



**Universidad Michoacana de  
San Nicolás de Hidalgo**



**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**

**TESIS**

**SÍNTESIS, FUNCIONALIZACIÓN Y APLICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE Ag  
SOPORTADAS EN  $\text{TiO}_2$  COMO INHIBIDORES BACTERIANOS.**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIATURA EN INGENIERÍA QUÍMICA**

**PRESENTA:  
CHRISTIAN JESUS ALCANTAR ESTRADA**

**ASESOR:  
D.C. ROBERTO GUERRA GONZÁLEZ**

**MORELIA, MICHOACÁN. ABRIL 2018**



# FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

## PROGRAMA ACREDITADO



No. Oficio 356/2017/2018  
Morelia, Michoacán, a 13 de marzo 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:

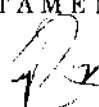
Atendiendo a las indicaciones se hizo la revisión de manuscrito de Tesis presentado por el pasante de Ingeniero Químico: CHRISTIAN JESÚS ALCANTAR ESTRADA con matrícula 12233136C.

Creemos que es de aceptarse dicho manuscrito con las modificaciones sugeridas verbalmente al interesado: ENTERADOS:

DR. GUERRA GONZÁLEZ ROBERTO	97003158
M.C. BEJAR UBALDO MA. AIDA	79002765
M.C. GARCÍA SALINAS MARÍA DE LA SALUD LAURA	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

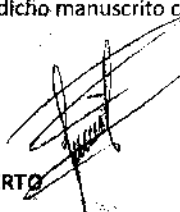



Morelia, Michoacán a 13 de marzo de 2018.

**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 el P.I.Q. **CHRISTIAN JESÚS ALCANTAR ESTRADA CON MATRÍCULA 12233136C**

Creemos que es de aceptarse dicho manuscrito con las modificaciones sugeridas verbalmente al interesado.

  
**DR. GUERRA GONZÁLEZ ROBERTO**  
PRESIDENTE 97003158

  
**M.C. BEJAR UBALDO MA. AIDA**  
VOCAL 79002765

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



Edificio "M" Planta Baja  
Ciudad Universitaria

Tel/Fax 3-16-71-76  
3-22-35-00 Ext. 3003



## DEDICATORIA

A Norma mi mamá por sacarme siempre adelante sin un padre, haberme apoyado emocional y económicamente todo el tiempo y estar siempre ahí cuando lo necesitaba, gracias Abuela.

A Daniela mi esposa por ser la persona que me impulsó a seguir siempre adelante con la carrera a pesar de mis frustraciones y desesperos, pues siempre fue ella quien confió en mí incluso cuando yo no confiaba en mí, gracias Chitu.

A Salvador mi hermano por darme consejos que me han servido en mi formación y vida, y a su familia por creer siempre en mí, gracias wey, vane, janhi y xeny.

A mi toda familia tíos, primos, abuelos por haberme apoyado los cinco años de la carrera universitaria pues siempre fue muy útil cualquier apoyo que me brindaron.

A mis amigos de la facultad por que nos formamos juntos en esta escuela, estudiando, conviviendo y frustrándonos.

A mis hermanos AJEF por apoyarme y hacerme ser mejor persona.

A la Honorable casa del estudiante Nicolaíta por haberme albergado por tres años durante mi periodo universitario.

Y a todos aquellos que en algún momento me brindaron su apoyo, a todos ustedes gracias.

## RESUMEN

Se sintetizaron partículas de Dióxido de Titanio ( $TiO_2$ ) las cuales se emplearon como soportes de nanopartículas de plata para la inhibición de bacterias de *Escherichia coli*. La síntesis del  $TiO_2$  se realizó por las técnicas sol-gel por microondas y síntesis hidrotérmica. Las nanopartículas de plata fueron soportadas en las superficies del Dióxido de Titanio por la técnica de impregnación. Para conocer las propiedades texturales de los materiales ( $Ag/TiO_2$ ), estos fueron caracterizados por Difracción de Rayos X (DRX) y Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). Los materiales ( $Ag/TiO_2$ ), se irradiaron con luz UV por una hora para activar los metales y compararlos con los no expuestos, posteriormente fueron expuestos frente a la bacteria *Escherichia coli* para valorar su efecto como bactericida. La *E. coli*, fue inhibida el 100% en 90 minutos con el material irradiado con el luz UV en cambio con el material sin radiación se eliminó un 100% en 240 minutos, demostrando la efectividad del  $Ag/TiO_2$  para eliminar la bacteria y la radiación del espectro UV para acelerar el poder de inhibición del material.

