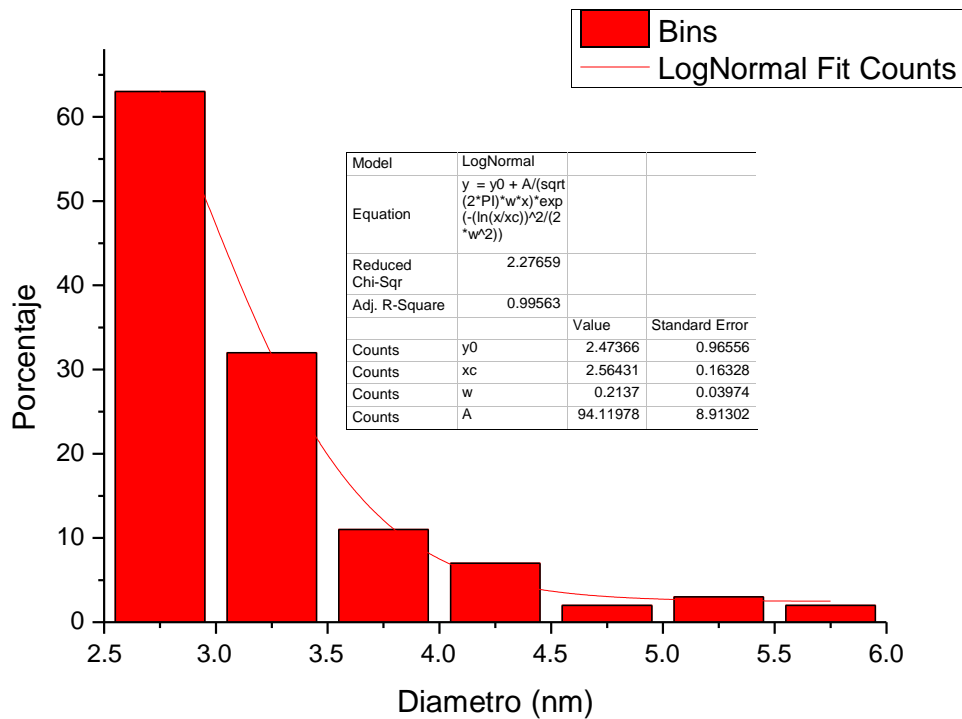


Figura 3.2. Distribución de tamaño de las nanopartículas contenidas en la fibra dopada.

En la figura 3.3 se muestran fibras sintetizadas en solución, en la figura 3.3A, se observan dos pequeñas redes de fibra de color blanco, que son muy similares, sino idénticas, a las obtenidas por [López Miranda, A., 2013].

En la figura 3.3B se observa que las fibras sintetizadas tienen un aspecto físico diferente a las de la figura 3.3A, a pesar de que la síntesis se llevó a cabo utilizando la misma metodología y teniéndose el debido cuidado. La reproducibilidad de estos experimentos no es sencilla de obtener, aun siguiendo a detalle y con cuidado el procedimiento de síntesis, es posible que en dos experimentos en principio iguales, la cantidad de fibra resultante no sea la misma,

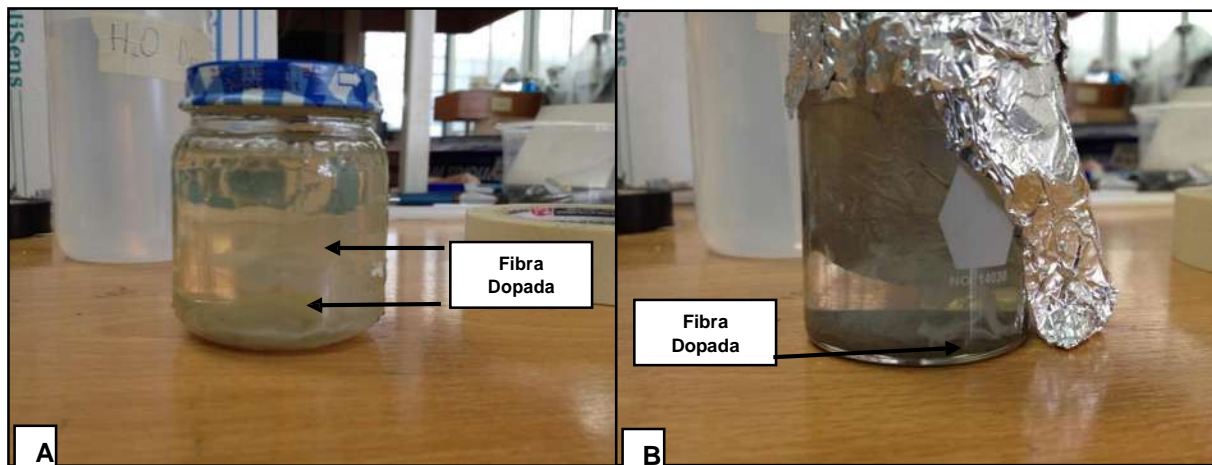


Figura 3.3. Fibras sintetizadas dopadas por nanopartículas de plata.

En el presente trabajo de tesis se llevó a cabo además la síntesis del complejo AgCN, que también es un polímero que no está dopado de nanopartículas de plata. La síntesis de este complejo fue otro de los objetivos principales de este trabajo de tesis con la finalidad de comprobar su efecto bactericida. Este polímero puede verse en la figura 3.4, en donde se muestra una imagen del polímero obtenida en un SEM de emisión de campo. Se observa en la imagen que el polímero está constituido por nanoestructuras alargadas.

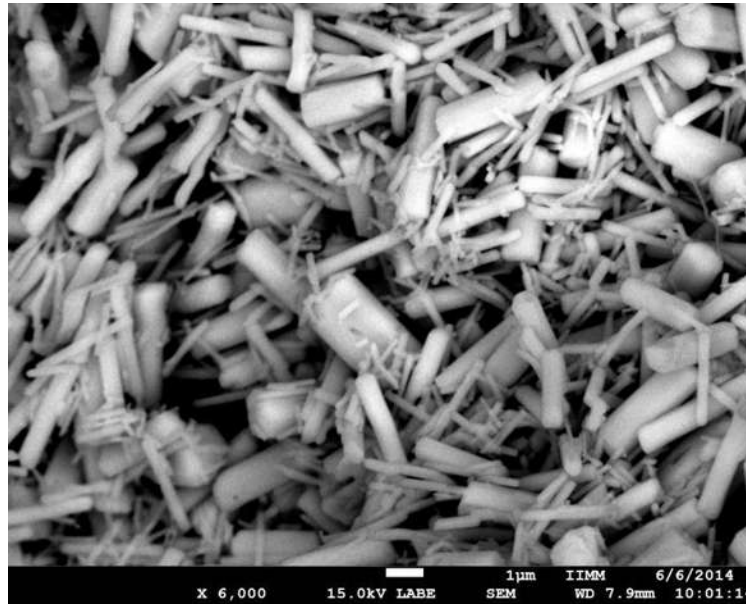


Figura 3.4. Fotomicrografía SEM del polímero no dopado de nanopartículas de plata.

3.2 CULTIVO DE BACTERIAS

El cultivo de bacterias se llevó a cabo como se describe en la sección 2.3 y con asesoría de la Dra. Patricia Ríos del Instituto de Biología de la UMSNH. La figura 3.5 muestra tres imágenes de caldo con y sin estar inoculado con bacteria. La imagen A muestra tubos de ensayo de caldo MRS con bacteria *Lactobacillus Casei Shirota* después de dos días de inoculación. Se observa que la solución tiene una tonalidad lechosa, lo que se debe a que la población de bacterias después de transcurrido este tiempo, está en su máximo.

