



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

TESIS

**Efecto biocida de las nanopartículas de plata soportadas en
clinoptilolita y óxido de cerio.**

Para obtener el grado de:

LICENCIATURA EN INGENIERÍA QUÍMICA

Presenta el alumno:

Wendoline Monserrat Gonzalez Barajas

Asesor de Tesis:

D.C. Roberto Guerra González

Coasesor:

D.C. José Luis Rivera Rojas

Morelia, Michoacán, Febrero del 2018



FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

PROGRAMA ACREDITADO



No. Oficio 307/2017/2018
Morelia, Michoacán, a 06 de febrero de 2018
Asunto: Autorización de Impresión de Tesis

LIC. ULISES GUTIÉRREZ VÁZQUEZ
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN
DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA
P R E S E N T E.

Por este medio, me estoy permitiendo transcribir a esa Sección de Certificación a su digno cargo la comunicación enviada a esta Dirección por la mesa de jurado de examen Recepcional de esta fecha y que a la letra dice:

Atendiendo a las indicaciones se hizo la revisión de manuscrito de Tesis presentado por la pasante de Ingeniera Química:

Creemos que es de aceptarse dicho manuscrito con las modificaciones sugeridas verbalmente a la interesada: ENTERADOS: WENDOLINE MONSERRAT GONZÁLEZ con matrícula 0483847H

DR. GUERRA GONZÁLEZ ROBERTO
M. EN I.P. ARNULFO MARÍN LÁZARO
M.C. GARCÍA SALINAS MARÍA DE LA SALUD LAURA

97003158
82014078
10005080

Comunico a Usted lo anterior para los fines legales a que haya lugar.

ATENTAMENTE


DRA. MA. DEL CARMEN CHÁVEZ PARGA
DIRECTORA
DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA DE LA UMSNH





FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

PROGRAMA ACREDITADO



Morelia, Michoacán, a 07 de febrero de 2018.

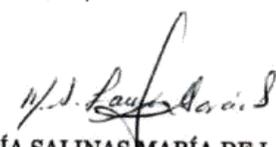
DRA. MA. DEL CARMEN CHÁVEZ PARGA
DIRECTORA
DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA DE LA UMSNH
PRESENTE

Atendiendo a sus indicaciones se hizo la revisión de manuscrito de TESIS presentada por la P.I.Q.
WENDOLINE MONSERRAT GONZÁLEZ CON MATRÍCULA 0483847H

Creemos que es de aceptarse dicho manuscrito con las modificaciones sugeridas verbalmente a la interesada.


DR. GUERRA GONZÁLEZ ROBERTO
PRESIDENTE 97003158


M. EN I.P. ARNULFO MARÍN LÁZARO
VOCAL 82014078


M.C. GARCÍA SALINAS MARÍA DE LA SALUD LAURA
VOCAL 10005080



Agradecimientos

A mi madre Ana Silvia por toda su persuasión para lograr esto, sin su colaboración nada de esto habría sido posible, ella ha sido mi gran ejemplo de luchar por lo que se quiere, gracias por enseñarme tanto; a mi padre sé que él estaría feliz.

A mis hermanos Cindy, Jessica y Carlos que siempre estuvieron conmigo apoyándome en todo momento, por cuidarme y procurarme al haber sido la hermana menor, por compartir tantas aventuras y desventuras juntos.

A mi esposo Edder por estar presente en todo momento, por tu amor incondicional, por creer en mí y animarme a continuar cuando todo se veía incierto.

A mis amigos Luis Ponce, Alfredo Erazo, Pablo Islas y Roxana Herrera lo mejor de mi transcurso en la Universidad fue haber coincidido, ustedes son prueba fiel que aún existen buenas personas, que todos tenemos diferentes batallas por las cuales luchar pero que todo es una cuestión de actitud, han enriquecido mi vida y gracias por compartir tantas cosas conmigo.

A mi asesor de tesis el Dr. Roberto Guerra González por su apoyo e instrucción, por la confianza y amistad que se forjó en el transcurso de este trabajo.

A mi mesa de sinodales M.C Laura Salinas M.C Arnulfo Marín por su amabilidad y disposición de enriquecer el presente trabajo con sus recomendaciones aportadas.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por la formación integral que me ha brindado, me siento muy orgullosa de haber pertenecido a esta institución.

ÍNDICE

I. Introducción.....	1
I.1 Justificación.....	3
I.2 Objetivos e hipótesis	5
II. Marco teórico	6
II.1 Escherichia coli.....	7
II.2 Desinfección microbiológica del agua	8
II.2.1 Desinfección por cloración.	8
II.2.2 Purificación por ozono.....	9
II.2.3 Desinfección por rayos ultravioleta.	9
II.2.4 Desinfección con nanopartículas de plata.....	9
II.3 Plata iónica como bactericida	10
II.4 Plata como antibiótico.....	13
II.5 Mecanismos de la plata como bactericida	13
II.6 Interacción bacteria-metal	14
II.7 Partículas de Ag soportadas como bactericidas.....	17
II.8 Zeolitas	18
II.8.1 Zeolita clinoptilolita.....	19
II.9 Óxido de cerio	20
III. Metodología	21
III.1 Clinoptilolita protonada	21
III.2 Síntesis de CeO ₂ por el método de hidrotérmico	21
III.3 Método de impregnación húmeda incipiente	22
III.4 Método de reducción con hidrógeno	22
III.5 Caracterización de materiales	23
III.5.1 Microscopia electrónica de barrido (MEB)	23
III.5.2 Difracción de rayos X (DRX)	24

III.5.3 Microscopia electrónica de transmisión (TEM)	24
III.6 Evaluación de la actividad antibacterial	24
III.6.1 Preparación de caldos nutritivos	24
III.6.2 Preparación de placas con agar	25
III.6.3 Cepa bacteriana.....	25
III.6.4 Pruebas de pureza.....	25
III.6.5 Turbidez estándar para la preparación del inóculo	26
III.6.6 Preparación de los inóculos	26
III.6.7 Dilución en caldo.....	26
III.6.8 Dilución en agar	28
III.6.9 Crecimiento bacteriano en presencia de los materiales.....	28
IV. Resultados y discusiones	30
IV.1 Caracterización por difracción de rayos X.....	30
IV.2 Caracterización por microscopia electrónica de transmisión.....	32
IV.3 CMI y CMBs de los materiales.	35
IV.5 Pruebas microbiológicas para evaluar tiempos de inhibición	38
Conclusiones.....	43
Recomendaciones	44
Bibliografía	45

ÍNDICE DE GRÁFICAS Y FIGURAS

Figura II.1 (a) Estructura de la zeolita clinoptilolita, (b) anillos de 8 y 10 tetraedros que forman las ventanas de los canales.....	19
Figura III.1. Equipo para método hidrotérmico y horno marca Felisa.	21
Figura III.2. Equipo de reducción de polvos mediante hidrógeno marca LINDBERG/BLU	22
Figura III.3. Microscopio electrónico de barrido MEB modelo JSM-7600 JEOL Noran Instruments.....	23
Figura III.4 Metodología para la determinación de la CMI y CMB.....	27
Figura IV.1 Patrón de DRX de ClinoAg-X-Y	31
Figura IV.2 Patrón de DRX de CeO ₂ -Ag a 500°C con 4% de Ag	31
Figura IV.3 Histogramas de distribución de tamaño de partícula de clinoAg-X-Y: a) clinoAg-500-2.1 b) clinoAg-500-4 c) ClinoAg-700-2.1 d) clinoAg-700-4	33
Figura IV.4 (a), (b), (c) y (d) Microfotografías de CeO ₂ -Ag reducido a una temperatura de 500 °C con 4% de Ag, aumento de 1000x; 2500x; 5000x; y 10000x respectivamente	34
Figura IV.4. Antibiograma en medio líquido de E. coli frente a ClinoAg-700-4 a CMI de: a) 2.2 mg/mL b) 3.3 mg/mL c) 4.4 mg/mL d) 5.5 mg/mL y e) 6.6 mg/mL	36
Figura IV.5 Antibiograma en medio sólido de E. coli frente a ClinoAg- 500-2.1, CMBs de: a) 2.2 mg/mL, b) 3.3 mg/mL, c) 4.4 mg/mL y d) 5.5 mg/mL	37
Gráfica IV.1. Efecto inhibitorio de clinoAg-500-2.1, ClinoAg-500-4 y clinoNa a CMI de 4.4 mg/mL sobre el crecimiento de E. Coli	41
Gráfica IV.2. Efecto inhibitorio de clinoAg-700-2.1, ClinoAg-700-4 y clinoNa a CMI de 4.4 mg/mL sobre el crecimiento de E. Coli	41
Gráfica IV.3. Efecto inhibitorio de ClinoAg-500-4 y CeO ₂ -Ag-500-4 a CMI de 4.4 mg/ml sobre el crecimiento de E. Coli	42

ÍNDICE TABLAS

Tabla IV.1. CMI de las NPAg y los materiales ClinoAg-X-Y y CeO ₂ Ag-X-Y para eliminar <i>E. coli</i>	35
Tabla IV.2. Crecimiento de colonias de <i>E. Coli</i> expuestas a 4.4 mg/ml de material ClinoAg-X-Y.....	38
Tabla IV.3. Número de colonias <i>E. Coli</i> frente a los materiales evaluados como biocidas	40

Glosario

Adhesinas. Componente molecular de superficie, cuya función es promover las interacciones de adhesión con otras células o matriz extracelular.

Agar.- Caldo nutritivo.

Bacteria. Organismos unicelulares procarióticos.

Bactericida. Propiedad por la cual un biocida (agente físico o químico) puede matar bacterias, con o sin lisis de éstas.

Biocida. Compuesto químico que mata microorganismos.

Cepa. Población de una especie que desciende de una sola célula.

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). La mínima concentración de una sustancia capaz de inhibir el crecimiento de 10^5 bacterias en 1 ml de medio de cultivo, tras 18-24 hrs de incubación.

Concentración Mínima Bactericida (CMB). La mínima concentración de una sustancia capaz de inhibir el crecimiento de 10^5 bacterias en 1 ml de medio de cultivo, tras 18-24 hrs de incubación.

Escherichia Coli. Bacteria gram-negativo de la familia de las enterobacteriaceae que se encuentra en las heces y también en el colon de los humanos y de otros mamíferos.

Gram positivo. Célula procariótica cuya pared celular consiste principalmente de péptidoglucano y no posee membrana externa.

Gram negativo. Célula procariótica cuya pared celular contiene relativamente poco péptidoglucano y tiene una membrana.

Hongo. Organismo eucariótico osmotrófico, unicelular, filamentoso o macroscópico.

Invasinas. Habilidad para invadir tejidos

Inóculo. Material introducido en el medio de cultivo que contiene microorganismos.

Liposoma. Moléculas de fosfolípidos forman vesículas pequeñas y cerradas. Estas vesículas consisten en una sola capa doble de lípidos.

Toxinas.- Sustancia venenosa elaborada por un organismo.

Procariota. Célula cuyo material nuclear no está rodeado de una membrana.

Virus.- Parásito intracelular obligado que contiene ARN o ADN, y tiene un estado extracelular

Resumen

Se soportaron partículas de plata en clinoptilolita y óxido de cerio, se seleccionaron estos soportes debido a que se puede variar fácilmente sus propiedades físico-químicas y se evaluaron como bactericidas de microorganismos *Escherichia coli*. Las variables estudiadas fueron la cantidad de plata soportada en la clinoptilolita y la temperatura de reducción. Se sintetizó el óxido de cerio por el método hidrotérmico, se depositó la plata en ambos soportes por impregnación húmeda incipiente y se procedió a una reducción mediante un flujo de hidrógeno con la finalidad de obtener plata metálica. Los materiales se caracterizaron por difracción de rayos X (DRX), microscopía electrónica de transmisión (MET) y microscopía electrónica de barrido (MEB). Los microorganismos se incubaron en caldo de soya tripticaseína, empleando agar selectivo para su detección y cuantificación; la determinación del número de unidades formadoras de colonias (UFC) se realizó con la técnica de conteo de colonias y área de las mismas.

Para el estudio del efecto biocida se empleó una CMI de 4.4 mg/mL para los materiales clinoptilolita-Ag y CeO₂-Ag a una concentración de 4% en peso de plata, en la cual se observó la eliminación completa de las colonias de *Escheria Coli* a diferentes tiempos de 30 y 60 min correspondientemente.

Palabras clave: Clinoptilolita, óxido de cerio, plata, *Escherichia Coli*, CMI.