**Palabras clave:** Síntesis, Soporte, Radiación, Activar, Nanopartículas de plata

## ABSTRACT

Titanium Dioxide ( $TiO_2$ ) particles were synthesized which were used as supports for silver nanoparticles for the inhibition of *Escherichia coli* bacteria. The synthesis of  $TiO_2$  was carried out by microwave sol-gel techniques and hydrothermal synthesis. The silver nanoparticles were supported on the surfaces of Titanium Dioxide by the impregnation technique. To know the textural properties of the materials ( $Ag / TiO_2$ ), these were characterized by X-ray diffraction (XRD) and scanning electron microscopy (SEM). The materials ( $Ag / TiO_2$ ), were irradiated with UV light for one hour to activate the metals and compared with those not exposed, later they were exposed to the bacterium *Escherichia coli* to assess its effect as a bactericide. *E. coli*, was 100% inhibited in 90 minutes with the material irradiated with UV light instead with the material without radiation was eliminated 100% in 240 minutes, demonstrating the effectiveness of  $Ag / TiO_2$  to eliminate the bacteria and the UV spectrum radiation to accelerate the inhibitory power of the material.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>6</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>8</b>
2.1. Nanopartículas	9
2.2. Plata	10
2.2.2 Nanopartículas de plata y su acción bactericida	12
2.2.3. Efectos sobre la salud y medio ambiente de las nanopartículas de plata	14
2.3 Dióxido de titanio	16
2.3.1 Síntesis sol-gel	17
2.3.2 Síntesis Hidrotérmica	18
2.3.3. Microondas	19
2.4. Bacteria Escherichia coli	24
2.5 Técnicas para la evaluación de inhibición bacteriana	27
2.5.1 Técnica de Disolución en Agar	27
2.5.2 Técnica de disolución en caldo	28
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>29</b>
<b>4. OBJETIVOS E HIPOTESIS</b>	<b>30</b>
4.1 Objetivo General	30
4.2 Objetivos Particulares	30
4.3 Hipótesis	30
<b>5. DESARROLLO EXPERIMENTAL</b>	<b>31</b>
5.1. Síntesis de Materiales	31
5.1.1. Síntesis Sol-Gel asistida por Microondas	31
5.1.2. Síntesis Hidrotérmica de TiO <sub>2</sub>	33
5.1.3. Impregnación de nanopartículas de plata en TiO <sub>2</sub>	35
5.2. Caracterización de los Materiales	37
5.2.1. Microscopía Electrónica de Barrido	37
5.2.2 Difracción de Rayos X	38
5.3. Preparación de Material Antibacterial	39
5.3.1. Preparación de caldos nutritivos	40
5.3.2. Preparación de Placas con Agar	40
5.3.3. Preparación de cepa bacteriana	40
5.3.4 Pruebas de pureza	41
5.3.5. Preparación de los inóculos	41
5.4. Disoluciones	41
5.4.1. Disolución en caldo	42
5.4.2. Disolución en Agar	43
5.5. Crecimiento de bacterias en presencia de los materiales	44
<b>6. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	<b>45</b>