La imagen B muestra dos tubos de ensayo de caldo Luria-Bertani, el de la derecha contiene el caldo recién inoculado (color café claro) y el de la izquierda después de transcurridas 24 horas, en donde se observa claramente a simple vista el crecimiento de la población bacteriana que causa la turbidez del tubo del lado izquierdo. La imagen C muestra cuatro tubos de ensayo con caldo Luria-Bertani inoculados con *Dermatitis Atópica*.

Los de color café corresponden a los recién inoculados y el de color lechoso corresponde a un crecimiento de esta bacteria después de 24 horas.

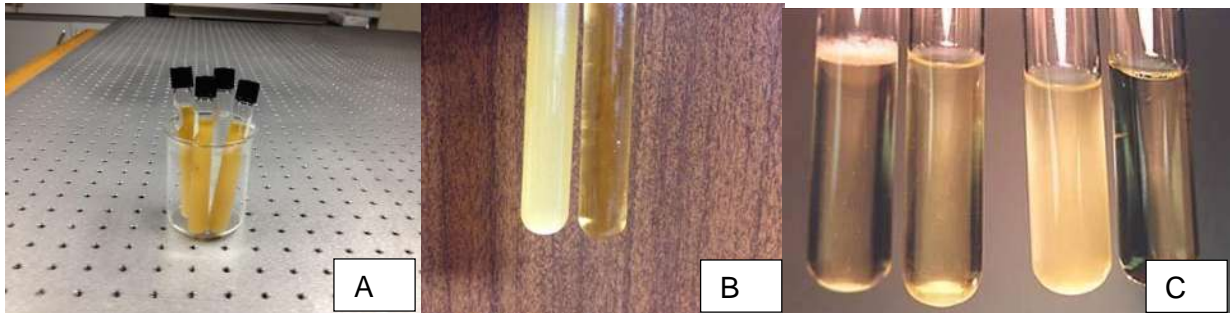


Figura 3.5. (A) Inoculación de la bacteria *Lactobacillus Casei Shiota* en MRS agar, (B) inoculación de las bacterias *E. Coli* y (C) *Dermatitis Atópica* en Luria-Bertani.

3.3 EFECTO BACTERICIDA

En esta sección se describen los resultados obtenidos del análisis del efecto bactericida de las fibras dopadas de nanopartículas de plata en contacto con las bacterias *Lactobacillus Casei Shiota*, *E. Coli* y *Dermatitis Atópica*, así como el efecto bactericida del polímero de AgCN no dopado.

3.3.1 BACTERIA *LACTOBACILLUS CASEI SHIROTA*

Para analizar el efecto bactericida de las fibras dopadas y no dopadas sobre la bacteria *Lactobacillus Casei Shiota* se incubaron 4 celdas de cuarzo que contenían el medio MRS. La figura 3.6 muestra los espectros de absorción obtenidos siguiendo la metodología descrita en la sección 2.3.3. Una de las celdas contiene el medio y la bacteria y se etiqueta como “L. Casei Shiota” en la figura, la segunda celda contiene el medio de cultivo, la bacteria y una muestra del polímero no dopado, que se etiqueta como “Polímero” en la figura. La tercera y cuarta celdas contienen el medio de cultivo, la bacteria, 0.8 mg y 1.6 mg de fibra dopada de nanopartículas de plata, respectivamente, etiquetadas como “0.8 mg Fibra dopada” y “1.6 mg Fibra dopada”. Las celdas se introducen en el equipo

Uv-Vis y se programa la temperatura a 32 °C, se programa el equipo para que tome un espectro de absorción cada hora, durante 21 horas, en el rango de 350 a 750 nm. La figura muestra los espectros a 1, 5, 7 y 10 horas de iniciada la inoculación. Puede observarse que en general, para las cuatro muestras la absorbancia aumenta en el tiempo, lo que indica que la población de bacterias está creciendo. A 1 hora las absorbancias son del orden de las milésimas, (en unidades arbitrarias), a las 5 horas la absorbancia es de centésimas, a las 7 horas es del orden de unidades, y a partir de esas 7 horas ya no aumenta. También se observa que las curvas de absorción tienen un comportamiento regular, que crece a partir de los 350 nm, alcanza un máximo alrededor de los 400 nm y disminuye gradualmente para longitudes de onda mayores.

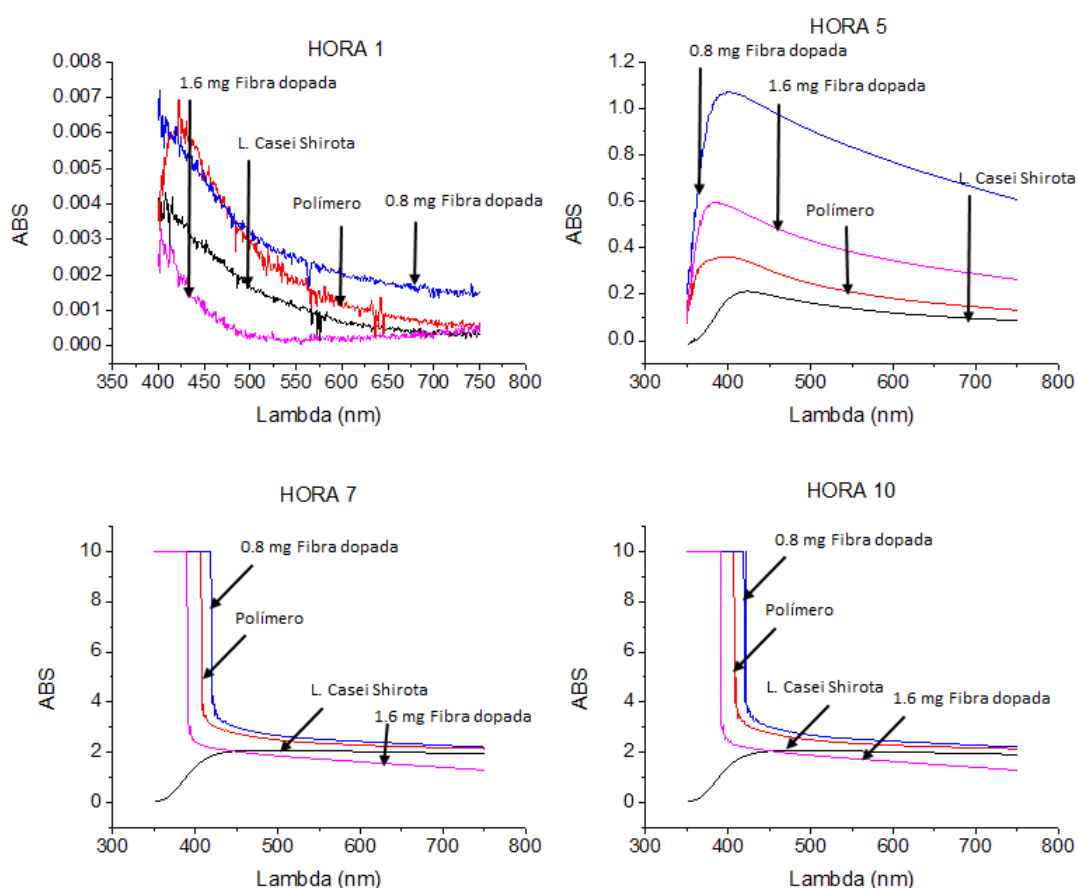


Figura 3.6. Espectros de absorción para la bacteria *Lactobacillus Casei Shirota* inoculada en MRS, MRS con fibra dopada y MRS con polímero.