Abstract

Silver particles will be supported in clinoptilolite and cerium oxide, these supports were selected due to their physical-chemical properties can be easily varied and evaluated as bactericides of microorganisms *Escherichia Coli*. The variables studied were the amount of silver supported in the clinoptilolite and the reduction temperature. The cerium oxide was sintered by the hydrothermal method, the silver was deposited on both supports by incipient wet impregnation and proceeded to a reduction by a flow of hydrogen with the purpose of obtain metallic silver. The materials were characterized by X-Ray diffraction (XRD), transmission electron microscopy (TEM) and scanning electron microscopy (SEM). The microorganisms were incubated in tripticasein soy broth, using selective agar for detection and quantification; the determination of the number of colony forming units (CFU) was carried out with the colony counting technique and area of the same.

For the study of the biocidal effect, an MIC of 4.4 mg/mL was used for the materials clinoptilolita-Ag and CeO₂-Ag at a concentration of 4% by weight of silver, in which was observed the complete elimination of the colonies of *Escheria Coli* at different times of 30 and 60 min correspondingly.

I. Introducción

Diversas enfermedades suelen ser causadas por el consumo de agua contaminada desde enfermedades relacionadas con algún tipo de microorganismo o por medio de agentes químicos. Por ello, la transmisión de patógenos por medio del agua continúa siendo un problema grave. La gran preocupación ha llevado a una investigación más intensa y el desarrollo de tecnologías sustentables, así como de normatividades cada vez más estrictas. Por esto, los agentes antimicrobianos son necesarios para inhibir la reproducción de patógenos. Una amplia variedad de agentes antimicrobianos se han empleado para este fin, cuya eficacia está determinada por varios factores físico-químicos. Muchos de ellos, sin embargo, son tóxicos, lo que los limita para su aplicación en algunos medios como agua potable, alimentos y productos textiles. En este sentido, la plata es un bactericida no tóxico para el ser humano que puede reducir significativamente muchas infecciones bacterianas (Yin H., 1999).

La actividad antimicrobiana de especies de plata, los iones en particular, está bien documentada y se ha utilizado durante mucho tiempo para el tratamiento de heridas (Hugo W., 1995; Demling R., 2001). Por ejemplo, las soluciones de AgNO_3 se han utilizado con frecuencia para el tratamiento de quemaduras.

El área superficial de las partículas metálicas en contacto con las bacterias, está directamente relacionada con su eficiencia como bactericida. Por lo tanto, el área superficial de las partículas de Ag será primordial. Por ejemplo, la alta superficie específica y alta proporción de átomos de la superficie de las partículas de plata da lugar a una gran actividad bactericida, si se compara con el metal de plata a granel (Chmielewska D., 2006). Además, la plata cuando se usan en cantidades razonables, no tiene efectos negativos en el cuerpo humano.

En el ámbito de la catálisis, a fin de maximizar la superficie activa los catalizadores están frecuentemente compuestos por un metal (fase activa) soportado en una estructura inorgánica. Por tanto, esta estrategia podría utilizarse para preparar partículas de plata soportadas, capaz de inhibir el

crecimiento de patógenos, ya sea añadiéndolos directamente en agua o incorporándolos en varios materiales. Teniendo en cuenta estas aplicaciones, se inició este trabajo con el objetivo de estudiar la eficiencia de la plata soportada en clinoptilolita y en óxido de cerio como sistemas para evitar el desarrollo bacteriano

I.1 Justificación

La contaminación microbiológica de las aguas de consumo humano impacta negativamente a la salud de la población. Los riesgos epidemiológicos, relacionados con el consumo de agua contaminada por microorganismos virulentos son causales de cólera, fiebre tifoidea o hepatitis vírica. Una contaminación microbiológica puede afectar a algunas personas o comunidades enteras, dependiendo de la calidad o del tipo de microorganismo, su modo de transmisión, así como el perfil de las personas contaminadas. La contaminación microbiológica del agua ocurre por lo general a través de aguas residuales con heces de origen humano o animal (Anales de la real academia nacional de la medicina, 1975).

El riesgo de contraer una infección por microorganismos patógenos depende de su grado de invasión, de su dosis mínima infectante así como del nivel inmunológico del organismo huésped. Algunas bacterias patógenas pueden incluso multiplicarse en los alimentos y las bebidas, lo que aumenta los riesgos de infección. Debido a estas condiciones, en el caso de los microorganismos patógenos no existe un límite inferior tolerable; por lo que el agua destinada al consumo (alimentos y bebidas) y a la higiene personal no debe contener ningún agente patógeno para los seres humanos (NMX-AA-42-SCFI-1987, 2000).

Las investigaciones dirigidas a la búsqueda de otras alternativas para el tratamiento de las infecciones causadas por bacterias y virus resistentes se incrementan cada día. Dentro de la gama de compuestos cuya actividad bactericida se está investigando, las nanopartículas de plata surgen como un prometedor agente antibacteriano que podría ser utilizado para enfrentarnos a esta y otras bacterias resistentes a los antibióticos.

En diversos estudios se han observado las propiedades antimicrobianas de las nanopartículas de plata tanto en virus como en bacterias. Se ha determinado que las nanopartículas de plata tienen efecto en bacterias gram negativas como

Escherichia coli y *Salmonella typhi* (R. Guerra et al., 2012) y gram positivas como *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* (Shrivastava et al., 2007) y *Enterococcus faecalis* (Panacek et al., 2006).

Se espera que los cationes de plata (Ag^+), sean atraídos electrostáticamente por las células y entonces se produzcan reacciones en la superficie celular, desalojando los iones Ca^{2+} y Zn^{2+} . Sin embargo, en solución acuosa los iones (Ag^+) pueden intercambiarse con otros iones del medio, disminuyendo así su disponibilidad para afectar a las bacterias. Así, las partículas metálicas de Ag^0 son deseables y se espera sean igualmente letales que las partículas de plata iónica (Ag^+) para matar bacterias.

El área superficial de las partículas metálicas en contacto con las bacterias, está directamente relacionada con su eficiencia bactericida. Por lo tanto, el área superficial de las partículas de Ag será de suma importancia. Además, la plata, cuando se usan en cantidades razonables, no tienen efectos negativos en el cuerpo humano.

I.2 Objetivos e hipótesis

Objetivo general

Evaluar las propiedades bactericidas de las nanopartículas de plata soportadas en clinoptilolita y óxido de cerio frente a bacterias *E. Coli*.

Objetivos particulares

- Evaluar el efecto que tienen los soportes clinoptilolita y CeO_2 en las propiedades bactericidas de las partículas metálicas (Ag).
- Determinar las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y concentraciones mínimas de bactericida (CMB) de los materiales biocidas en estudio para inhibir la *E. coli*.

Hipótesis

La plata, por su afinidad a reaccionar con el azufre, puede interactuar con los grupos sulfhidrilos (-SH) de las enzimas, inhibiendo la actividad enzimática de los liposomas. Un mayor efecto bactericida de la plata se consigue al incorporarlos en clinoptilolita o CeO_2 para tener una mayor área activa.

II. Marco teórico

El agua es un factor importante en el desarrollo de la sociedad, debido a los diversos usos que se le da. En México la comisión nacional del agua es el órgano encargado de valorar los asuntos que tengan que ver con el agua, como lo son su distribución, almacenaje y mantenimiento. La Comisión Nacional del Agua (CNA, 2011) en su reporte estadístico anual nos indica los diferentes usos que se le da en México, presentándolos en cuatro grupos: abastecimiento público, industria autoabastecida, agrícola y la generación de energía. Así también, nos indica que de un 100% del agua con la que cuenta el país anualmente, el 76.7% es destinado a la agricultura, el 14.1% al abastecimiento publico, 4.1% a la industria y un 5.1% a la generación de energía. El agua pura es renovable, sin embargo puede ser contaminada por sustancias químicas orgánicas e inorgánicas.

La contaminación del agua representa un grave problema no solo para los seres humanos si no también, para la flora y la fauna que habita los diferentes ecosistemas existentes.

La contaminación puede proceder de dos orígenes, de fuentes naturales y la que se debe a la actividad humana. La agricultura requiere mayor cantidad de agua que otros usos, como el doméstico o el industrial; sin embargo, para el uso de aguas residuales debe considerarse aspectos de calidad con el fin de evitar riesgos a la salud pública, principalmente en lo que se refiere a sus características microbiológicas. Ésta es considerada la principal razón para el establecimiento de guías y regulaciones para el reusó seguro de estas aguas en diferentes aplicaciones (Metcalf y Eddy 2003).

El uso de aguas residuales en la agricultura presenta beneficios asociados al mejoramiento de la fertilidad de los suelos agrícolas por el aporte de materia orgánica, macronutrientes (N y P) y oligoelementos, como Na y K, permitiendo reducir, y en algunos casos eliminar la necesidad del uso de fertilizantes químicos

y trayendo beneficios económicos al sector (van der Hoek, Feenstra y Konradsen 2002).

El aprovechamiento de aguas residuales para riego agrícola podría presuponer en principio una menor exigencia que el necesario para otras actividades, sin embargo, deben considerarse los riesgos asociados a la salud y al medio ambiente (Scott 2004), ya que debemos tomar en cuenta la posible presencia de microorganismos patógenos y otros elementos que pudiese ocasionar problemas de contaminación de aguas, tanto superficiales como aguas subterráneas.

En trabajos realizados por (Palacios, y otros 1999) se pudo observar que la presencia de Salmonella persiste en las plantas después de 10 días de haberlas regado con aguas a las cuales se les había añadido esta bacteria, lo que indica que existe la probabilidad de que una bacteria puede sobrevivir durante un periodo relativamente largo en cultivos regados con aguas contaminadas.

Por lo que se piensa, que debido a lo anterior las áreas de cultivo funcionan como filtros biológicos de las aguas residuales, sin embargo, no se ha estudiado a detalle el problema que genera el uso de este tipo de aguas sobre el cultivo, los suelos o en la población.

Debemos de tener en cuenta que, la meta del tratamiento de aguas residuales nunca ha sido la obtención de un producto estéril, si no el hecho de reducir el nivel de microorganismos dañinos para la salud del usuario a niveles más seguros de exposición.

II.1 Escherichia coli

La *Escherichia coli* (*E. coli*) es de gran importancia para el humano debido a que forma parte de flora normal del intestino, así como por los padecimientos extra intestinales que causa y que destaca entre los principales agentes causales de síndromes diarreicos.

Es una de las especies bacterianas más minuciosamente estudiadas y no solamente por sus capacidades patogénicas, sino también como sustrato y

modelo de investigaciones metabólicas, genéticas, poblacionales y de diversa índole (Neidhardt 1999).

Se trata de bacterias de rápido crecimiento y amplia distribución en el suelo, el agua, vegetales y gran variedad de animales. Son bacilos gram negativos poco exigentes en sus necesidades nutritivas y relativamente resistentes a los agentes externos, fermenta la lactosa y la glucosa, con producción de gas y ácidos diversos, presenta diferentes factores de virulencia (por ejemplo, adhesinas, invasinas y toxinas) que son responsables de una amplia gama de enfermedades diarreicas (Nataro J., 1998).

Como integrante de la flora normal del hombre y de muchos animales, se le considera un germen indicador de contaminación fecal cuando está presente en el ambiente, agua y alimento.

Las *E. coli* diarreagénicas se clasifican en seis patotipos: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* difusamente adherente (DAEC), y *E. coli* enteroagregativa (ECEA) (Nataro J., 2005). La CEEA se considera la principal causa de brotes de diarrea en Europa, el Reino Unido, Suiza y Japón. La CEEA y ETEC es causal de diarrea bacteriana y es común en los países en desarrollo (Ruttler M. et al, 2002; Nataro J. et al, 2006).

II.2 Desinfección microbiológica del agua

La desinfección es la destrucción de los microorganismos patógenos del agua ya que su presencia en este es perjudicial para la salud. Existen diferentes desinfectantes que pueden eliminar o desactivar los microorganismos patógenos entre estos está el uso de algunas sustancias como el cloro, ozono, plata, entre otros y métodos por medio de radiación UV.

II.2.1 Desinfección por cloración.

Este proceso de purificación es el más utilizado en la actualidad debido a su bajo costo, emplea como agente desinfectante cloro o compuestos clorados que

causan alteraciones físicas, químicas y bioquímicas en la pared celular, de esta forma se destruye la barrera protectora de la célula dejándola indefensa y disminuyendo sus funciones vitales hasta llevarla a la muerte. Una de las principales desventajas del uso de cloro y derivados es que reacciona con la materia orgánica presente y da lugar a trihalometanos (THM) muchos de los cuales se ha demostrado son tóxicos o carcinogénicos. Otro inconveniente es que en agua que contiene fenoles en contacto con el cloro se da la formación de clorofenoles lo que provoca un olor desagradable en el agua.