<b>6.1. Caracterizaciones</b>	<b>45</b>
6.1.1. Microscopía electrónica de barrido	46
6.1.1.1. Nanopartículas de plata soportadas sobre TiO <sub>2</sub> .	46
6.1.1.2 Nanopartículas recuperadas de plata soportadas sobre TiO <sub>2</sub>	47
6.1.1.3 Nanopartículas recuperadas de plata soportadas sobre TiO <sub>2</sub> irradiado con rayos UV.	48
6.1.1.3.1. Mapeo de nanopartículas recuperadas de plata soportadas sobre TiO <sub>2</sub> irradiado con rayos UV.	49
6.1.2. Espectrómetro dispersivo de energía (EDS).	49
6.1.2.1. EDS de nanopartículas de plata soportadas en TiO <sub>2</sub>	49
6.1.2.2. EDS de nanopartículas de plata soportadas en TiO <sub>2</sub> recuperado.	50
6.1.2.3. EDS de nanopartículas de plata soportadas en TiO <sub>2</sub> recuperado irradiado con rayos UV.	51
6.1.3. Difracción con rayos X.	52
6.1.3.1. Difracción de rayos x de nanopartículas de plata soportadas por TiO <sub>2</sub> 0.5% método sol-gel.	52
6.1.3.2. Difracción de rayos x sobre nanopartículas de plata soportadas por TiO <sub>2</sub> 1.5% método sol-gel.	53
<b>6.2. Evaluación antibacterial.</b>	<b>54</b>
6.2.1. Evaluación del Tio <sub>2</sub> -Ag al 1.5 % sobre bacterias de Escherichia coli con y sin presencia de luz UV.	55
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>64</b>
<b>8. AGRADECIMIENTOS</b>	<b>65</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>66</b>



## LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

<b>FIGURA 1: Micrografías de microscopía electrónica de barrido de los microorganismos <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>. Esquema de la actuación de las nanopartículas de plata sobre una bacteria.</b>	<b>14</b>
<b>FIGURA 2: Estructuras cristalinas del <math>TiO_2</math> a) Rutilo, b) Anatasa y c) Broquita (Jin-Chung, Sze-Mun., 2012).</b>	<b>16</b>
<b>FIGURA 3: Espectro electromagnético</b>	<b>20</b>
<b>FIGURA 4: Interacción dipolar</b>	<b>21</b>
<b>FIGURA 5: Conducción iónica</b>	<b>22</b>
<b>FIGURA 6: Tipos de interacción del campo electromagnético con los materiales (Jesús Prado; Emilio Morán, 2011)</b>	<b>23</b>
<b>FIGURA 7: Esquema simplificado de la pared celular de las bacterias Gram positivas y Gram negativas (Y. Flores 2014)</b>	<b>25</b>
<b>FIGURA 8: Diagrama general de síntesis sol-gel de <math>TiO_2</math></b>	<b>32</b>
<b>FIGURA 9: Reactor de microondas marca Anton Paar modelo Synthos.</b>	<b>33</b>
<b>FIGURA 10: Diagrama general de síntesis hidrotérmica de <math>TiO_2</math></b>	<b>34</b>
<b>FIGURA 11: Diagrama de Impregnación de nanopartículas de plata sobre <math>TiO_2</math></b>	<b>36</b>
<b>FIGURA 12: Microscopio Electrónico de Barrido JSM-6400 JEOL Noran Instruments.</b>	<b>38</b>
<b>FIGURA 13: Equipo de difracción de rayos x SIEMENS modelo D-500</b>	<b>39</b>
<b>FIGURA 14: Metodología para la determinación de la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida.</b>	<b>43</b>
<b>FIGURA 15: Micrografías de <math>TiO_2</math>-Ag (1)2000X, (2)5000X, (3)40000X Y (4)100000X.</b>	<b>46</b>
<b>FIGURA 16: Micrografías de <math>TiO_2</math>-Ag Recuperado (1)2000X, (2)10000X, (3)100000X Y (4)100000X.</b>	<b>47</b>
<b>FIGURA 17: Micrografías de <math>TiO_2</math>-Ag con luz UV (1)5000X, (2)10000X, (3)10000X Y (4)100000X.</b>	<b>48</b>
<b>FIGURA 18: Mapeo de <math>TiO_2</math>-Ag recuperado irradiado con rayos UV</b>	<b>49</b>
<b>FIGURA 19: Graficas de espectro dispersivo de la energía (EDS) <math>TiO_2</math>-Ag.}</b>	<b>50</b>
<b>FIGURA 20: Graficas de espectro dispersivo de la energía (EDS) <math>TiO_2</math>-Ag recuperado.</b>	<b>51</b>