Para obtener la curva de crecimiento versus tiempo se procede a seleccionar una longitud de onda predeterminada y graficar la absorbancia a distintos tiempos para las 4 celdas. Estas curvas se muestran en la figura 3.7, en donde se observan 4 gráficas generadas a 600, 650, 700 y 750 nm respectivamente. Dado que las curvas de absorción son bien comportadas y las cuatro gráficas tienen el mismo comportamiento se concluye que en realidad puede usarse cualquier longitud de onda. De la figura también se observa que la muestra que contiene bacteria y 1.6 mg de fibra dopada es en la que la población de bacterias obtuvo un crecimiento menor.

Para las 4 muestras el crecimiento de la población se dispara exponencialmente entre las 4 y 7 horas. Las primeras dos horas pueden considerarse de adaptación. Se observa que pasado ese tiempo comienza una fase exponencial, en la que la velocidad de aumento de la biomasa celular es proporcional a ella misma, es decir el crecimiento bacteriano es exponencial. Esta fase se lleva a cabo entre las 3 y 7 horas. Dado que las medidas de absorbancia se tomaron cada hora, la fase de desaceleración no se observa con claridad en estas curvas, pero si está presente entre las 6 y 7 horas. Para observarla con claridad deben tomarse espectros de absorción posiblemente cada 10 minutos entre las 6 y 7 horas. Después de la hora 7 se observa la fase estacionaria, fase que consiste en el equilibrio entre la multiplicación y muerte de los microorganismos. En estas gráficas se observa además, que las poblaciones que más crecieron fueron la que contiene 0.8 mg de fibra dopada y la que contiene una pequeña cantidad de polímero. La que contiene 0.8 mg de fibra dopada inhibe el crecimiento de la bacteria en un 4 %, la que contiene una cantidad de polímero no dopado en un 8 %, se observa que la que contiene 1.6 mg de fibra dopada inhibe el crecimiento en un 36 %. Finalmente se observa que la curva correspondiente a la que solo contiene bacteria tiene un crecimiento menor de población que la de 0.8 mg de fibra dopada y una cantidad de polímero no dopado. Este comportamiento está dentro del rango de error experimental, ya

que al hacer la inoculación no se tiene control alguno sobre el número de bacterias que se adhieren al haza bacteriológica.

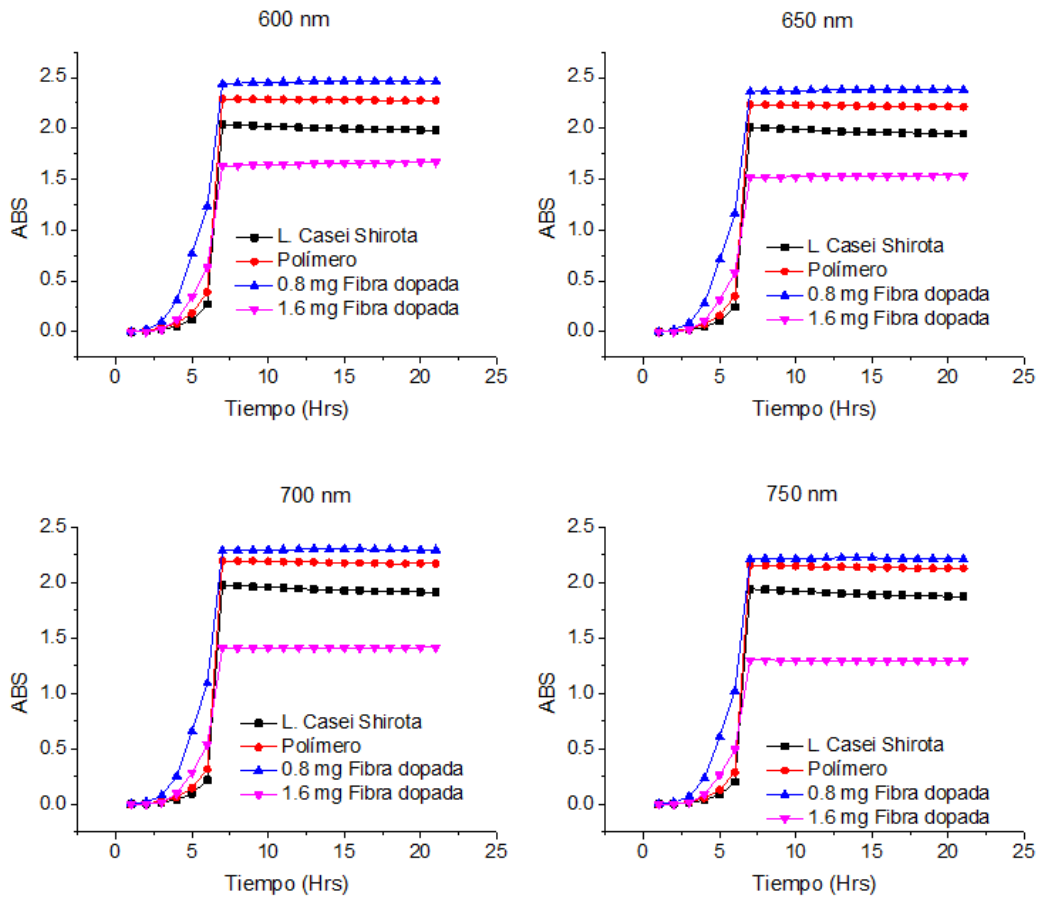


Figura 3.7. Curvas de crecimiento bacteriano versus tiempo para la bacteria *Lactobacillus Casei Shiota* en MRS, MRS con fibra dopada y MRS con polímero no dopado.

Como conclusión final para la bacteria *Lactobacillus Casei Shiota* nuestro estudio demuestra que la fibra dopada efectivamente inhibe el crecimiento, mientras que el polímero no dopado solo inhibe un 8 %.

Con la finalidad de entender, desde el punto de vista experimental, el por qué la curva de crecimiento bacteriano de la figura 3.7 fue ligeramente mayor para la muestra que contiene bacteria y fibra dopada, de la que contiene solo bacteria, se hizo una repetición del experimento, nuevamente inoculando 4 celdas de cuarzo, mantenidas a 32 °C. Tres de las cuatro celdas están inoculadas

únicamente con la bacteria, y sólo una está inoculada con la bacteria en presencia de la fibra dopada. Las curvas de absorbancia se muestran en la figura 3.8, en donde se grafican los espectros de absorción obtenidos del análisis hecho nuevamente para analizar el efecto bactericida de la fibra dopada en el rango de 400 a 1100 nm tomando un espectro cada hora durante un periodo de 12 horas. La celda que contiene el medio de cultivo, la bacteria y 1.6 mg de fibra dopada se etiqueta como “1.6 mg Fibra dopada”, las otras tres celdas contienen solo el medio de cultivo y la bacteria y se etiquetan como “L Casei Shirota”.