II.2.2 Purificación por ozono.

En este método de purificación se emplea como agente inhibidor el oxígeno enriquecido (O_3). Debido a que es la forma más activa del oxígeno es capaz de destruir virus, bacterias, parásitos, priones, hongos, mohos, esporas y muchos otros contaminantes por oxidación en pocos segundos. Una ventaja del ozono es que no deja residuos en la sustancia a desinfectar ya que al ser muy reactivo rápidamente se descompone en oxígeno. No obstante la desventaja del ozono es que dada su inestabilidad, es muy difícil almacenarlo, por lo que se tiene que producir justo en el lugar donde se aplica lo cual resulta un método costoso.

II.2.3 Desinfección por rayos ultravioleta.

En este método se utilizan ondas cortas de radiación ultravioleta que inciden sobre el material genético (ADN) de los microorganismos y los virus, destruyéndolos en corto tiempo, sin producir cambios físicos o químicos notables en el agua tratada, sin embargo tiene como desventaja que la luz ultravioleta no proporciona residuales. Esto quiere decir que después de la desinfección por este sistema hay que aplicar un compuesto químico para garantizar la seguridad microbiológica.

II.2.4 Desinfección con nanopartículas de plata.

La plata ha sido conocida desde tiempos inmemoriales como un efectivo agente antimicrobial, los compuestos que la contienen se han usado para prevenir el

ataque de microorganismos en catéteres, tejidos humanos, entre otros. Las diferentes propiedades que presentan las nanopartículas de plata son bactericidas, coloración, reactividad y relación área/volumen, las cuales dependen de su forma y tamaño.

Los Bionanocompositos representan un grupo de nanoestructuras que son formados por la combinación de polímeros naturales y de sólidos inorgánicos. La síntesis in situ de nanopartículas de metales nobles (Ag, Au, Pt, Pb), se lleva a cabo bajo condiciones ambientales; usando los poros de los soportes como nanoreactores. Este método consiste básicamente en la deposición de iones metálicos sobre la matriz, que en este caso corresponde a la zeolita, seguido por la reducción de estos iones metálicos, generando las nanopartículas que iniciaran a depositarse sobre los nanoporos del soporte.

II.3 Plata iónica como bactericida

La plata se usa actualmente en filtros de carbón activado para purificar el agua o evitar su contaminación. Las sales de plata poseen efectos bactericidas y fungicidas, además son efectivas como agente antiviral. Tienen afinidad por los grupos sulfhidrilos de los sistemas enzimáticos de la pared celular bacteriana, a través de la cual interfieren en la transferencia de energía transmembrana y en el transporte de electrones (Murray R., 2010). Las sales de plata, como el nitrato, se usan como antiséptico y astringente dermatológico; el sulfato de plata, por su parte, se usa en el tratamiento de quemaduras y heridas abiertas (Landeem K., 1989). La plata iónica ha demostrado una actividad antimicrobiana muy alta frente a bacterias gram negativas y moderada frente a bacterias gram positivas. La sulfadiazina de plata, un compuesto polimérico insoluble que libera plata lentamente, actúa como bactericida a la mayoría de las bacterias gram positivas, gram negativas y levaduras, por lo que se aplica en forma de crema como fungicida y antimicrobiano en quemaduras severas (Sadler P., 1991).

De manera general, las sales de plata tienen como sitio de acción los constituyentes citoplasmáticos y la interacción con grupos sulfhidrilo y amino,

mediante mecanismos de coagulación general, ataque a los ácidos nucleicos, y a los ribosomas (Maillard J., 2002).

La plata coloidal (suspensión de partículas de plata metálica) y la plata iónica (disolución de iones de plata) tienen poder bactericida, pero su comportamiento y efectos como inhibidor de bacterias son muy distintos. La plata coloidal inactiva las enzimas de las células bacterianas y hongos que usan oxígeno para su metabolismo, aunque en tiempos muy variables y dependientes de la temperatura. A temperaturas inferiores a 10°C se requieren tiempos muy largos, lo que hace difícil determinar el poder germicida con exactitud. La plata coloidal no elimina a los virus, pero es eficaz para destruir diversas bacterias (E. Coli, Staphylococcus Aureus, Pseudomonas, Aspergillus, fecales). El efecto de la actividad bactericida de la plata coloidal no se puede generalizar a una amplia variedad de microorganismos y tampoco se puede utilizar una dosis única. Se ha demostrado que el efecto bactericida de la plata coloidal es reducido cuando se le compara con el efecto de la cal o hipoclorito de sodio (Muñoz R., 1995) y que tiende a ser eficiente en la reducción de cargas bacterianas de coliformes (García J., 2004).

Los iones de plata se introducen en el interior de la célula a través de transportadores de metales presentes en su membrana, compitiendo con ellos por los lugares de captación. Actúan interfiriendo en la permeabilidad gaseosa de la membrana y una vez en el interior de la célula, alteran su sistema enzimático, inhibiendo su metabolismo y producción de energía y modificando su material genético. El resultado es que el microorganismo pierde rápidamente toda capacidad de crecer y reproducirse.

Los iones de plata eliminan a la mayoría de las bacterias, hongos, virus y protozoos, aunque son menos activos frente a las esporas (Russell A., 2003), tienen afinidad por el ADN tanto bacteriano como eucariótico, donde interactúan preferentemente con las bases nitrogenadas más que con los grupos fosfato (McDonell G., 1999).

En altas concentraciones los iones Ag^+ reaccionan con los grupos donadores de electrones e inhiben la mayoría de las reacciones enzimáticas. El intercambio de

sodio (Na^+) en la enzima oxido reductasa ubiquinona ha sido reconocido como uno de los primeros blancos de los iones de plata. La adición de concentraciones micromolares de Ag^+ fuera de la membrana induce un colapso total de una amplia variedad de bacterias (Dibrov P., 2002).

Los iones de plata actúan sobre los microorganismos a pH cercanos a 7 ya sea en el exterior o interior de la célula. En el exterior de la célula, los cationes de plata son atraídos electrostáticamente por la carga negativa de la membrana, en la que causan alteraciones drásticas en la pared celular y en la membrana citoplasmática (Goodman A., 1982). En el interior de la célula, la inactivación se produce por su interacción con las proteínas y en los ácidos nucleicos. La interacción de la plata con grupos sulfhídricos y las enzimas es uno de los orígenes de su capacidad biocida. Al parecer puede romper los enlaces N-H de las aminas purinas y pirimidinas causando la desnaturalización, evitando de este modo la replicación.

La forma soluble de la plata es la más tóxica para las bacterias. Sin embargo, tanto el medio ambiente como los medios de cultivo pueden inducir la formación de complejos con SO_4^{2-} , PO_4^{3-} o Cl^- , disminuyendo así la forma activa que inhibe el crecimiento bacteriano. La plata iónica mata células bacterianas sensibles por efectos en la superficie de la membrana celular, inhibiendo la respiración celular y desacoplando la síntesis de ATP (Belliveau B., 1987).

Se ha reportado que la eficiencia del material bactericida depende del tipo de microorganismo. En estudios con coliformes totales (gram negativa) y *Staphylococcus aureus* (gram positiva), se reportó que la elevada eficiencia bactericida de las partículas de plata para coliformes totales se debe a la diferencia de las estructuras de la pared de la célula en microorganismo gram negativo y gram positivo (Sondi I., 2004). Sin embargo, no hay suficiente evidencia para soportar dichas conclusiones debido a que la mayoría de las investigaciones sobre el efecto bactericida de nanopartículas sólo se ha hecho en un número muy limitado de cepas (Sondi I., 2004; Cho K., 2005).

II.4 Plata como antibiótico

El incremento en el número de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos ha promovido el interés del uso de plata como agente antibacteriano (Stobie N., 2008).

En los hospitales, uno de los compuestos que se usa con frecuencia es el nitrato de plata en soluciones diluidas, aplicándolo, por ejemplo, en los ojos de recién nacidos para evitar posibles infecciones (Rai M., 2009).

El uso de apósitos es muy útil cuando las bacterias resistentes a los antibióticos representan un problema. Una combinación de plata con sulfadiazida, se utiliza como crema tópica para uso en quemaduras graves (Tortora G., 2007). Los catéteres recubiertos con sulfadiazina de plata, proporcionan una protección contra el crecimiento de una amplia gama de microorganismos gram positivos y gram negativos. Este recubrimiento no parece causar la aparición de resistencia bacteriana (Esteban A., 2005). El uso de manguitos de colágeno impregnados en plata iónica disminuye la carga microbiana en el lugar de aplicación, protegiendo mediante dos vías la actividad antimicrobiana y es una barrera física que dificulta la migración de las bacterias (Torres M., 2002).

II.5 Mecanismos de la plata como bactericida

Aunque el mecanismo de la actividad antimicrobiana de la plata no se conoce del todo, se ha propuesto que en disolución acuosa interfiere en el transporte electrónico, en la unión al ADN cromosómico, e interacciona con la membrana celular y con el grupo tiol de ciertas enzimas, inhibiéndolas (Thurman R., 1989). Se asume que la plata tiene efecto bactericida por los cambios morfológicos y estructurales observados en la bacteria después de exponerse a sus compuestos. La plata reacciona con los grupos azufrados de las membranas de las enzimas, provocando que la membrana pierda permeabilidad; la bacteria no es capaz, entonces, de efectuar procesos de respiración y muere (Feng Q., 2000).

La actividad antimicrobiana de la plata depende de los iones de plata, que se unen fuertemente a grupos donadores de electrones en moléculas biológicas que contiene azufre, oxígeno o nitrógeno (Damm C., 2008). La formación de un complejo entre iones plata y proteínas puede interferir en el metabolismo de las células bacterianas y sus funciones, como permeabilidad y respiración (Panáček A., 2006). Ambos efectos dan camino a la destrucción de la célula. Además, los iones de plata pueden interactuar con el ADN de la bacteria, impidiendo la reproducción de la célula (Damm C., 2008).

El mecanismo probable de la plata como bactericida puede ser el siguiente: Los iones de plata (Ag^+) en contacto con las bacterias penetran la membrana celular, destruyendo la proteína de la bacteria suspendiendo la síntesis del ADN bacteriano. Finalmente, cuando la plata iónica interactúa con los grupos sulfhidrilos (-SH) de la enzima de los microorganismos, se forma un enlace S-Ag, bloqueando la actividad enzimática e impidiendo su respiración, provocando la muerte del microorganismo (Yan J., 2005). Las bacterias no pueden propagarse más.

II.6 Interacción bacteria-metal

La plata y otros metales pesados pueden llegar a ser muy efectivos en la inhibición del crecimiento bacteriano y son preferibles a otros agentes antibacterianos ya que no representan un riesgo alto ni cambian las características físicas del agua, minimizando la formación de subproductos durante el proceso de desinfección (Tortora G., 2007).

Para llevar a cabo sus funciones metabólicas, los microorganismos requieren de la presencia de algunos iones inorgánicos esenciales, como los iones de los metales calcio, magnesio, sodio, potasio y manganeso. Algunos metales presentes en el ambiente son intrínsecamente tóxicos y carecen de actividad biológica (como los metales pesados: plomo, mercurio, cadmio, cobre, plata, etc.) o bien son esenciales pero presentan toxicidad cuando se encuentran en concentraciones relativamente elevadas, es el caso de cobre, zinc, cobalto,

níquel, etc. Aunque los mecanismos de toxicidad de los metales son diversos, los sistemas más comunes involucran una interferencia con el transporte y la función de los iones fisiológicos esenciales o la integración como las macromoléculas celulares tales como las enzimas y los ácidos nucleicos.

Los iones que interactúan con las células bacterianas pueden clasificarse en tres grupos:

- Iones esenciales. Se refiere a aquellos iones que son indispensables para desarrollo bacteriano, como Mg^{2+} , K^+ , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , que son considerados como nutrientes; en este grupo están también aquellos que la célula requiere en menores cantidades como Mn^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} y Co^{2+} , que son considerados como micronutrientes o minerales traza.
- Iones no esenciales. Son iones que a pesar de su abundancia natural no son indispensables para el metabolismo bacteriano; entre ellos están Na^+ y Cl^- . Las bacterias los utilizan en procesos regulatorios o en funciones de las proteínas accesorias de las células (filamentos del citoplasma).
- Iones tóxicos. Son iones que dada su interacción con las macromoléculas celulares son altamente nocivos para el desarrollo bacteriano; incluyen los iones: Hg^{2+} , AsO_4^{3-} , AsO_2^- , Cd^{2+} , Ag^+ , Pb^{2+} , CrO_4^{2-} , TeO_3^{2-} , SbO^+ , BiO^+ y otros (Silver S., 1983). Las células bacterianas han elaborado mecanismos de resistencia a iones tóxicos; estos mecanismos son muy específicos, codificados por genes que se encuentran en plásmidos o en transposones (Silver S. et al., 1989).