<b>FIGURA 21: Graficas de espectro dispersivo de la energía (EDS) <math>TiO_2</math>-Ag recuperado irradiado con rayos UV.</b>	<b>52</b>
<b>FIGURA 22: Graficas de difracción de rayos x sobre <math>TiO_2</math>-Ag al 0.5% sintetizado por el método sol-gel.</b>	<b>53</b>
<b>FIGURA 23: Graficas de difracción de rayos x sobre <math>TiO_2</math>-Ag al 1.5% sintetizado por el método sol-gel.</b>	<b>54</b>
<b>FIGURA 24: Efecto inhibitorio del <math>TiO_2</math>-Ag sobre crecimiento de <i>E. coli</i>.</b>	<b>58</b>
<b>FIGURA 25: Efecto inhibitorio del <math>TiO_2</math>-Ag irradiado con rayos UV sobre crecimiento de <i>E. coli</i>.</b>	<b>59</b>
<b>FIGURA 26. Comparación del efecto inhibitorio de los materiales sobre crecimiento de <i>E. coli</i>.</b>	<b>60</b>
<b>FIGURA 27: Efecto inhibitorio del <math>TiO_2</math>-Ag sobre crecimiento de <i>E. coli</i> (Porcentaje)</b>	<b>62</b>
<b>FIGURA 28: Efecto inhibitorio del <math>TiO_2</math>-Ag irradiado con rayos UV sobre crecimiento de <i>E. coli</i>(Porcentaje)</b>	<b>62</b>
<b>FIGURA 29. Comparación del efecto inhibitorio de los materiales sobre crecimiento de <i>E. coli</i> (Porcentaje).</b>	<b>63</b>
<b>TABLA 1: Inhibición de colonias por cada prueba (duplicada).</b>	<b>56</b>
<b>TABLA 2: Numero de colonias contadas por cada prueba (duplicada).</b>	<b>57</b>
<b>TABLA 3: Porcentaje de colonias por cada prueba.</b>	<b>61</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (*ETA*) se producen por la ingestión de alimentos o bebidas contaminados con microorganismos patógenos que afectan la salud del consumidor en forma individual o colectiva. Por esto, continuamente se investigan métodos o técnicas que permitan reducir significativamente estas enfermedades mediante un abastecimiento de agua y un saneamiento adecuado. El rol del abastecimiento de agua en la mejora de la salud no se limita a aquellas enfermedades que se transmiten a través de la ingestión de agua por medio de comidas o bebidas. Una ingesta de agua contaminada por coliformes puede causar diversas enfermedades las cuales están asociadas a diarreas y vómitos, pero también se pueden presentar otros como choque séptico, hepatitis, cefaleas, fiebre, visión doble, etcétera (Rosas GA, 2001).

En lo que respecta a la *E. coli*, si bien son habitantes normales del tracto intestinal del hombre y los animales de sangre caliente, algunos serotipos bien definidos están asociados a infecciones del tracto urinario y entérico en estas mismas especies. Muchas de estas cepas producen toxinas determinadas genéticamente por plásmidos (Carlos Amasino, 2017).

En el pasado, la tarea del ingeniero fue desarrollar aparatos y equipos basados en los conocimientos de la física. En la actualidad, la biología es un actor presente que no debe desdeñarse en los nuevos diseños de la ingeniería. Los procesos biológicos pueden demostrar al ingeniero delicados mecanismos que él debe utilizar para desarrollar la ingeniería del futuro. La lucha contra las bacterias está reclamando la participación de los ingenieros, la cual ya empezamos a presenciar con su contribución en áreas de la nanotecnología, biotecnología e ingeniería biomédica. Así se han podido desarrollar nuevos compuestos y se han logrado producir a gran escala (Rubén Morones, 2009).

Existen diferentes tipos de tratamientos tales como: los preliminares, primarios, secundarios, terciarios y avanzados. Los tratamientos preliminares y primarios consisten en la remoción de sólidos flotantes y suspendidos,

respectivamente, los secundarios están conformados principalmente por procesos biológicos, los terciarios sirven para dar características potables al agua y los avanzados son aquellos cuyo objetivo es remover los contaminantes que no se eliminaron en las etapas anteriores.