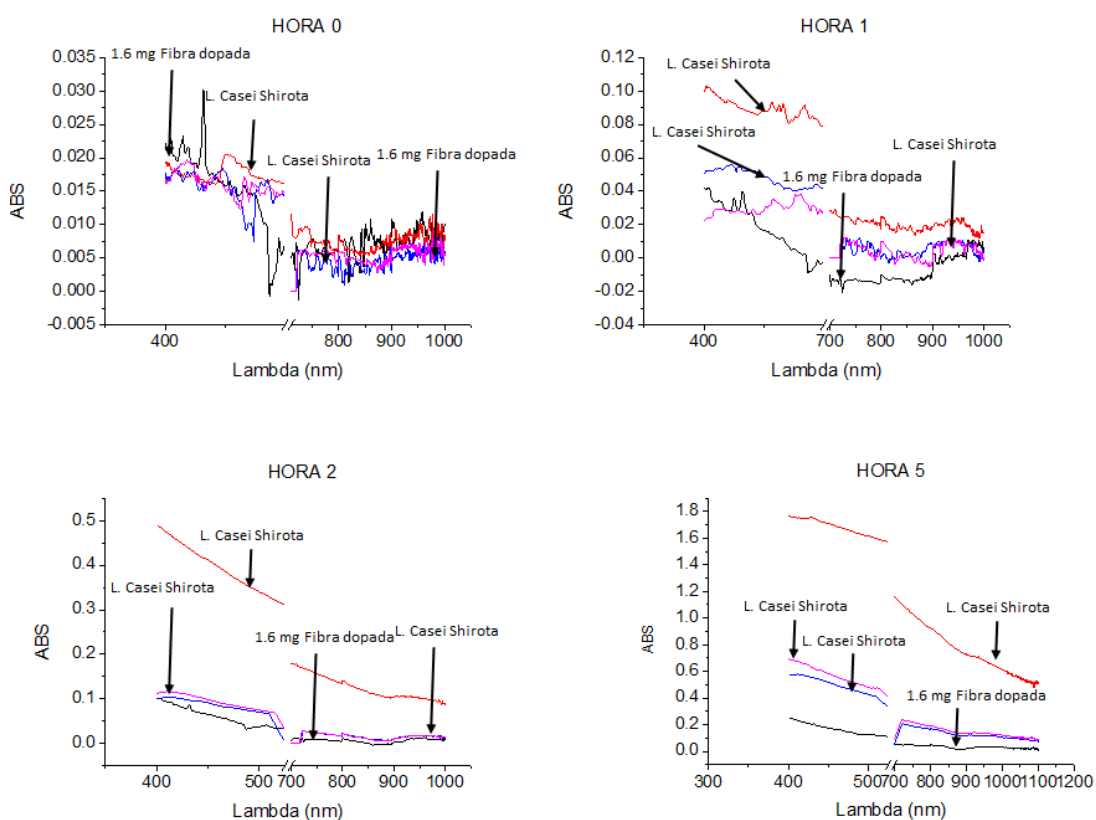


Figura 3.8. Espectros de absorción para la bacteria *Lactobacillus Casei Shirota* inoculada en MRS con fibra dopada.

La figura 3.9, muestra las 4 gráficas del crecimiento con el tiempo de las poblaciones de bacterias generadas a 400, 500, 800 y 1000 nm. Dado que son bien comportadas, se puede utilizar en realidad cualquier longitud de onda. De la figura se observa que la muestra que contiene bacteria y 1.6 mg de fibra dopada es en la que se inhibe el crecimiento de la población en un 100 %. En esta figura puede observarse que se dispara exponencialmente el crecimiento de la población de bacterias entre las 1 y 7 horas, pero además se observa otro pequeño disparo entre las 7 y 8 horas. Las primeras dos horas se atribuyen a un periodo en el que las células se adaptan al medio en el que se encuentran. De la hora 8 en adelante se observa una fase estacionaria indicando que la tasa de crecimiento es igual a la de muerte.

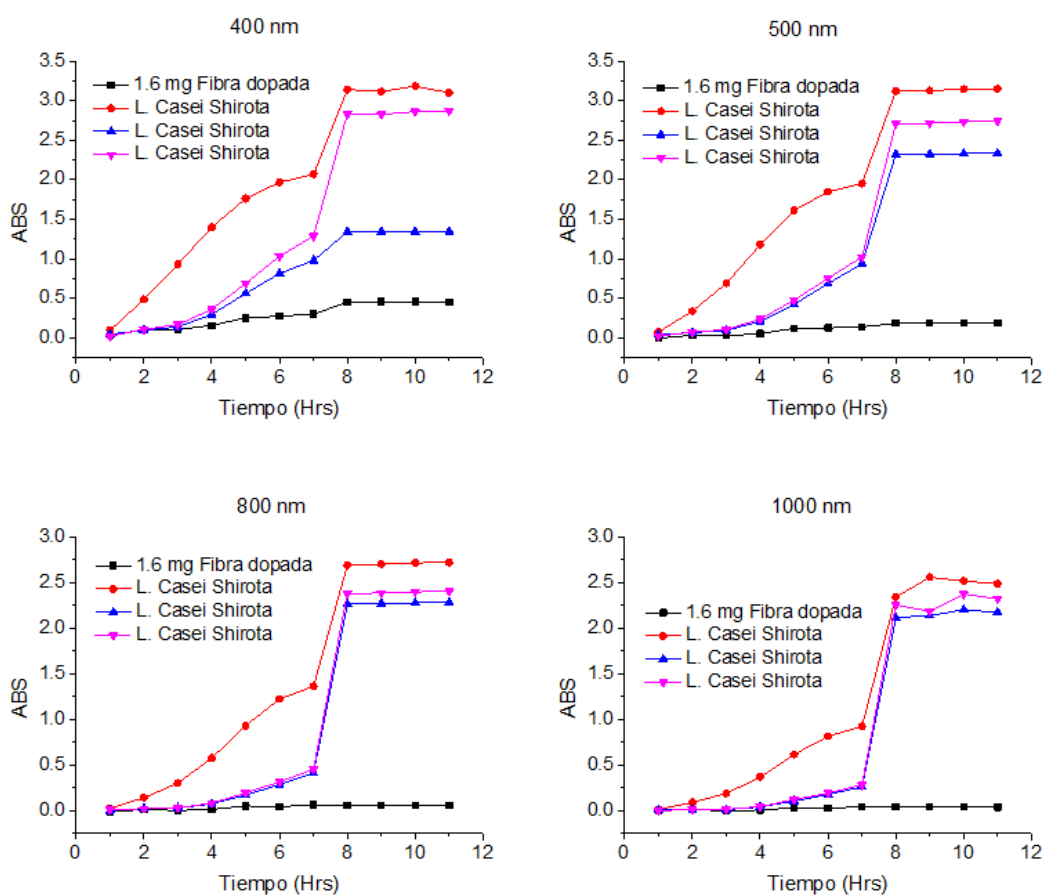


Figura 3.9. Curvas de crecimiento bacteriano versus tiempo para la bacteria *Lactobacillus Casei Shiota* en MRS con fibra dopada.

Se concluye que 1.6 mg de Fibra dopada inhibe en un 100 % el crecimiento de la bacteria *Lactobacillus Casei Shiota*. Los resultados obtenidos del segundo análisis sugieren que en el primer análisis realizado hubo una variación durante el experimento que ocasionó que la curva de crecimiento del medio de cultivo con bacteria fuera menor que la que contenía fibra dopada.

3.3.2 BACTERIA DERMATITIS ATÓPICA

En esta sección se analiza el efecto bactericida de la fibra dopada y del polímero no dopado en presencia de la bacteria *Dermatitis Atópica* inoculada en caldo Luria-Bertani. En la figura 3.10 se muestran algunos de los espectros de absorción obtenidos en el rango de 400 a 1100 nm tomando un espectro de absorción cada hora durante un periodo de 12 horas a una temperatura de 32 °C. Dos de las 4 celdas contienen el medio de cultivo, bacteria, 1.3 mg y 0.6 mg de fibra dopada respectivamente y son etiquetadas como “1.3 mg Fibra dopada” y “0.6 mg Fibra dopada”. La tercera celda contiene solo el medio de cultivo y la bacteria, y es etiquetada como “Dermatitis Atópica”. La cuarta celda contiene medio de cultivo, bacteria y 3.7 mg de polímero no dopado etiquetada como “Polímero”. Puede observarse que en la hora dos en el rango de 800 a 1100 la absorbancia es muy pequeña debido a que se está en un periodo de adaptación. Es hasta la hora 5 donde se observa un incremento en la absorbancia únicamente para la curva etiquetada como “Dermatitis Atópica”. Esta absorbancia se encuentra en el orden de las centésimas, mientras que para las otras curvas están en el orden de las milésimas. Se observa en general que el comportamiento es regular, con la diferencia que solo aumenta la absorbancia para el caso donde solo está la bacteria.