Los principales mecanismos mediante los cuales las bacterias interactúan con los metales tóxicos son (Cervantes C., 1992): a) la precipitación extracelular de los iones tóxicos por sustancia excretadas por las bacterias; b) la unión de los cationes metálicos con las cubiertas celulares, por lo general con las cargas negativas de los constituyentes de la pared celular; c) la acumulación intracelular mediante la unión de los metales a componentes citoplasmáticos; d) las reacciones redox que convierten a algunos iones en especies químicas menos

tóxicas; y, e) los sistemas de expulsión de la membrana que impiden la acumulación de los iones nocivos.

En las bacterias los genes se hallan agrupados en los cromosomas. La reproducción de las bacterias puede inhibirse por los iones de los metales pesados tóxicos, pero a la vez, las bacterias pueden desarrollar resistencia al efecto tóxico del metal. Los genes que confieren esta resistencia a los metales pesados generalmente se localizan en los plásmidos, fuera del cromosoma bacteriano. Las estrategias bacterianas más eficientes para resistir a los metales tóxicos son probablemente las que provocan la expulsión del metal (en su forma de ion) desde el interior de las bacterias hacia el medio externo; de esta forma disminuye la concentración del ion dentro de la célula y por lo tanto se reduce su toxicidad (Cervantes C., 1992).

Varios metales pesados como la plata, mercurio y el cobre son germicidas o antisépticos. Cantidades muy pequeñas de metales pesados, en especial de plata y cobre, son capaces de ejercer actividad antimicrobiana, lo que se conoce como acción oligodinámica. Este efecto se produce por la acción de los iones de los metales pesados sobre los microorganismos. Cuando estos iones interactúan con los grupos sulfhidrilo existentes en las proteínas así como en el ADN, se produce su desnaturalización por la inhibición de los procesos respiratorios (Tortora G., 2007).

La plata es tóxica para las bacterias a concentraciones tan bajas como $0.5\mu\text{M}$ (Tuovinen O. et al, 1985).

Los niveles de tolerancia a iones metálicos dependen de la cepa y del estado fisiológico del organismo, de su historia previa a la exposición del metal tóxico y de las condiciones ambientales (Cooper R., 2004). La efectividad de los agentes antimicrobianos depende de la especie de bacteria. Las paredes de las células gram positivas contienen de 3 a 20 veces más peptidoglucano que una especie gram negativa, siendo las paredes gram positivas capaces de asimilar protones y cuentan con un carbohidrato semejante a la glucosa. Debido a que los peptidoglucanos pueden asimilar protones, las bacterias gram positivas son

generalmente menos sensibles a agentes antimicrobianos que contienen iones de metales pesados que las especies gram negativas (Kawahara K., 2000).

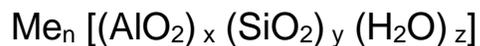
II.7 Partículas de Ag soportadas como bactericidas

El objetivo de utilizar un soporte para dispersar el metal es maximizar la superficie activa. Los soportes sin embargo son muchos y muy diferentes con respecto a sus propiedades físico-químicas, que a su vez determinan las propiedades de los metales soportados. Las partículas de plata soportada pueden usarse para inhibir el crecimiento de patógenos, ya sea añadiéndolas directamente en agua o incorporándolas en varios materiales.

Existen antecedentes del uso de zeolitas como soportes de materiales para la desinfección de los efluentes de procesos biológicos aerobios y anaerobios. Se aplican para evitar la propagación de ciertos organismos que producen patologías al hombre. Se han realizado numerosos estudios con zeolitas naturales, demostrándose sus efectos bactericidas sobre aquellos organismos presentes en las aguas residuales y en los efluentes de desechos sólidos. Los metales soportados en zeolitas naturales son elementos que dependiendo de su naturaleza y su concentración en un medio determinado, pueden ejercer diferentes efectos sobre los microorganismos, por ejemplo en pequeñas cantidades son catalizadores del crecimiento microbiano pero a partir de determinadas concentraciones son inhibidores microbianos.

II.8 Zeolitas

Las zeolitas y los materiales zeolíticos son sólidos cristalinos microporosos que contienen cavidades y canales de dimensiones moleculares (de 3 a 20 Å) en el cual se pueden acomodar moléculas en esos poros. Según la definición clásica, las zeolitas son aluminosilicatos cristalinos cuya celda unitaria tiene por fórmula general (Kesraoui-Ouki, 1994):



Siendo n , x , y , z números enteros y Me un catión metálico. No obstante, en general, los materiales zeolíticos pueden contener además de Si y Al, otros elementos como V, P y Ti.

Las zeolitas se utilizan a nivel industrial en procesos de adsorción de separación de gases, de catálisis e intercambio iónico (Bekkum H., 1991). La estructura de las zeolitas se basa en tetraedros covalentes TO_4 en los que el átomo T suele ser Si, Al o Ti. Los tetraedros se unen por los átomos de oxígeno formando una red tridimensional con canales y cavidades lo suficientemente grandes como para albergar cationes y algunas moléculas pequeñas tales como agua o algunos hidrocarburos. La sustitución isomórfica de átomos de silicio por átomos de aluminio genera un exceso de carga negativa que se neutraliza por cationes. Estos cationes ocupan posiciones poco estables y esto le confiere a la zeolita su capacidad de intercambio catiónico. La regla de Löwenstein establece que en una estructura zeolítica no pueden haber uniones Al-O-Al, es decir dos tetraedros $[\text{AlO}_4]$ vecinos. Por tanto, el valor mínimo de la relación Si/Al es 1. Una relación Si/Al baja implica un elevado número de cationes en los poros de la zeolita que originan fuertes campos electrostáticos locales e interaccionan fuertemente con los adsorbatos más polares. El intercambio iónico en las zeolitas depende de la naturaleza del catión (tipo, tamaño y carga), temperatura, concentración de especies catiónicas en disolución, el tipo de anión asociado a la disolución catiónica, del disolvente y de las características estructurales de la zeolita.

II.8.1 Zeolita clinoptilolita

Desde el punto de vista mineral, la clinoptilolita pertenece al grupo heulandita. Son cristales monoclinicos isoestructurales del grupo espacial C2/m a temperatura ambiente. Los parámetros de su celda unitaria son aproximadamente los siguientes: $a = 17.67 \text{ \AA}$, $b = 17.87 \text{ \AA}$, $c = 7.41 \text{ \AA}$, y $\beta = 116.39^\circ$. La clinoptilolita presenta tres tipos de canales limitados por el sistema de anillos tetraédricos. Los canales a y b con ventanas de anillos de 10 y 8 tetraedros respectivamente. Los canales a y b están interconectados por el canal c que está formado por sistemas de anillos de 8 miembros y que corre paralelo a [100] y [102]. Las dimensiones de los canales de una zeolita tipo HEU 9 son: en la dirección [001] para el anillos de 10 tetraedros $3.1 \times 7.5 \text{ \AA}$ (figura II.1 a) y para el anillos de 8 tetraedros $3.6 \times 4.6 \text{ \AA}$ (figura II.1 b) y en la dirección [100] para el anillos de 8 tetraedros $2.8 \times 4.7 \text{ \AA}$.

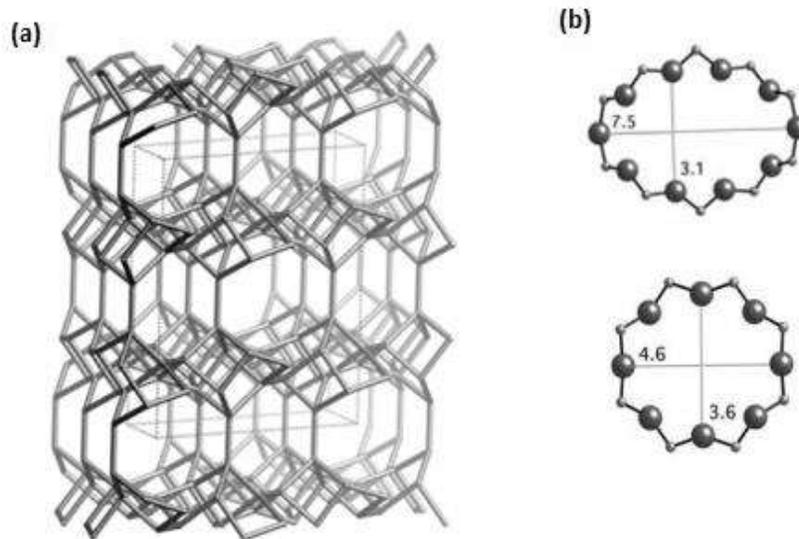


Figura II.1 (a) Estructura de la zeolita clinoptilolita, (b) anillos de 8 y 10 tetraedros que forman las ventanas de los canales.

II.9 Óxido de cerio

El óxido de cerio es un novedoso material con aplicaciones en la remediación medioambiental, purificación de agua, energías renovables y medicina, esto se debe a su peculiar capacidad de almacenar o liberar oxígeno en función de los requerimientos de oxígeno del lugar en donde se encuentra. (Eudald Casals-Victor Puntès et al 2013)

Las aplicaciones del óxido de cerio son amplias y entre ellas se encuentran su uso en producto para el pulido de cristales y lentes ópticos, en la fabricación de sensores de gases como el NO_2 y CO , como soporte catalítico o aditivo en catalizadores industriales, se utiliza comúnmente para fabricar conductores iónicos, condensadores, semiconductores y cátodos, inhibidores de corrosión en aluminio (Salazar-Banda et al 2009).

III. Metodología

III.1 Clinoptilolita protonada

Se prepara una solución de NaCl a una concentración de 5 M, se incorpora la clinoptilolita procedente de Ciudad Hidalgo Michoacán, en la solución la cual se mantiene en agitación esporádica durante 8 días, posteriormente se lava con agua desionizada hasta que no hay presencia de iones de cloro; la clinoptilolita tratada con Na⁺ se seca a 80 °C por 12 h.

III.2 Síntesis de CeO₂ por el método de hidrotérmico

Para comenzar la síntesis se disuelve el acetato de cerio (III) hidratado en 10 mL a una temperatura de 60 °C durante 2 horas, posteriormente se agrega gota a gota 10 mL de solución de hidróxido de sodio. Una vez homogeneizado se coloca en un reactor herméticamente cerrado y se deja secar en un horno a 180°C por 48 horas.

El polvo se retira del horno y se lava con agua hasta obtener un pH de 7, procedemos a secarlo a una temperatura de 120°C durante 12 horas; el polvo se macera y se coloca en un crisol para calcinarlo a 400°C durante 4 horas y finalmente el polvo se macera y tamiza.



Figura III.1.Equipo para método hidrotérmico y horno marca Felisa.

III.3 Método de impregnación húmeda incipiente

Se preparan soluciones a una concentración de 0.5 y 1 M de nitrato de plata con agitación constante a una temperatura de 70°C para los diferentes soportes utilizados. La Clinoptilolita y el óxido de cerio se colocan en baño maría a una temperatura de 70°C y se va impregnando gota a gota con las respectivas soluciones de nitrato de plata; agitar y mantener las muestras húmedas durante 2 horas. Secar los materiales Clinoptilolita-Ag y CeO₂-Ag a una temperatura de 100-120°C durante 12 hrs; macerar polvo. Calcinamos los respectivos materiales a 400°C durante 2 hrs.

III.4 Método de reducción con hidrógeno

El proceso comienza en distribuir la Clinoptilolita-Ag y el CeO₂-Ag en sus respectivas canoas de porcelana que se hacen reaccionar en un reactor a base de un flujo laminar de hidrógeno de 30 mL por minuto a las temperaturas de reducción de 500 °C y 700°C para la Clinoptilolita-Ag y el CeO₂-Ag.