## 2. ANTECEDENTES

En los últimos años se le ha dado una enorme importancia al cuidado de la naturaleza y el medio ambiente, tomando medidas con los conocimientos existentes para poder conservar un modo de vida saludable y sustentable para el ser humano, es por ello que se debe seguir insistiendo en los cuidados y tratamientos de los recursos naturales tales como el agua y que esta sea de consumo humano. Para ello se deben conocer los alcances de los peligros generados a través de la contaminación existente, así como el tratamiento de esa contaminación.

Según las estadísticas de la Organización Mundial de la Salud 3 de cada 10 personas carecen de agua potable y 6 de cada 10 carecen del saneamiento seguro en todo el mundo. Un servicio muy deficiente para la población (OMS: Nada Osseiran, 2017).

Una de las contaminaciones más comunes en el agua es la presencia de bacterias de origen fecal por excretas humanas o de origen animal generando enfermedades transmitidas por vía fecal-oral y la mayor parte de estas se manifiestan en el tracto intestinal, es decir, “enfermedades entéricas”. El síndrome más frecuente es la diarrea, es decir, deposiciones sueltas frecuentes. (F. Eugene McJunkin, 1988).

El análisis para la evaluación de la calidad biológica del agua consiste, generalmente, en la determinación de indicadores bacteriológicos y no de organismos patógenos como tales. Tradicionalmente, los grupos de bacterias considerados como indicadores, son coliformes totales y coliformes fecales. El indicador ideal es el que se encuentra presente cuando existen bacterias patógenas de origen fecal y cuyo número está relacionado directamente con el grado de contaminación (NOM-127-SSA1-1994). El indicador tradicional de la calidad microbiológica son las bacterias del grupo de las coliformes fecales, especialmente *E. coli*.

La necesidad por encontrar soluciones a la contaminación ambiental y en específico del agua requiere de profesionales en el tema para la investigación y el tratamiento del mismo.

En las últimas décadas, la investigación de ciencia y tecnología se ha centrado en las estructuras atómicas y materiales a una escala nanométrica (Savage, 2007) debido a sus propiedades fisicoquímicas de cada material, resultan ser muy atractivos y usados en diferentes disciplinas ya que poseen una relación superficie-volumen y por lo tanto una mayor superficie de contacto con el entorno (Maurer-jones, 2010).

## 2.1. Nanopartículas

El estudio de las Nanopartículas ha sido de gran importancia debido a la gran variedad de nuevas propiedades y potenciales aplicaciones dentro de la ciencia moderna. Las partículas inorgánicas has sido de gran interés debido a las propiedades biológicas, ópticas, magnéticas, electrónicas y catalíticas, de esta forma estas partículas en especial metálicas son interesantes desde el punto de vista práctico.

La segunda revisión normativa de la comisión europea en 2012 define nanomaterial como “un material natural, secundario o fabricado que contenga partículas, sueltas o formando un agregado o aglomerado y en el que el 50% o más de las partículas en la granulometría numérica presente una o más dimensiones externas en el intervalo de tamaños comprendido entre 1nm y 100nm”

Las nanopartículas metálicas poseen una alta relación superficie-volumen del confinamiento cuántico del movimiento electrónico en nanopartículas semiconductoras, de la resonancia de plasmones superficiales en algunas partículas metálicas o del supe paramagnetismo en nanomateriales magnéticos. (C. Burda et all, 2005).

Las fuentes de nanopartículas de pueden clasificar como naturales o cómo derivadas de actividades antropogénicas intencionales o accidentales. Pueden ser producidas a partir de casi cualquier producto químico, la mayoría ha sido fabricada a partir del silicio, carbono y óxidos de metal.

## 2.2. Plata

Se desea usar la plata debido a la eficiencia en sus últimos estudios y su ya antigua trayectoria como agente microbicida, por ejemplo, Desde la antigüedad la plata se ha usado ampliamente como metal precioso en la joyería, utensilios, fotografía, etc. (Chen y Schluesener, 2008). Sin embargo, se sabe que el ejército de Alejandro Magno usaba monedas de plata a sus almacenes de agua para mantenerla pura y usaban utensilios de plata, también los griegos y otras civilizaciones usaban la plata para cocina y mantener la seguridad del agua, es decir, su conservación para uso común.