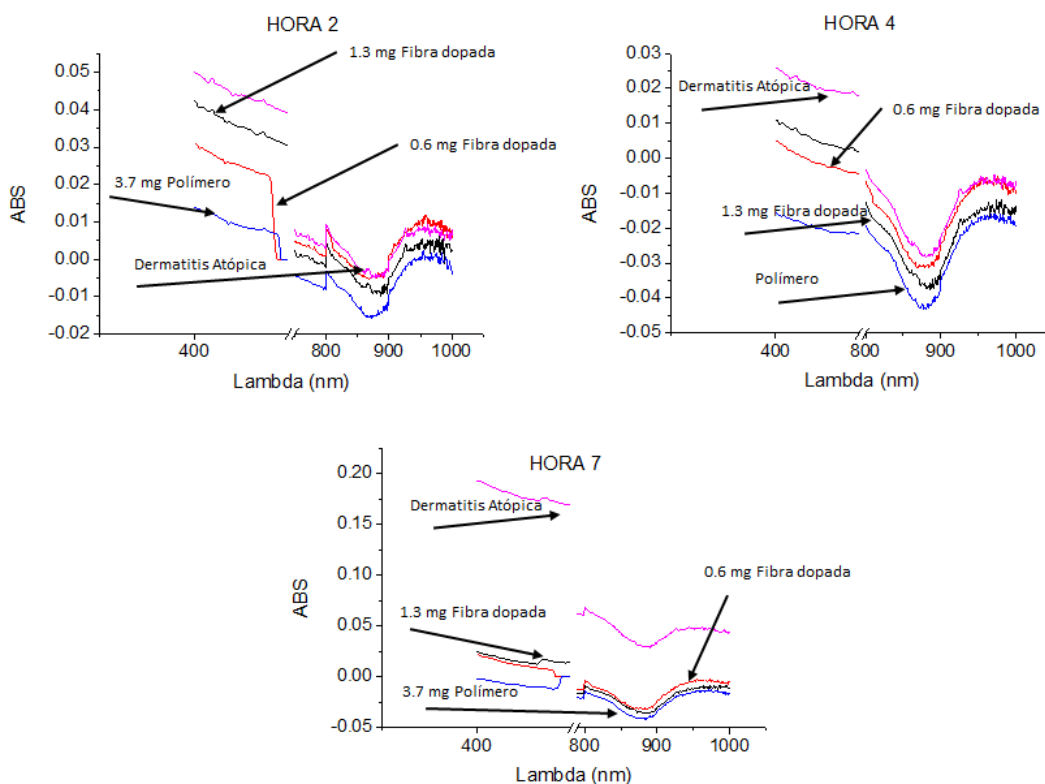


Figura 3.10. Espectros de absorción para la bacteria *Dermatitis Atópica* inoculada con Luria-Bertani, Luria-Bertani con fibra dopada y Luria-Bertani con polímero no dopado.

Las curvas de tiempo versus absorbancia que describen el crecimiento temporal de la población de bacterias, se muestran en la figura 3.11, donde se observan 5 gráficas generadas a 400, 500, 700, 900 y 1000 nm. Las curvas que se muestran son bien comportadas y puede observarse que la única que presenta un crecimiento significativo es la muestra que contiene solamente el medio de cultivo y la bacteria. El crecimiento se dispara exponencialmente a partir de la hora 7 hasta la hora 8, observándose después una fase estacionaria.

Se observa que las muestras que contienen bacteria, fibra dopada y polímero no dopado inhiben el crecimiento de esta bacteria en un 100 %.

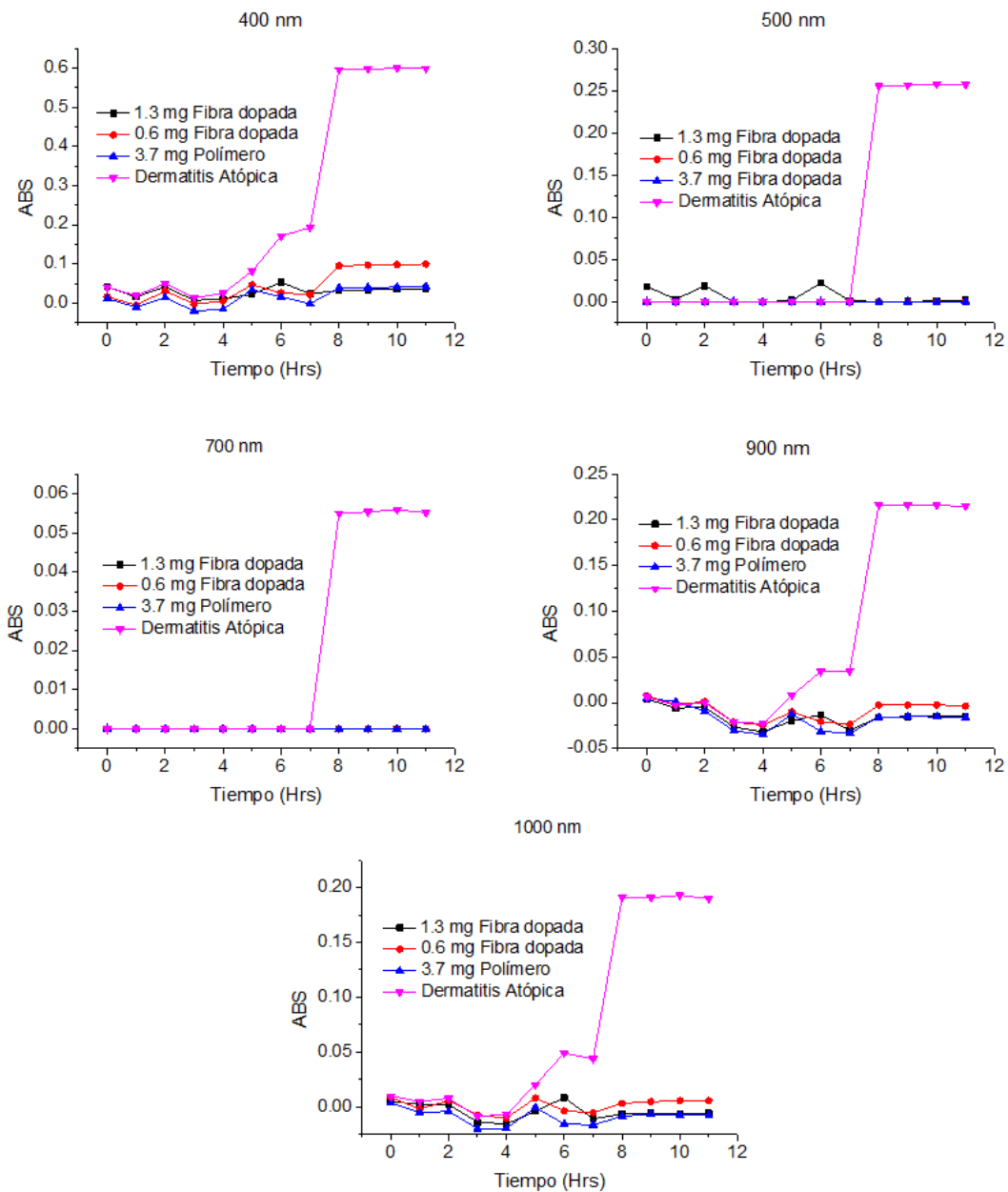


Figura 3.11. Curvas de crecimiento bacteriano versus tiempo para la bacteria *Dermatitis Atópica* en medio Luria-Bertani, Luria-Bertani con fibra dopada y Luria-Bertani con polímero no dopado.