Figura III.2.Equipo de reducción de polvos mediante hidrógeno marca LINDBERG/BLU

III.5 Caracterización de materiales

III.5.1 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Es una técnica que nos provee imágenes que se generan por la interacción de un haz de electrones que "barre" un área determinada sobre la superficie de la muestra, proporcionando información morfológica de la superficie de los materiales. Se utilizó el modelo JSM-7600 JEOL Noran Instruments con las siguientes condiciones a 15keV y 10^{-6} mmHg. La muestra tiene que estar seca y además debe ser conductora de corriente eléctrica. Este último requisito se cumple en los metales pero no así en otro tipo de materiales, por lo que para hacer a la muestra conductora se recubre de una capa de algún material conductor tal como el carbón, oro o platino.



Figura III.3. Microscopio electrónico de barrido MEB modelo JSM-7600 JEOL Noran Instruments.

III.5.2 Difracción de rayos X (DRX)

Con esta técnica se pretende evaluar la estructura cristalina de los compuestos sintetizados así como los cambios en el tamaño de cristal en los principales planos cristalográficos. Las caracterizaciones se realizaron en el equipo SIEMENS D5000 X-Ray diffractometer. Las condiciones de operación fueron con un tamaño de paso de 0.02θ en un intervalo de análisis de $10-80^\circ$, el voltaje de 35 KeV y una corriente de 30 mA.

III.5.3 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Los materiales se observaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOLJEM-3000F equipado con un procesador de imágenes (STEM). El voltaje de operación fue de 300kV y la resolución fue de 0.20 nm. Se midieron al menos 200 partículas para determinar el diámetro medio mediante el uso de un analizador de imágenes computarizado (Nippon Aviónica C. Ltd., EXC).

III.6 Evaluación de la actividad antibacterial

Las pruebas microbiológicas fueron realizadas en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental y de Servicios en la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

III.6.1 Preparación de caldos nutritivos

El caldo soya tripticaseína se preparó de acuerdo a las indicaciones del fabricante, se esterilizó en autoclave; se enfrió a temperatura ambiente en forma estéril bajo campana de flujo laminar horizontal (Lumistell LH-120); se agregaron 10 ml en tubos de ensaye con tapa rosca en condiciones asépticas los cuales se conservaron en un refrigerador a una temperatura de 4°C .

III.6.2 Preparación de placas con agar

El agar Müller-Hinton se preparó según las indicaciones del fabricante. Después de esterilizarse, se dejó enfriar en forma estéril bajo campana de flujo laminar horizontal (Lumistell LH-120). Se vertió el agar en cajas Petri de 100 mm de diámetro, para dar un espesor uniforme de aproximadamente 5 mm. Las placas se dejaron solidificar a temperatura ambiente evitando la acumulación de gotas de condensación en la tapa. Las placas preparadas se envolvieron en plástico, para minimizar el secado de los agares, y se almacenaron en refrigerador a 4°C.

III.6.3 Cepa bacteriana

Se utilizó la cepa *E. coli* con el número American Type Culture Collection (ATCC) 25922. Las cepas fueron proporcionadas por el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Michoacán de acuerdo a los lineamientos establecidos, la cual se hizo crecer en tubos en plano inclinado de agar soya tripticaseína a 37°C por 24 horas y se resembraron cada 12 horas durante 5 días para garantizar la fase exponencial de crecimiento. Estas cepas fueron conservadas a 4°C, con el fin de mantener la viabilidad.

III.6.4 Pruebas de pureza

Se realizó coloración de Gram para verificar pureza de la cepa de *E. coli*, observando su morfología en microscopio óptico a 100x. Se realizó el frotis correspondiente sobre la cepa a analizar con cristal violeta y una solución de yodo, todas se tiñeron de un color violáceo. Posteriormente se les trató con una solución de decolorante (alcohol-cetona), las bacterias gram positivas retuvieron el colorante, debido a la composición de su pared, mientras que las gram negativas no lo retuvieron, siendo el colorante eliminado. A continuación, se les trató con un colorante de contraste (fucsina diluida), las bacterias gram negativas se tiñeron, lo que asegura que se trata de bacterias gram negativas.

III.6.5 Turbidez estándar para la preparación del inóculo

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

III.6.6 Preparación de los inóculos

Para la preparación de los inóculos se tomaron 3 colonias aisladas del mismo tipo de morfología de las cepas mantenidas en cuñas de agar soya tripticaseína, y se hicieron crecer en tubos con 5 mL de caldo de soya tripticaseína a 37°C hasta alcanzar la turbidez estándar. Esta suspensión contiene aproximadamente 1x10⁸ Unidad Formadora de Colonias (UFC)/mL de E. coli. Los inóculos se sembraron cada 12 h por 5 días para confirmar la fase exponencial de crecimiento. Estas cepas fueron conservadas a 4 °C, con el fin de mantener la viabilidad.

III.6.7 Dilución en caldo

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

Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) se realizaron diluciones seriadas 1/10 de material en caldo MH. Se emplearon dos controles: el primero fue el control positivo (caldo MH al que se añadió la suspensión bacteriana) y el segundo fue el control negativo (caldo MH sin antimicrobiano y sin suspensión bacteriana). Los tubos inoculados con una cantidad calibrada de

los microorganismos y los materiales bactericidas se incubaron por 24 h a una temperatura de 37°C. En aquellos tubos donde la bacteria se desarrolló, se observó una turbidez (Figura III.4).

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

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

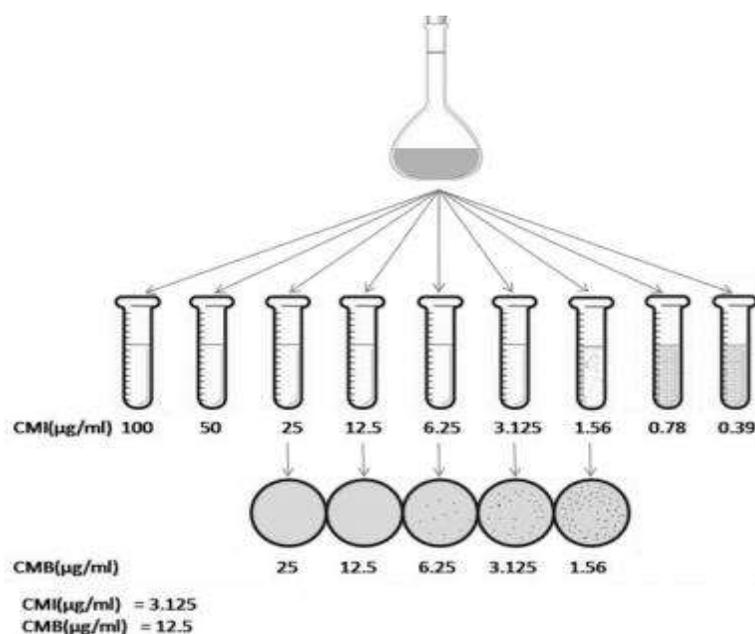


Figura III.4 Metodología para la determinación de la CMI y CMB

III.6.8 Dilución en agar

La CMB de los materiales se determinó a través de la técnica de difusión en agar (método de Kirby-Bauer). Para ello, se inoculó una cantidad estandarizada de bacterias de *E. coli* sobre la superficie de una placa de agar Müller-Hinton. Se pusieron en contacto con discos de papel filtro impregnados con diferentes cantidades conocidas del material bactericida a evaluar.

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

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

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

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

III.6.9 Crecimiento bacteriano en presencia de los materiales

Se determinó el crecimiento de la bacteria en presencia de los materiales biocida. Para ello, se valoró la capacidad bactericida de los materiales en relación con el tiempo y la CMB promedio. Se enfrentó un inóculo normalizado a concentraciones fijas de antimicrobiano en un caldo. Se inoculó 0.5 mL de muestra de los sistemas líquidos con bacterias (*E. coli*), en 5 mL de caldo de soya tripticaseína contenido en tubos de ensaye con tapa rosca. Se agregó una cantidad de material biocida (cantidad determinada como CMB promedio) a cada tubo incubándose a 37°C con agitación a 30 rpm. Se tomaron muestras a diferentes tiempos (0, 5, 15, 30, 60, 90, 120 min). La muestra tomada se sembró

en cajas Petri con 20 mL de agar Muller-Hinton por la técnica de estriado en placa. Como control, una placa se inoculó con cultivo sin material bactericida, al comienzo y al final. Las placas se incubaron invertidas a 37°C por 24 h en atmósfera aeróbica y se realizó el conteo de colonias.

IV. Resultados y discusiones

IV.1 Caracterización por difracción de rayos X

La figura IV.1 muestra los patrones de Difracción de Rayos X (DRX) de cuatro muestras de ClinoAg-X-Y, donde X representa las temperaturas de reducción (500 o 700°C); Y el porcentaje de plata (2.1 o 4%). En los difractogramas se exhiben los picos asociados a la clinoptilolita y se observa los planos característicos del platino etiquetado como Pt, debido al porta muestras. Las muestras con plata presentan picos estrechos bien definidos atribuibles a plata metálica, etiquetados con Ag.

En las muestras que presentan una cantidad mayor de plata se observa picos más intensos de Ag en el DRX. Dentro de los límites de la técnica de DRX no se observaron diferencias significativas entre las muestras con el mismo contenido de plata reducido a una temperatura diferente. Estos resultados indican claramente que la estructura de la zeolita se conservó después de la deposición de la plata. A bajas concentraciones, la plata metálica estuvo bien dispersada en la zeolita. Con el aumento de la cantidad de plata, las partículas pequeñas se aglomeran para formar otras más grandes, que se localizan principalmente en la superficie externa de la zeolita.

En la siguiente figura IV.2 se muestra el patrón de difracción de rayos X (DRX) de la muestra de CeO₂-Ag a 500°C con 4% en peso de plata, en el cual se verificó con los patrones, que efectivamente se encuentran picos asociados a nanopartículas de plata metálica y cerio.

Los resultados nos indican que la estructura del soporte CeO₂ se conservó después de la deposición de plata.

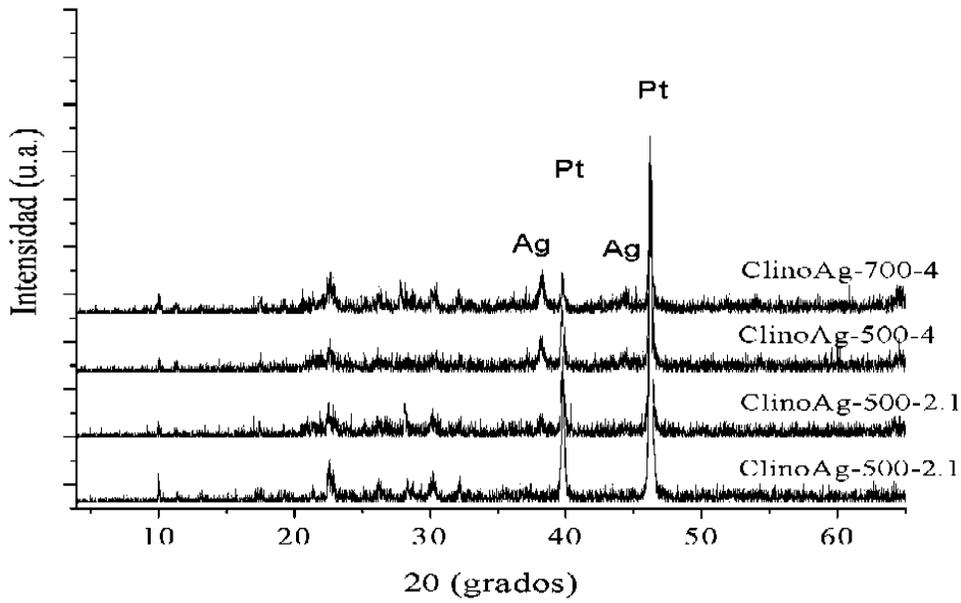


Figura IV.1 Patrón de DRX de ClinoAg-X-Y.