Sus aplicaciones antimicrobianas ya se explotaban antiguamente en su medicina tradicional (behera, 2011). Hipócrates, padre de la medicina moderna, describió el empleo de polvo de plata para su aplicación de heridas y en el tratamiento de úlceras.

Posteriormente, durante el siglo XIX, se encontró que el nitrato de plata, una de las sales de este metal, ayudaba en la cicatrización y prevención de infecciones en quemaduras y heridas. Este uso del nitrato de plata sigue vigente en la actualidad. En la época moderna diversos compuestos de plata se venden en el mercado en forma de suplementos naturales para combatir infecciones. En los hospitales, uno de los compuestos que se usa con frecuencia es el nitrato de plata en soluciones diluidas, el cual se aplica en los ojos de recién nacidos para evitar posibles infecciones (Rai, A. Yadav y A. Gad. 2009) El avance de áreas de la ciencia como la nanotecnología, biotecnología, biología de sistemas y la biología sintética dibujan un futuro optimista para estos compuestos de plata (Rubén Morones, 2009).

La plata ha ganado mucho interés debido a su conductividad, estabilidad química y su actividad catalítica y antibacteriana, debido a eso las nanopartículas de plata se están convirtiendo en unos de los productos de mayor crecimiento en la nanotecnología. Su fuerte actividad antimicrobiana es la principal característica y actualmente en el ámbito médico existen apósitos para heridas, dispositivos

anticonceptivos, instrumental quirúrgico y prótesis óseas, todos ellos para evitar el crecimiento antibacteriano (Cheng, 2004; Cohen, 2007).

### 2.2.1 Nanopartículas de plata

Cómo ya se mencionó antes las nanopartículas metálicas que han resultado más promisoras como agente bactericida son las nanopartículas de plata y en general, la preparación y estabilización de las nanopartículas metálicas se realizan a través de métodos físico químicos. En el caso de los métodos químicos se usa la reducción química técnicas electroquímicas y fotoquímicas.

En el caso de las nanopartículas de plata los primeros métodos descritos son el método Lee-Meisel (P. C. Lee et al, 1982) y el método Creighton (J. A. Creighton et al, 1979). El primero de ellos consiste en una variación del método Turkevich para la obtención de nanopartículas de oro, en el que se emplea  $\text{AgNO}_3$  en lugar de  $\text{HAuCl}_4$  como precursor metálico y citrato de sodio como agente reductor. El método de Turkevich, en sí, se basa en la reducción de una sal de oro ( $\text{HAuCl}_4$ ) con varios agentes reductores, entre ellos el citrato de sodio, generando Nanopartículas de un tamaño aproximado de 20 nm. Por otra parte, el método de Creighton consiste en la reducción de  $\text{AgNO}_3$  con un agente reductor fuerte como  $\text{NaBH}_4$ , obteniendo Nanopartículas monodispersas y con un tamaño de aproximadamente 10 nm.

Los métodos mencionados representan sólo una parte de los informados en la literatura; cada uno de ellos posee ventajas y desventajas, en consecuencia, la elección de la síntesis dependerá de la naturaleza de la aplicación de la Nanopartícula.

Una de las características que lo hace más atractivo la aplicación de las Nanopartículas de plata, es la baja probabilidad del desarrollo de resistencia por parte de los microorganismos en comparación a los antibióticos (Hajipour, 2012). Por tal motivo, se ha propuesto implementar el uso de las Nanopartículas Ag sobre distintos dispositivos de uso médico.