Como conclusión para esta bacteria, el presente trabajo demuestra que tanto la fibra dopada como el polímero no dopado inhiben el crecimiento al 100 %. Esto indica que el efecto bactericida del polímero dependerá de la

naturaleza de la bacteria a estudiar, ya que la bacteria *Lactobacillus Casei Shirota* tuvo un comportamiento muy diferente.

3.3.3 BACTERIA *ESCHERICHIA COLI*

En esta sección se analiza el efecto bactericida de la fibra dopada y del polímero no dopado en presencia de la bacteria *E. Coli*.

En la figura 3.12 se presentan las curvas de absorbancia versus tiempo a longitudes de onda de 400, 500, 600, 700, 900 y 1000 nm. Las curvas etiquetadas como “2.3 mg Fibra dopada” y “0.9 mg Fibra dopada” corresponden a muestras que contienen bacteria, medio de cultivo y fibra dopada. La etiquetada como “E. Coli” corresponde a bacteria y medio de cultivo, finalmente la etiquetada como “Polímero” corresponde a bacteria, medio de cultivo y 3.9 mg de polímero no dopado”.

Estas gráficas muestran que solo hay crecimiento exponencial de la población en la muestra que contiene solo la bacteria en el medio de cultivo, y que el crecimiento se dispara entre las 7 y 8 horas. Se puede observar además, que la fibra dopada y el polímero no dopado inhiben completamente el crecimiento de la población de bacterias. Como conclusión se demuestra que tanto la fibra dopada como la no dopada tienen un efecto bactericida sobre esta bacteria en un 100 %.

Con todo lo anterior finalmente se puede concluir y demostrar que las bacteria *E. Coli* y *Dermatitis Atópica* presentan una inhibición mayor que *Lactobacillus Casei Shirota* al polímero no dopado. El efecto del polímero no dopado dependerá de la naturaleza de la bacteria. El efecto bactericida de las fibras dopadas de nanopartículas de plata posiblemente se debe a que las nanopartículas desprenden iones plata, inhibiendo el proceso óxido-reducción celular de las bacterias actuando sobre la capacidad respiratoria de las bacterias, provocándoles la muerte [Alvarez, P. J. J, et al., 2012].

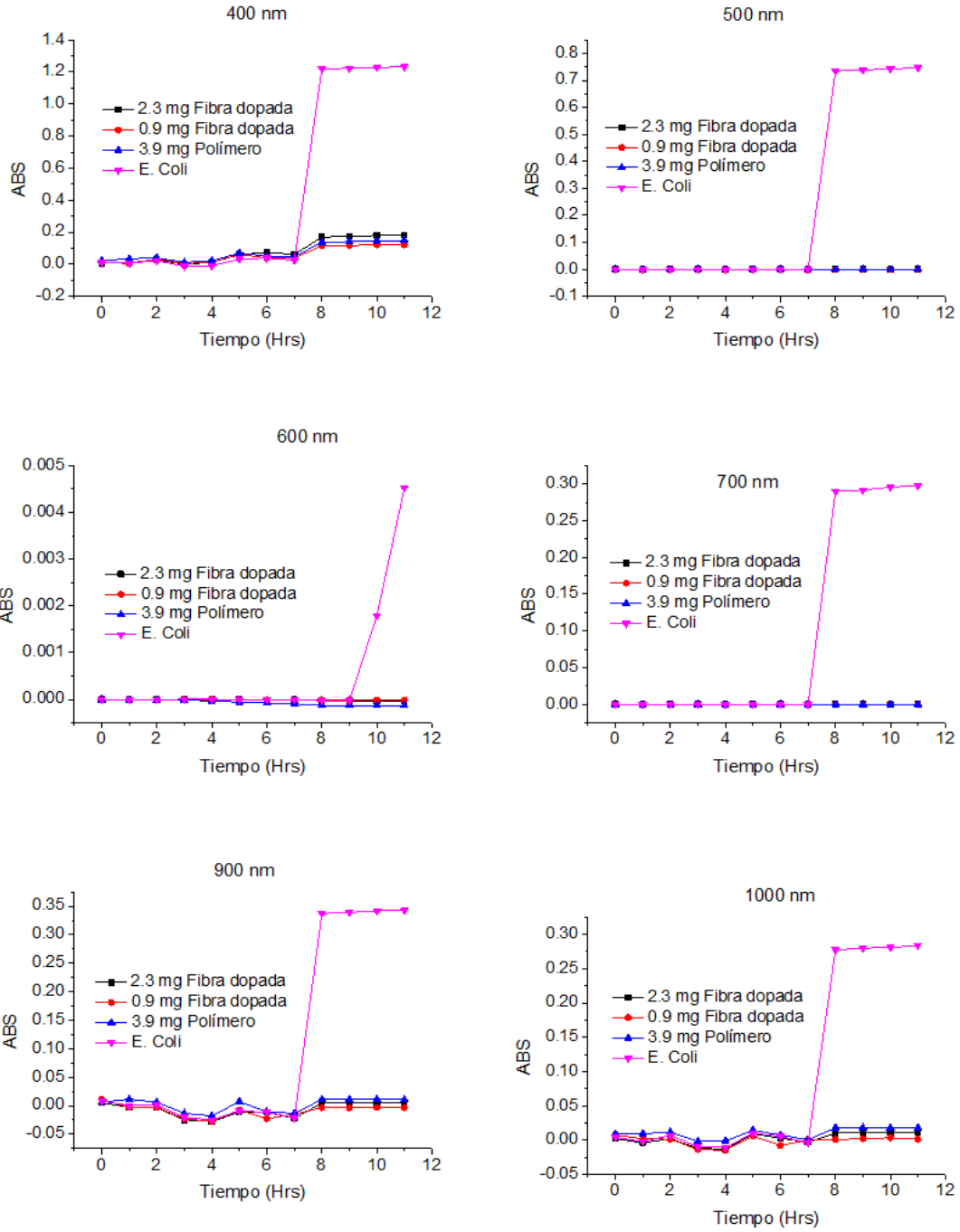


Figura 3.12. Curvas de crecimiento bacteriano versus tiempo para la bacteria *E. Coli* en medio Luria-Bertani, Luria-Bertani con fibra dopada y Luria-Bertani con polímero no dopado.

3.3.4 FIBRA DOPADA DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN PRESENCIA DE ORINA Y SALIVA HUMANA

Con la finalidad de analizar la estabilidad tanto de las fibras como de las nanopartículas, se tomaron dos muestras de la fibra dopada de nanopartículas de plata, las cuales se lavaron con agua desionizada y se secaron. Después se colocó una de las muestras en un tubo de ensayo con saliva y la otra muestra se introdujo en un tubo de ensayo con orina. Las muestras permanecieron en los tubos durante un periodo de 3 meses. Después de ese tiempo se observó a simple vista que la muestra de fibra dopada introducida en el tubo de ensayo con orina se degradó por completo. En el caso de la muestra introducida en saliva se podía observar aun a simple vista la fibra. Hecho esto se tomó una gota de cada tubo, la cual fue colocada en una rejilla de cobre y después se secó para ser analizada mediante un equipo de microscopía electrónica de transmisión. La figura 3.13 muestra dos microfotografías TEM de la muestra de fibra dopada en orina. Se puede observar en las dos imágenes la presencia de las nanopartículas de plata, más no de la fibra. Esto posiblemente se debe a que la orina solamente degradó la fibra dejando intactas a las nanopartículas. Como conclusión se puede decir que la estabilidad de las nanopartículas no se ve aparentemente afectada por la orina.