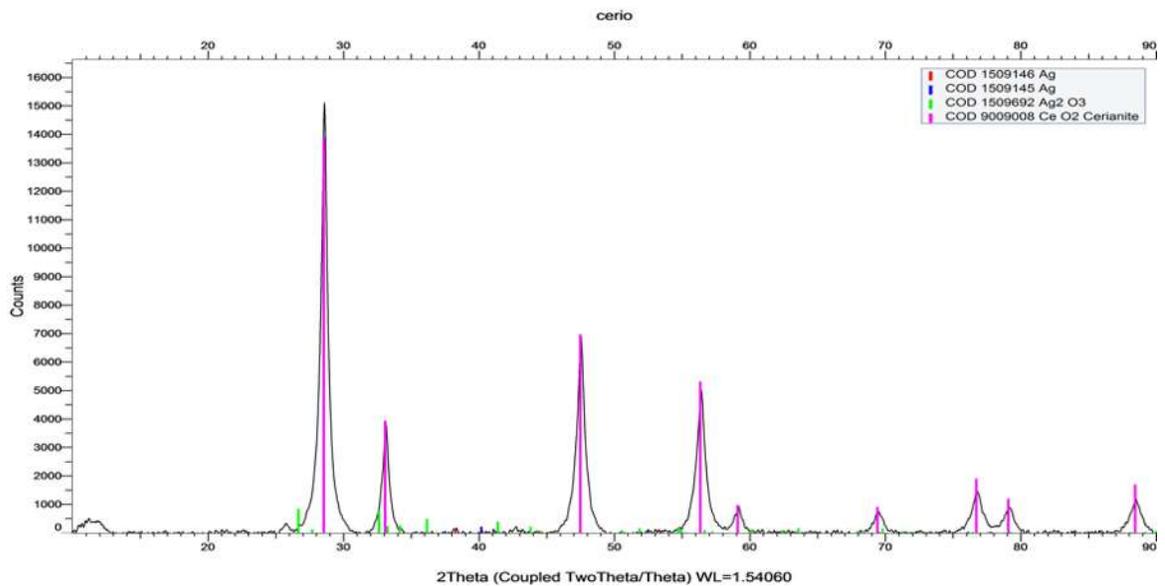


Figura IV.2 Patrón de DRX de CeO₂-Ag a 500°C con 4% de Ag.

IV.2 Caracterización por microscopía electrónica de transmisión

La distribución de tamaño de partículas se calculó por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET). En la figura se muestran los histogramas de las muestras de Clinoptilolita preparadas a diferentes cantidades de Ag y temperaturas de reducción.

En la clinoptilolita reducida a una temperatura de 500°C con 2.1% de Ag se observa una distribución multimodal con partículas cuyo diámetro oscila entre 3 hasta 15 nm, en donde la mayor parte de las partículas de plata tienen un diámetro de 12.5 nm. En las muestras reducidas a 500 °C el diámetro de partícula predominante aumenta de 12.5 a 15 nm aumentando el contenido de plata de 2.1 a 4%, por lo tanto al aumentar la concentración de Ag se genera partículas más grandes.

A la temperatura de reducción de 700°C se observaron partículas de 3 hasta 20 nm, predominando partículas de 7.5, 10 y 15 nm de diámetro. Para las muestras reducidas a 500°C y 700°C el diámetro de partículas aumenta de 15 a 17.5 nm respectivamente, lo cual nos indica que un aumento en la temperatura de reducción incrementa el tamaño de las partículas incluso en la muestra ClinoAg-700-4.0 la alta temperatura de reducción y el alto contenido de plata combinados, provocan una distribución más heterogénea de las partículas grandes que se forman.

De acuerdo a los histogramas obtenidos en la figura IV.3 se observa que el tamaño de partícula depende el contenido de Ag y la temperatura de reducción.

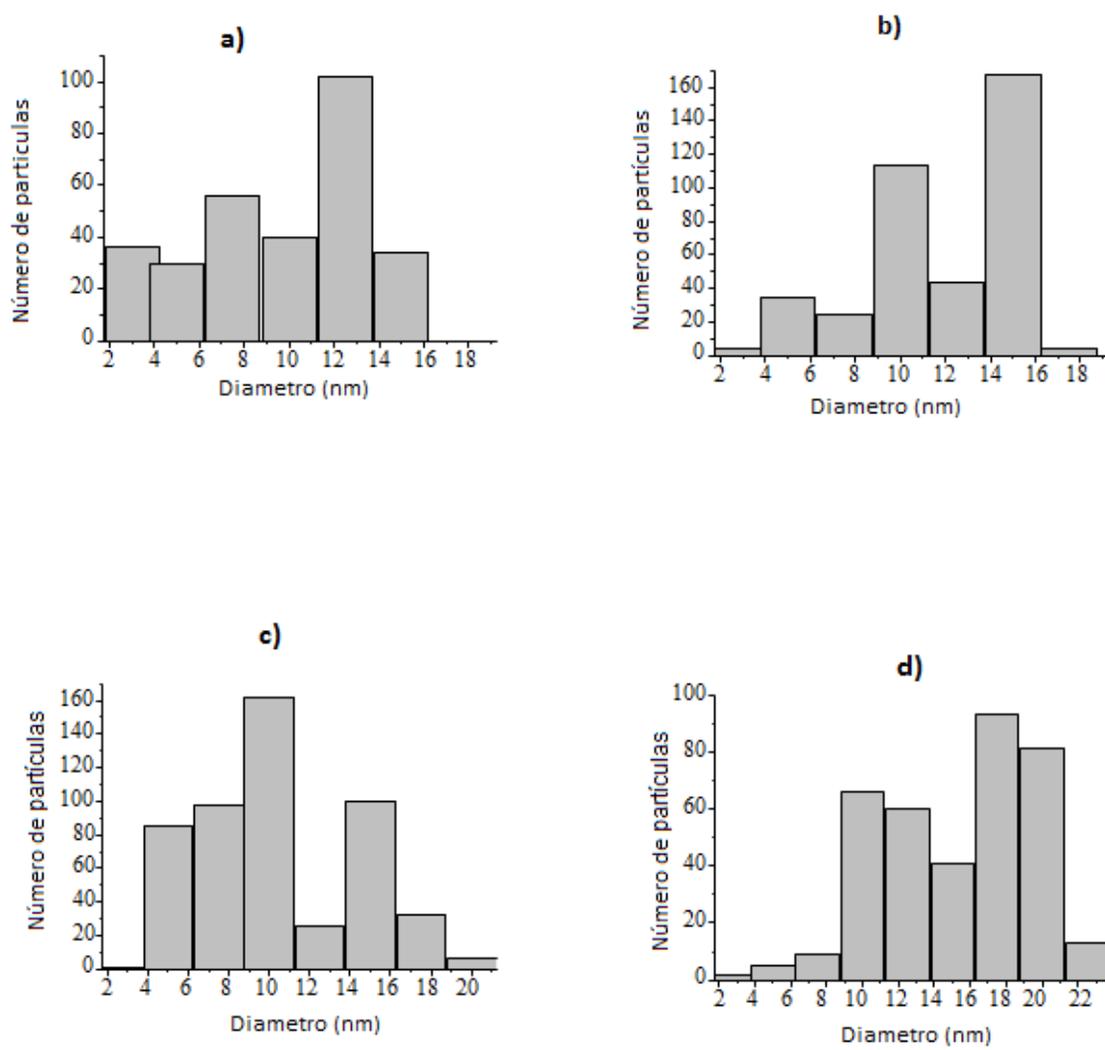
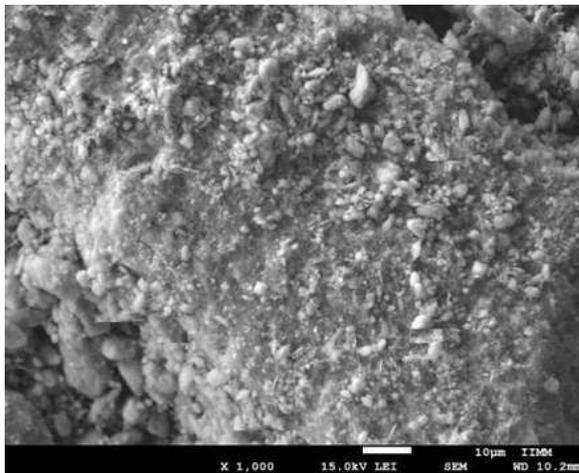


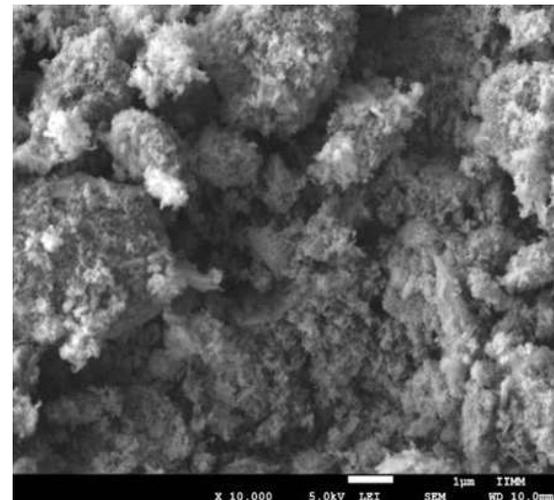
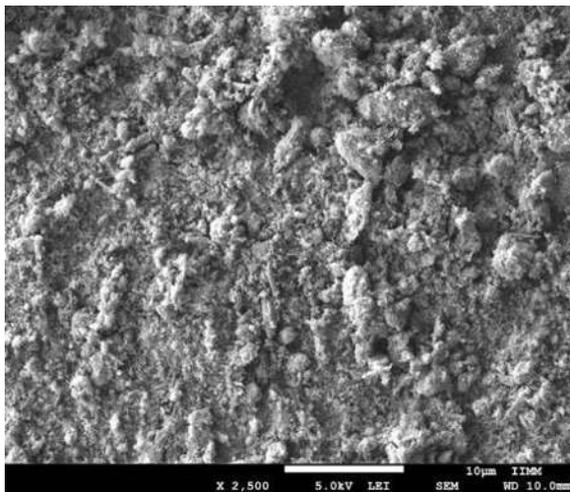
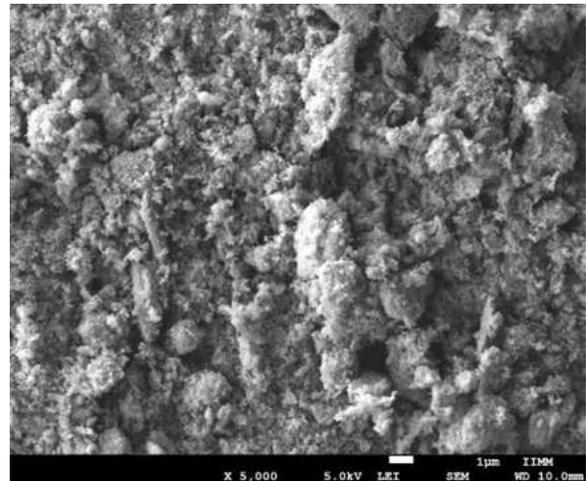
Figura IV.3 Histogramas de distribución de tamaño de partícula de clinoAg-X-Y: a) clinoAg-500-2.1 b) clinoAg-500-4 c) ClinoAg-700-2.1 d) clinoAg-700-4.

Las siguientes Microfotografías mostradas en la figura IV.4 se obtuvieron por medio del microscopio electrónico de barrido (MEB) que corresponde al CeO₂-Ag al 4% reducido con hidrógeno a una temperatura de 500°C, se pueden observar tamaños de grano que oscilan entre 10.0 y 10.2 micras.

(a)



(b)



(c)

(d)

Figura IV.4 (a), (b), (c) y (d) Microfotografías de CeO₂-Ag reducido a una temperatura de 500 °C con 4% de Ag, aumento de 1000x; 2500x; 5000x; y 10000x respectivamente.

IV.3 CMIs y CMBs de los materiales.

En la tabla IV.1, se muestran los valores de las CMIs y CMBs de los materiales como inhibidores de la *E. coli*, utilizando el método de diluciones y siembra en agar. La reproducibilidad se hizo por triplicado para cada cepa bacteriana. Los valores reportados son el promedio de las CMIs y CMBs para cada prueba, en caldo y agar MH respectivamente. La turbidez en los tubos inoculados, permitió determinar la CMI después de las 24 horas de exposición de las bacterias frente a los diferentes materiales. La cuantificación de colonias bacterianas que crecieron en placas con agar MH, se realizó después de 18 y 24 horas de incubación a 37°C.

Para el análisis del efecto de los materiales sobre cada cepa, los materiales se dividieron en cuatro grupos de acuerdo a la concentración de plata y temperatura de reducción con hidrógeno.

Tabla IV.1. CMIs de las NPAg y los materiales ClinoAg-X-Y y CeO₂Ag-X-Y para eliminar *E. coli*.

Cepa/ Material biocida	Control 1	2.2 mg/mL	3.3 mg/mL	4.4 mg/mL	5.5 mg/mL	6.6 mg/mL	7.7 mg/mL	Control 2
ClinoAg-700-2.1	+	+	+	+	-	-	-	+
ClinoAg-700-4.0	+	+	-	-	-	-	-	+
ClinoAg-500-2.1	+	+	+	+	-	-	-	+
ClinoAg-500-4.0	+	+	-	-	-	-	-	+
CeO ₂ Ag-500-2.1	+	+	-	-	-	-	-	+
CeO ₂ Ag-500-4	+	+	+	-	-	-	-	+

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

Se observó que todos los materiales ClinoAg-X-Y y CeO₂Ag-X-Y, tienen un efecto bactericida sobre la *E. coli* a concentraciones de 3.3 a 5.5 mg/mL en las 12 primeras horas de exposición, evidenciado por la eliminación del inóculo.