## 2.2.2 Nanopartículas de plata y su acción bactericida

La necesidad de nuevos agentes microbicidas debido a la alta incidencia a infecciones microbianas ha generado el desarrollo de nuevas estrategias para disminuir la colonización de los microorganismos. Dentro de éstas han surgido las Nanopartículas de Plata como una posible solución ante estos problemas de resistencia, así como también para reducir la incidencia de las infecciones. Como se ha mencionado en capítulos anteriores, la capacidad microbicida de la Ag se conoce desde tiempos antiguos, en los que las sales de Ag eran usadas cotidianamente para realizar cuidados paliativos para infecciones o para potabilizar agua (Y. Flores, 2014)

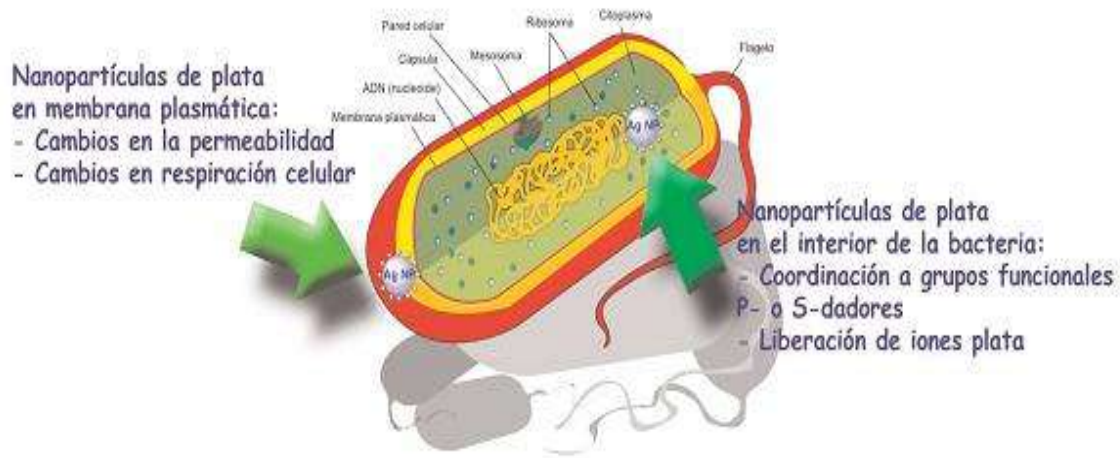
Actualmente, los mecanismos de la acción bactericida, tanto de iones Ag(I) como de Nanopartículas de plata, no han sido dilucidados por completo (cioffi, 2012), aunque sí se sabe que en el último caso están involucrados los iones Ag(I) liberados por las mismas. Al respecto se han postulado varios mecanismos de acción basados en diferentes tipos de interacción entre la célula y la plata (ya sea en forma de iones o como Nanopartículas), los que se mencionan a continuación:

*1) Interacción con la pared celular bacteriana:* es el primer punto de ataque de las nanopartículas de plata, ya que al interaccionar con la pared bacteriana pueden internalizarse las nanopartículas generando daños por estrés oxidativo y al interaccionar con proteínas y ADN bacteriano, además de una acumulación de Plata en el interior de la célula, afectando su permeabilidad y conduciendo a la muerte celular [Marambio-jones, 2010]. Se ha demostrado que los iones Ag(I) causan cambios morfológicos en la pared celular que ocasiona la separación de la membrana plasmática tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas [José Rubén, 2005]. Por otro lado, las Nanopartículas al unirse a la membrana plasmática, cambian su permeabilidad provocando un desequilibrio en la bomba de ATP (adenosina trifosfato) y en el gradiente de protones, generando una disipación de la fuerza protón-motriz, además de desacoplar la cadena transporte de electrones por inhibición de las enzimas involucradas en la cadena y finalmente conducen a la muerte celular [José Rubén, 2005].

*II) Interacción con ADN, enzimas y proteínas citoplasmáticas:* una vez que las Nanopartículas de plata ingresan a la célula pueden interactuar con el ADN, proteínas y enzimas. Al respecto se ha encontrado la presencia de ADN condensado en el citoplasma de *S. aureus* [Li, 2011] luego de la exposición a Nanopartículas de plata. En primer lugar, es de conocimiento que el ADN bacteriano se encuentra condensado formando el nucleoide. Sin embargo, para llevarse a cabo la replicación del ADN de una bacteria y su posterior división celular, el ADN debe "relajarse" para permitir la síntesis del mismo. Ante una situación desfavorable o de estrés, como la presencia de las Nanopartículas, el ADN se protege plegándose sobre sí mismo y no permite su replicación y la posterior división celular. Este comportamiento fue observado para *E. coli* [Feng, 2000] y *S. aureus* [Choi, 2008] ante la presencia de iones Ag(I). Por otra parte, se han encontrado evidencias de la interacción de iones Ag(I) con ADN, la cual genera cambios en la conformación de la hélice [Jung, 2008] e interacción con bases de guanina y adenina [Arakawa, 2001]. Se ha demostrado también que la presencia de Nanopartículas de plata provoca una disminución de la actividad de la enzima deshidrogenasa, que forma parte de la cadena respiratoria, produciendo la inhibición de la respiración celular en *E. coli* [Li, 2010] y *S. aureus* [Li, 2011].