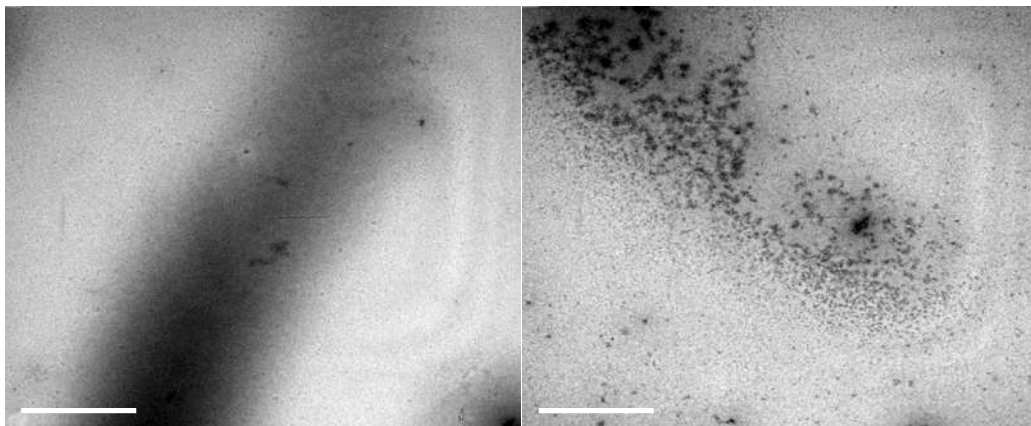


Figura 3.13. Fotomicrografías TEM de nanopartículas de plata en orina humana.

En la figura 3.14 se observan dos microfotografías de la muestra de fibra dopada colocada en saliva. En la figura 3.14A se observa la imagen de una fibra y en la figura 3.14B se observa la presencia de nanopartículas de plata sin la fibra. Esto indica que la saliva solamente remueve las nanopartículas de la fibra sin causar efecto alguno en las nanopartículas. En general, las fibras pueden seguir observándose en el TEM, por lo que se concluye que la saliva no degrada las fibras.

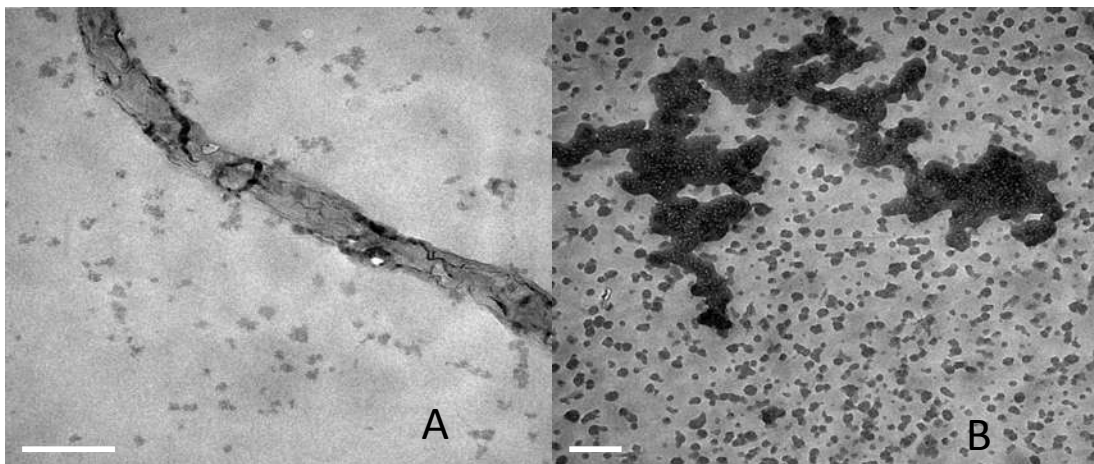


Figura 3.14 Fotomicrografías TEM de las fibras dopadas en saliva humana.

CAPITULO 4

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se presentó un método para sintetizar nanoestructuras complejas de nanopartículas de plata mediante reducción química, usando AgCN como precursor, Na_2SO_3 como reductor y dodecilsulfato de sodio como estabilizador con la finalidad de estudiar su efecto bactericida en tres tipos de bacterias:

- a) *Lactobacillus Casei Shirota*
- b) *Escherichia Coli*
- c) *Dermatitis Atópica*

El efecto bactericida de estas fibras no se había estudiado anteriormente por lo que su estudio fue la principal contribución de este trabajo. El estudio demostró que las fibras dopadas de nanopartículas de plata inhiben el crecimiento de las bacterias *Casei Shirota*, *Escherichia Coli* y *Dermatitis Atópica* en un 100 %. Se llevó a cabo además como otro objetivo principal el estudio del efecto bactericida del polímero de AgCN no dopado de nanopartículas. El estudio demostró que este polímero no dopado inhibió el crecimiento de las bacterias *E. Coli* y *Dermatitis Atópica* en un 100%, pero no tuvo efecto apreciable en la bacteria *Lactobacillus Casei Shirota*. Esto demostró que su efecto bactericida depende de la naturaleza de la bacteria sobre la que actúa.

Finalmente el presente trabajo concluyo que las nanoestructuras de plata sintetizadas presentan un efecto bactericida, el cual es comparable al efecto bactericida de las nanopartículas de plata sintetizadas por los distintos métodos que se describen a lo largo del presente trabajo.

Las curvas de crecimiento de las poblaciones de bacterias con el tiempo fueron obtenidas mediante espectroscopía Uv-Vis, controlando adecuadamente la

temperatura de crecimiento a 32 °C y tomando espectros de absorción cada hora, durante 21 horas.

REFERENCIAS

1. Alvarez, P. J. J, & Xiu, Z. m. (2012). Negligible Particle-Specific Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles. *NANO Letters*, 12, 4271-4275.
2. Bertani, G. (1951). Studies on Lysogenesis. I. The mode of phage liberation by Lysogenic Escherichia coli. *J. Bacteriol*, 62, 293-300.
3. Besson, C., Finney, E.E., Finke, R.G. (2005). A mechanism for transition-metal nanoparticle self-assembly. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 8179-8184.
4. Birol H, Rambo CR, Guiotoku M, Hotza D. Preparation of ceramic nanoparticles via cellulose-assisted glycine nitrate process: a review. *RSC Adv.* 2013.DOI 10.1039/C2RA21810K.
5. Boone, R. & Castenholz, R. (2001). *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. 2^a Ed. Editorial springer, USA, 1,148, 150, 153, 163.
6. Borovitskaya, E., & Shur, M. (2002). *Quantum Dots*. World Scientific, 25, 120-125.
7. Brock, T., & Madigan, M. (1993). *Microbiologia*. 6^{ta} Ed. Prentice Hall Hispanoamérica S. A. México.
8. Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades (2011). Brote de E. Coli productora de toxina shiga, Alemania.
9. Cobley, C.M., Skrabalak, S.E., Campbell D.J., Xia, Y. (2009). Shape-controlled synthesis of silver nanoparticles for plasmonic and sensing applications. *Plasmonics* 4, 171-179.
10. Corain, B., Schmid, G.,Toshima, N. (2008). *Metal Nanoclusters in Catalysis and Materials Science. The Issue of Size Control*. Elsevier, Amsterdam, Holanda.
11. Domínguez Domínguez, S. (2011). Tesis Doctorado: Síntesis de Nanopartículas Metálicas y Zeolitas para Catálisis y Separación de Gases.