Con el fin de comprobar que las CMI's promedio de las NPAg y los materiales como inhibidores para *E. coli* son las adecuadas, se realizó un análisis de CMB en función del tiempo de exposición, efectuando los correspondientes conteos de colonias. Los conteos se realizaron por 120 minutos ya que a este tiempo las CMBs de los materiales fueron bactericidas eliminando más del 50% del inóculo inicial.

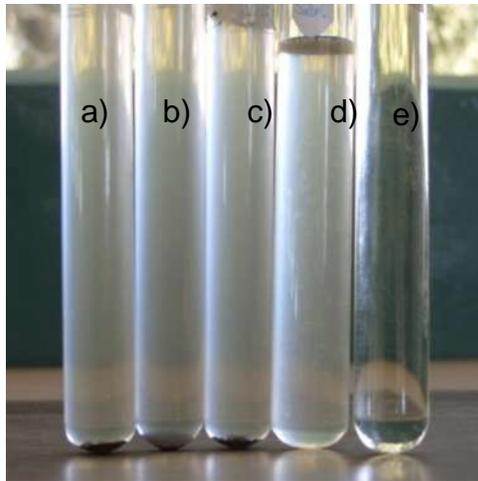


Figura IV.4. Antibiograma en medio líquido de *E. coli* frente a ClinoAg-700-4 a CMI's de: **a)** 2.2 mg/mL **b)** 3.3 mg/mL **c)** 4.4 mg/mL **d)** 5.5 mg/mL **y e)** 6.6 mg/mL

Las muestras expuestas al Ag que no presentaron turbidez fueron sembradas en cajas Petri con agar Müller-Hinton (Figura IV.4), observándose que el crecimiento de las bacterias fue nulo. Cabe señalar que se consideraron sistemas en donde no hubo crecimiento, aquellos tubos traslúcidos cuya turbidez era muy baja (menos de 50 NTU) o cercana a cero. Aquellos tubos con turbidez aparente y valores mayores a 50 NTU se consideraron sistemas con crecimiento microbiano.

Con este método descriptivo de ensayo turbidimétrico se pueden obtener algunas respuestas sobre el comportamiento de las bacterias, en presencia de los

agentes bactericidas, tales como supresión en el nivel de crecimiento en la fase estacionaria, disminución de la velocidad de crecimiento y la letalidad (Davidson and Parish, 1989).

Las CMI y CMBs obtenidas por los dos métodos ensayados (macrodilución en líquido y microdilución en agar) no presentaron diferencias significativas. La eficacia, reflejo un radio CMB/CMI menor a 1.2, indicando que los materiales son bactericidas.

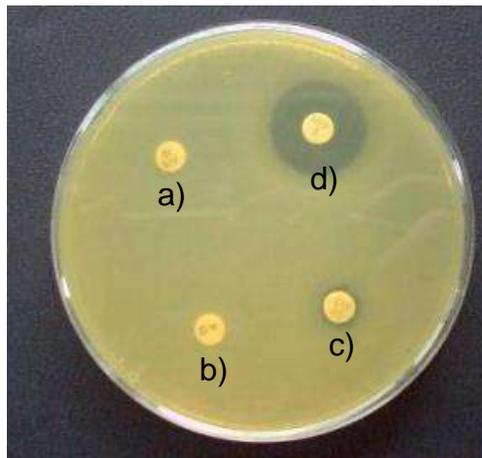


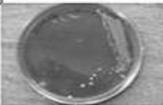
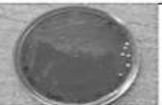
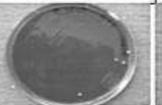
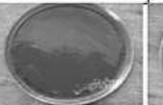
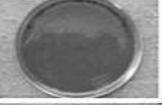
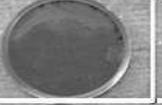
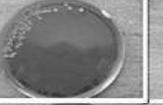
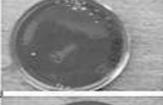
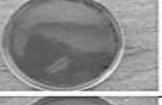
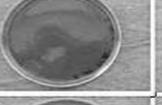
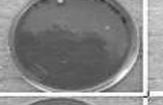
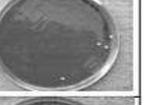
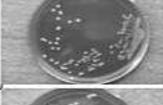
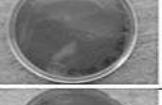
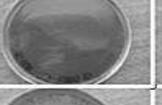
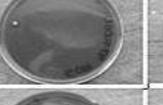
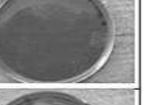
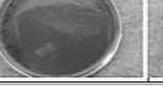
Figura IV.5 Antibiograma en medio sólido de *E. coli* frente a ClinoAg- 500-2.1, CMBs de: a) 2.2 mg/mL, b) 3.3 mg/mL, c) 4.4 mg/mL y d) 5.5 mg/mL

Debido a que la técnica turbidimétrica depende del tamaño de las células bacterianas, así como de la presencia de células dañadas (Skandamis P. *et al.*, 2001), se realizaron pruebas microbiológicas para obtener curvas de crecimiento de los microorganismos en estudio (*E. coli*) en presencia de los materiales como agentes antimicrobianos, debido a que algunos materiales tienden a quedar suspendidos en soluciones acuosas y por tanto afectan las mediciones de turbidez.

IV.5 Pruebas microbiológicas para evaluar tiempos de inhibición

Previo a la evaluación del efecto bactericida de los materiales se realizaron los correspondientes controles de calidad (viabilidad y pureza) de *E. coli* por medio de microdiluciones. Los resultados arrojados en viabilidad son de 1×10^8 los cuales satisfacen con los criterios de aceptación, de modo que los resultados de pureza cumplen con la condición de cultivos libres de contaminación microbiana. La valoración del efecto bactericida de los materiales se realizó al medir la viabilidad celular a los 0, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos después de la exposición e incubación de las bacterias *Escherichia coli* con los distintos materiales. Las pruebas se realizaron por triplicado en placas con agar Müller-Hinton. En la tabla IV.2 se muestran las pruebas microbiológicas efectuadas para determinar el efecto bactericida en estudio. Se realizaron pruebas adicionales de clinoptilolita con sodio y del óxido de cerio sin plata, se observa en ambos casos que el número de colonias aumenta rápidamente con el tiempo lo que nos indica que el soporte no es bactericida, lo cual tomamos como referencia del crecimiento de la *E. coli*.

Tabla IV.2. Crecimiento de colonias de *E. Coli* expuestas a 4.4 mg/ml de material ClinoAg-X-Y.

Tiempo / Muestra	ClinoNa	ClinoAg-500-4.0	ClinoAg-700-4.0	ClinoAg-700-2.1	ClinoAg-500-2.1
5 min					
30 min					
60 min					
90 min					
120 min					

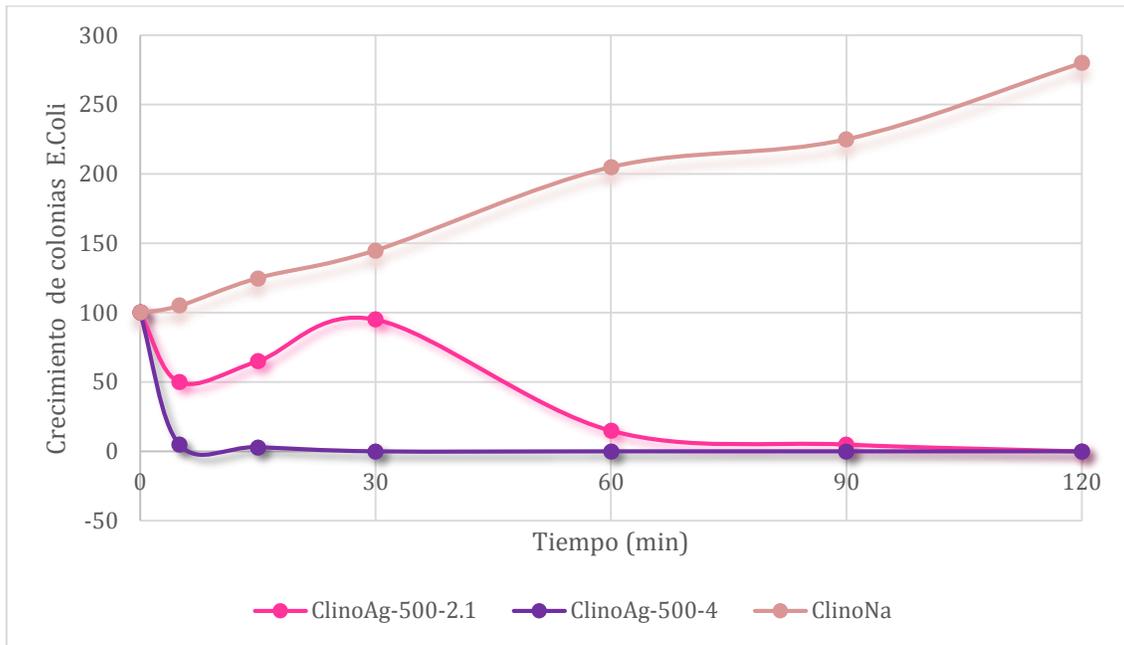
En las gráficas IV.1 y IV.2 se muestra que los materiales con 4% en peso de Ag a una CMI de 4.4 mg/mL, independientemente de la temperatura de reducción, se eliminó la *E. Coli* a un tiempo de 30 min. Por el contrario las muestras con menor cantidad de plata al 2.1 %, existe colonias de bacterias durante los primeros 30 min, a partir de los 60 min hay una disminución en el número de colonias y a los 120 min fueron eliminadas por completo. En un material con un alto contenido de Ag, las bacterias entran rápidamente en contacto con las grandes y densas partículas de plata, dispersas en la superficie externa de la clinoptilolita.

Las muestras con un contenido de 2.1% de plata en la clinoptilolita, las bacterias se dispersan en la clinoptilolita mejorando su desarrollo, pero con el tiempo las bacterias se ponen en contacto con los sitios de plata situada en la entrada de los canales de la zeolita y algunos otros en la superficie externa. Por lo tanto parece ser que la distribución de la plata en la superficie del material es un parámetro crucial para obtener materiales eficientes como inhibidores bacterianos.

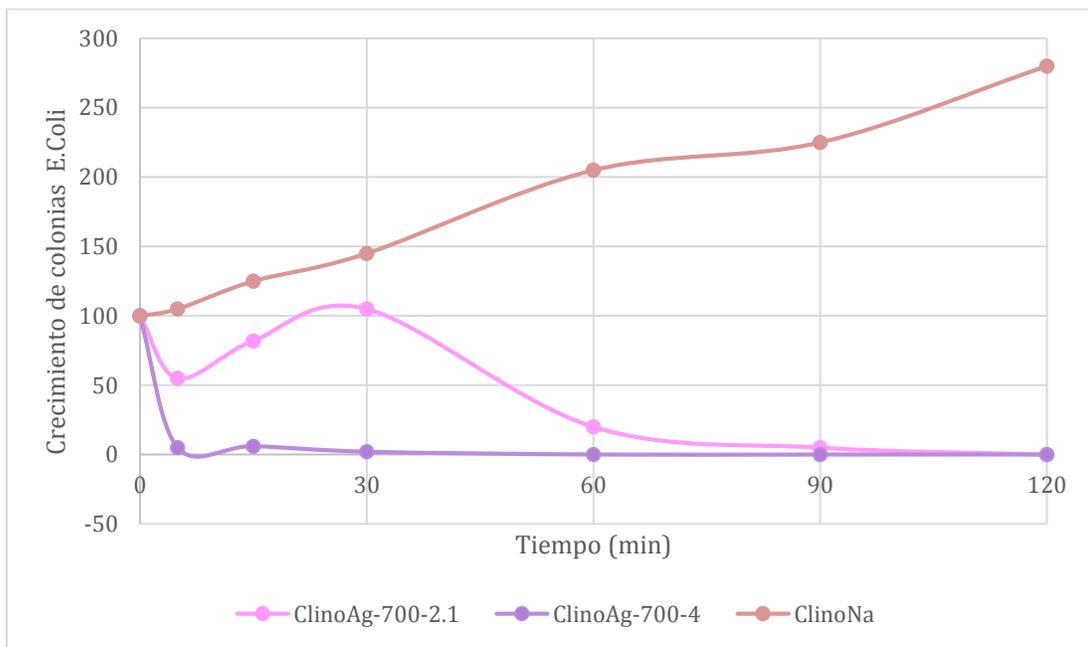
Las temperaturas de reducción no representaron cambios representativos en el efecto bactericida de nuestros materiales, pero si el porcentaje en peso de plata; por lo tanto se considera que el material más eficiente de acuerdo al periodo más corto de eliminación de la bacteria fue la clinoptilolita con plata al 4% a una temperatura de reducción de 500 °C.