12. Donkor, O. N., Henriksson, A., Vasiljevic, T., Shah, N. P. (2006). Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. *Int. Dairy J.* 16, 1181-1189.
13. Fahlman, D.B. (2008). *Materials Chemistry*. Springer. Dordrecht, Holanda.
14. Goia, D. (1998), Matijevic E. Preparation of monodispersed metal nanoparticles. *New J. Chem*, 1203-1215.
15. Guozhong, C. (2004). *Nanostructures and Nanomaterials*. En G. Cao, *Nanostructures and Nanomaterials* (2 ed., págs. 250-260). Washington: World Scientific Series.
16. Gutiérrez-Wing, C. (2001). *App. Phys. Journal of Applied Physics*, 70, 237-243.
17. Haes, A. J., & Van Duyne, R. P. (2002). A Nanoscale Optical Biosensor: Sensitivity and Selectivity of an Approach Based on the Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy of Triangular Silver Nanoparticles. *JACS ARTICLES*, 124(35), 10596-10604.
18. Hartmann, M., Bertditsh, M., Hawecker, J. (2010). Damage of the Bacterial Cell Envelope by Antimicrobial Peptides Gramicidin S and PGLa as Revealed by Transmission and Scanning Electron Microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(8), 3132-3142.
19. Hedberg, J., Lundin, M., Lowe, T., Blomberg, E., Wold, S., Wallinder, I.O. (2012). *J. Colloid Interface Sci.* 369, 193-201.
20. Heenan, C. N., Adams, M. C., Hosken, R. W. (2002). Survival and sensory acceptability of probiotic microorganisms in a nonfermented frozen vegetarian dessert. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol*, 124(35), 10596-10604.
21. Herndon, David. N. (2012). "Chapter 3 – Epidemiological, demographic, and outcome characteristics of burn injury". *Total Burn Care. Expert Consult* (4th ed.). Saunders.
22. Hiemenz, P.C., Rajagopalan, R. (1997). *Principles of Colloid and Surface Chemistry*. Third Ed. Marcel Dekker Inc. NY, USA.

23. Israelachvili, J. (2011). Intermolecular and Surface forces. Academic, Press150-157.
24. Jain, P., & Pradeep, T. (2004). Potencial of Silver Nanoparticle Coated Polyurethane Foam as an Antibacterial Water Filter. *Biotechnology and Bioengineering*, 90(1), 200-211.
25. Johnston, D. T., & Wolfe-Simon, F. (2009). Anoxygenic photosynthesis modulated Proterozoic oxygen and sustained Earth's middle age, 106(40).
26. Kelly K.L., Coronado, E., Zhao L.L., Schatz G.C. (2003). The optical properties of metal nanoparticles. The influence of size, shape and dielectric environment. *J. Phys. Chem| B*, 107, 668-677.
27. Kholoud, M. M., & Abou, E. N. (2010). Synthesis and applications of Silver Nanoparticles. *Arabian Journal of Chemistry*, 3(3), 135-140.
28. Kim, J. S., & Parks, S. J. (2007). Antimicrobial Effects of Silver Nanoparticles. *Science Direct*, 3, 95-101.
29. Kim, K. J., & Sung, W. S. (2008). Antifungal Effect of Silver Microbiology and Biotechnology. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(8), 1482-1484.
30. Krutyakov, Y.A., Kudrinskiy A.A., Olenin A.Y., Lisichkin G, V. (2008). Synthesis and properties of silver nanoparticles: advances and prospects. *Russ. Chem. Rev.* 77; 3, 233-257.
31. Lee, H. Y., & Park, H. K. (2007). A Practical Procedure for Producing Silver Nanocoated Fabric and its Antibacterial Evaluation for Biomedical Applications. *Royal Society of Chemistry*, 2959-2961.
32. Lopez Miranda, A. (2013). Tesis de doctorado: Sintesis y Caracterización de Nanoestructuras de Plata a Partir de la reducción de Iones Ag^+ y $Ag(CN)_2^-$ en Presencia de Dodecil Sulfato de sodio. San Luis Potosi.
33. Magariños, H. C., Cartes, P., Frasser, B., Selaive, S., Costa, M., Figuerola, F., Pizarro, O. (2008). Viability of probiotic micro-organism (*Lactobacillus Casei Shirota Bifidobacterium animalis subsp. lactis*) in milk-based dessert with cranberry sauce. *Society of Dairy Tech.* 61, 96-101.

34. Man, J. D., Rogosa, M., Sharpe, M. E. (1960). A Medium for the cultivation of Lactobacilli. *J Appl Bact*, 23,130-145.
35. Manikam, V.J., Cheong, K.Y & Razak, K.A. (2011). Chemical reduction methods for synthesizing Ag and Al nanoparticles and their respective nanoalloys. *Mat. Sci. Eng. B*. 176, 187-203.
36. Marciano, F.R., Bonetti L.F., Pessoa, R.S., Marcuzzo, J.S., Massi, M., Santos, L.V., & Trava-Airoldi, V.J. (2008). The improvement of DLC film lifetime using silver nanoparticles for use on space devices. *Diam. & Relat Mater*. 17, 1674-1679.
37. Martínez-Castañón, G.A., Niño-Martínez N., Martínez-Gutiérrez F., Martínez-Mendoza, J.R., Ruiz F. (2008). Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. *J. Nanopart. Res.* 10, 1343-1348.
38. Marzan, L. L. (2004). Nanometals and Formation of Color. *Materials Today*, 26-31.
39. McGiffen, S. P. (2005). "Biotechnology" Corporate power versus the public interest. Pluto Press.
40. Morones, J. R., & Yacaman, M. J. (2005). The Bactericidal Effects of Silver Nanoparticles. *Nanotechnology*, 16, 2346-2353.
41. Panizo, M. M., & Reviákina, V. (2001). *Candida albicans* su efecto patógeno sobre las mucosas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 21(2).
42. Prescott, H. K. (1999). *Microbiología*. 4ª Ed. Mc Graw-Hill Interamericana de España.
43. Rao, C.R.K., Trivedi D.C. (2006). Biphasic synthesis of fatty acids stabilized silver nanoparticles: Role of experimental conditions on particle size. *Mater. Chem. Phys.* 99, 354-360.
44. Singh, H. (2001). Nan

45. ostructured Materials and Nanotechnology. H. S. Nalwa, Nanostructured Materials and Nanotechnology, 1 Ed., 300-320. Concise.
46. Singh, M., & Singh, S. (2008). Nanotechnology in Medicine and Antibacterial Effect of silver Nanoparticles. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, 3(3), 115-122.
47. Sondi, I., & Sondi, B. (2004). Silver Nanoparticles as antimicrobial agent: A Case Study on E. Coli as a Model for Gram-Negative Bacteria. Journal of Colloid and Interface Science, 275, 177-182.
48. Sondi, I., Goia, D. V. & Matijevic, J. (2002). Preparation of highly concentrated dispersions of uniform silver nanoparticles, 260 (2003), 75-81.
49. Sparado, J., & Berger, T. (1974). Antibacterial Effects of silver Electrodes With weak Direct Current. Antimicrobial Agents Chemother, 6(5), 637-642.
50. Tolaymat, T.M., El-Badawy, A.M., Genaidy, A., Scheckel K.G., Luxton T.P., Suidan, M. (2010). An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticles in synthesis and applications: A systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers, Sci. Total Environ. 408, 999-1006.
51. Turkevich, J. P. (1951). Disc. of The Faraday Society. Royal Society of Chemistry, 11, 55-57.
52. Varner, K., Stanford, J., El-Badawy, A., Feldhake, D., Vengatapathy, R. (2010). Scientific, Technical, Research, Engineering and Modeling Support. Final Report. State of the Science Literature Review. Everything Nanosilver and More. EPA/600/R-10/084.
53. Yamamoto, M., Kashiwagi, Y., Nakamoto, M. (2006). Size-controlled synthesis of monodispersed silver nanoparticles capped by long-chain alkyl carboxylates from silver carboxylate and tertiary amine. Langmuir 22, 8581-8586.