Tabla IV.3. Número de colonias E.Coli frente a los materiales evaluados como biocidas.

Tiempo (min)	ClinoNa	ClinoAg-500-2.1	ClinoAg-500-4	ClinoAg-700-2.1	ClinoAg-700-4	ClinoAg-500-4	CeO2-Ag-500-4
0	100	100	100	100	100	100	250
5	105	50	5	55	5	5	220
15	125	65	3	82	6	3	180
30	145	95	0	105	2	0	58
60	205	15	0	20	0	0	0
90	225	5	0	5	0	0	0
120	280	0	0	0	0	0	0



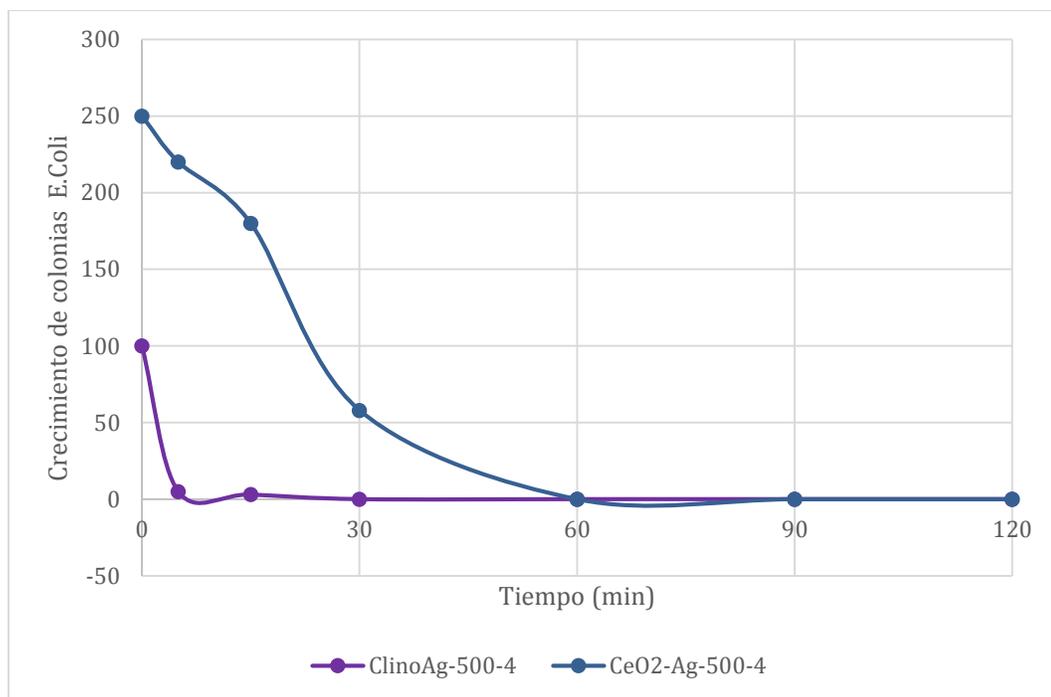
Gráfica IV.1. Efecto inhibitorio de clinoAg-500-2.1, ClinoAg-500-4 y clinoNa a CMI de 4.4 mg/mL sobre el crecimiento de E. Coli.



Gráfica IV.2. Efecto inhibitorio de clinoAg-700-2.1, ClinoAg-700-4 y clinoNa a CMI de 4.4 mg/mL sobre el crecimiento de E. Coli.

En el proceso se descartó el óxido de cerio con plata a la concentración de 2% debido a que gran parte de la plata no se depositó sobre la superficie por lo tanto se realizó a 4% a la temperatura de reducción de 500 °C.

En la gráfica IV.3 se realiza el comparativo entre la clinoptilolita-Ag y el óxido de cerio-Ag a las mismas condiciones se puede observar en la gráfica que en ambos materiales hay una completa eliminación de la bacteria solo que se efectúa a diferentes tiempos, en la clinoptilolita ocurre a los 30 min.



Gráfica IV.3. Efecto inhibitorio de ClinoAg-500-4 y CeO₂-Ag-500-4 a CMI de 4.4 mg/ml sobre el crecimiento de E. Coli.

Conclusiones

- Con la caracterización realizada por la técnica de microscopía electrónica de transmisión (MET) para las muestras clinoptilolita-Ag, se observó que el tamaño de las nanopartículas varía de acuerdo al contenido de plata y la temperatura de reducción.
- Los soportes clinoptilolita y óxido de cerio no presentan efecto bactericida ya que al estar en contacto con la bacteria *E. Coli* hay una tendencia de crecimiento exponencial. La deposición de la plata metálica en ambos soportes proveen materiales bactericidas.
- En las pruebas microbiológicas realizadas se analizó la clinoptilolita-Ag y CeO₂-Ag en donde el tiempo de eliminación de la E. Coli fue de 30 min y 60 min respectivamente; por lo tanto la plata soportada en la clinoptilolita es el mejor biocida, posiblemente se deba a que hay una mayor área de contacto debido a la gran cantidad de cavidades y microporos.
- Los soportes con mayor área resultan ser mejor para dispersar la fase activa metálica.

Recomendaciones

- Se recomienda que se realice un estudio de la modelación biológica de la bacteria Vs. Material, para determinar el rompimiento de la membrana por efecto de la plata.
- Realizar un estudio para el diseño de un cartucho (filtro) donde se pueda contener el material preparado para eliminar las bacterias para uso doméstico.

Bibliografía

- Bekkum H., Flanigen E., *Studies in Surface Science and Catalysis*; Elsevier Science B., 1991, 58-59.
- Belliveau B., Starodub M., Cotter C., Trevors, J., Metal resistance and accumulation in bacteria. Department of Environmental Biology, University of Guelph. 1987, 5, 27-101.
- Cervantes C., Bacterias que expulsan metales pesados. *Información Científica y Tecnológica*, 1992, 14,13-17.
- Cervantes C., Minerales que expulsan metales pesados. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. *SPECTRA*, 1992.
- Cervantes C., Vargas E., Álvarez A., Sistemas bacterianos de expulsión de metales tóxicos, *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 1998, 40-53.
- Chmielewska D., Łukasiewicz A., Waliś L., Water soluble silica biocides containing quaternary ammonium salts. In: *INCT Annual Report*, 2006, 141-153.
- Cho K., Park J., Osaka T., Park S., The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. *Electrochimica Acta*, 2005, 51, 956-960.
- Cooper R., A review of the evidence for the use of topical antimicrobial agents in wound care, *World Wide Wounds*, 2004.
- Damm C., Münstedt H., Rösch A., The antimicrobial efficacy of polyamide 6/silver-nano and microcomposites. *Materials Chemistry and Physics*, 2008,108, 61-66.
- Demling R., De Santi L. Wounds. Scar management strategies in wound care. *Rehabilitation Management*, 2001, 14, 26-30.
- Dibrov P., Dzioba J., Khoosheh K., Gosink, Häse C., Chemiosmotic Mechanism of Antimicrobial Activity of Ag⁺ in *Vibrio cholerae*. *Antimicrobial*

Agents and Chemoteraphy, American Society for Microbiology, 2002, 46, 2268-2670.

- Esteban A., Evidence-based management of patients with respiratory failure, update in intensive care medicine, Jean-Louis Vincent Edition, 2005, 81-162.
- Feng Q., Wu J., Chen G., Cui F., Kim T., and Kim J., A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, *Journal of Biomedical Materials Research*, 2000, 52, 662-668.
- Goodman A., Gilman S., *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Editorial Panamericana, 6ta. Edición. 1982, 57-68.
- Hugo W., Russell A., *Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilisation*. 3rd Ed., Blackwell Scientific Publications, 1995, 5-94.
- Kawahara K., Tsuruda K., Morishita M., Uchida M., Antibacterial effect of silver-zeolite on oral bacteria under anaerobic conditions. *Dental Materials*, 2000, 16, 452-455.
- Kesraoui-Ouki S., Cheeseman C., Perry R., Natural zeolite utilization in pollution control: a review of applications to metals' effluents. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 1994, 59, 121-126.
- Maillard J., Bacterial target sites for biocide action. *Journal of applied Microbiology Symposium Supplement*, 2002, 92, 16-27.
- McDonell G., Russell A., Antiseptics and disinfectants. *Clinical Microbiology Reviews*, 1999, 12, 147-179.
- Murray R., *Bioquímica de Harper*. México, Editorial El Manual Moderno, 2010, 69-98.
- Muñoz R., Collazo P., Alvarado F., Efecto bactericida de la cal hidratada en solución acuosa. *Oficina Sanitaria Panamá*, 1995, 118, 302-305.
- Nataro J., Enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. *Current Opinion in Gastroenterology*, 2005, 21, 4-8.

- Nataro J., Kaper J., Diarrheagenic *Escherichia coli.*, *Clinical Microbiology Reviews.*, 1998, 11, 142-201.
- Nataro J., Mai V., Johnson J., Diarrheagenic *Escherichia coli* infection in Baltimore, Maryland, and New Haven, Connecticut. *Clinical Infectious Diseases*, 2006, 43, 402–407.
- NMX-AA-42-SCFI-1987. Calidad del agua determinación del número más probable (NMP) de coliformes totales, coliformes fecales (termotolerantes) y *Escherichia coli* presuntiva. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial, Dirección General de Normas. 2000.
- Panáček A., Kvítek L., Pruček R., Kolár M., Vecerová R., Pizúrová N. et al., Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *Journal of Physical Chemistry B*, 2006, 110, 16248-16253.
- Rai M., Yadav A., Gade A., Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials, *Biotechnology Advances*, 2009, 27, 76-83.
- Guerra, R., Lima, E., Viniegra, M., Guzmán, A., & Lara, V. (2012). Growth of *Escherichia coli* and *Salmonella typhi* inhibited by fractal silver nanoparticles supported on zeolites. *Microporous and Mesoporous Materials*, 147(1), 267-273.
- Russell A., Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2003, 52, 750-763.
- Sadler P., *Lectures in Bioinorganic Chemistry*, Cortina International, 1991, 1-24.
- Salazar-Banda, G.R., Moraes, S.R., Motheo., A.J & Machado, S.A (2009), Anticorrosive cerium-based coating prepared by the so-gel method. *Journal of sol gel science and technology*, 52(3) 415-423.
- Shahverdi A., Fakhimi A., Shahverdi H., Minaian S., Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, *Nanomedicine*, 2007, 3,168-171.

- Silver S., Bacterial interactions with mineral cations and anions: good ions and bad, Eds. P. Westbroek & W. Jong, 1983, 439-457.
- Silver S., Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds, FEMS Microbiology, 2003, 27, 341-354.
- Silver S., Misra T., Laddaga R. , ADN sequence analysis of bacterial toxic heavy metal resistances, Biological Trace Element Research, Humana Press Inc., 1989, 21, 145-163.
- Sondi I., Salopek-Sondi B., Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for gram-negative bacteria. Journal of Colloid and Interface Science, 2004, 275, 177-182.
- Stobie N., Duffy B., McCormack D., Colreavy J., Hidalgo M., McHale P. et al., Prevention of Staphylococcus epidermidis biofilm formation using a low-temperature processed silver-doped phenyltriethoxysilane sol-gel coating. Biomaterials, 2008, 29, 963-972.
- Torres M., Tratado de cuidados críticos y emergencias, Tomo II, Ediciones ARAN, 2002, 1343-1576.
- Thurman R., Gerba C., The molecular mechanisms of copper and silver ion disinfection of bacteria and viruses, Critical Reviews of environmental control, 1989 18, 295-315.
- Tortora G., Berdell R. Funke, Christine L. Case, Introducción a la microbiología, 9a edición, Ed. Médica Panamericana, 2007, 69-89.
- Yan J., Cheng J., Antimicrobial yarn having nanosilver particles and methods for manufacturing the same. 2005, US 6979491.
- Yin H., Langford R., Burrell R., Comparative evaluation of the antimicrobial activity of Acticoat antimicrobial barrier dressing, Journal of Burn Care Rehabilitation, 1999, 20, 195-2.