*III) Interacciones que provocan la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS):* Las ROS son productos generados normalmente durante el proceso de respiración celular, que incluyen al oxígeno singlete, peróxido de hidrógeno, radicales superóxidos e hidroxilos. La célula posee un mecanismo que controla a las especies ROS, denominado defensa antioxidante. Sin embargo, ante una situación de estrés la concentración de estas ROS aumenta rápidamente, causando daños a lípidos y ADN. La presencia de trazas de iones Ag(I) es capaz de generar radicales libres en *E. coli* y *S. aureus* [Kim, 2007]. En este sentido, varios autores han estudiado la capacidad de los iones Ag(I) para generar grandes concentraciones de especies superóxido en *E. coli* y *S. aureus* mediante una enzima superoxidasa [Park, 2009]. Además, Choi *et al.* demostraron la presencia de especies ROS cuando las bacterias fueron tratadas con iones Ag(I), AgCl y Nanopartículas de plata [Choi, 2008].

Cualquiera de los mecanismos propuestos por los diferentes autores, las Nanopartículas ocasionan la lisis celular y su posterior muerte, asegurándonos la presencia de un efecto bactericida.



**FIGURA 1:** Micrografías de microscopía electrónica de barrido de los microorganismos *E. coli* y *S. aureus*. Esquema de la actuación de las nanopartículas de plata sobre una bacteria.

### 2.2.3. Efectos sobre la salud y medio ambiente de las nanopartículas de plata

Existen muchas aplicaciones de las Nanopartículas de plata, la exposición humana a las mismas puede tener lugar a través de los alimentos, el aire y por contacto, por lo que las vías de exposición oral, respiratoria y dérmica son las más relevantes (Johnston, 2010).

**Vía Oral:** La ingestión de partículas de plata en suspensión está asociada con una serie de consecuencias perjudiciales, incluyendo úlceras intestinales y argiria (Wadhwa y Fung, 2005). tras la ingestión de la plata es probable que se convierta en su forma iónica debido al pH ácido del estómago (PEN 15, 2008). Debido a la mayor área superficial esto podría ocurrir también con las Nanopartículas de plata. Varias investigaciones sugieren que, tras la exposición oral de las Nanopartículas de plata, es probable que estas o los iones plata se trasladen desde el intestino al torrente sanguíneo, por tanto, pasen a la vía sistémica y a partir de ahí causen síntomas

como la argiria y consecuencias perjudiciales como daño en el hígado (Ávalos, 2013). A pesar de estas investigaciones, se requieren más estudios para esclarecer la toxicocinética de estas Nanopartículas de plata.

*Vía respiratoria:* Tras la inhalación de Nanopartículas de plata se han observado depósitos en la cavidad nasal, en la región alveolar de los pulmones y ganglios linfáticos pulmonares (Takenaka, 2001). Estas provocan una respuesta inflamatoria. Las partículas acumuladas en la región alveolar, se pueden eliminar a través de tres rutas importantes. La primera, a través del sistema mucociliar a lo largo del tracto traqueobronquial, la segunda ruta a través del sistema linfático y, por último, la tercera a partir de la disolución de las Nanopartículas de plata que tiene como consecuencia la incorporación de éstas al torrente sanguíneo (Takenaka, 2000). Esta última puede ser entre otras la causa de la presencia de Nanopartículas de plata. Es importante la presencia de plata dentro del bulbo olfatorio y el cerebro, ya que esto sugiere que las Nanopartículas además de distribuirse a través de la sangre, también se pueden distribuir a través del sistema nervioso (Sung, 2009).

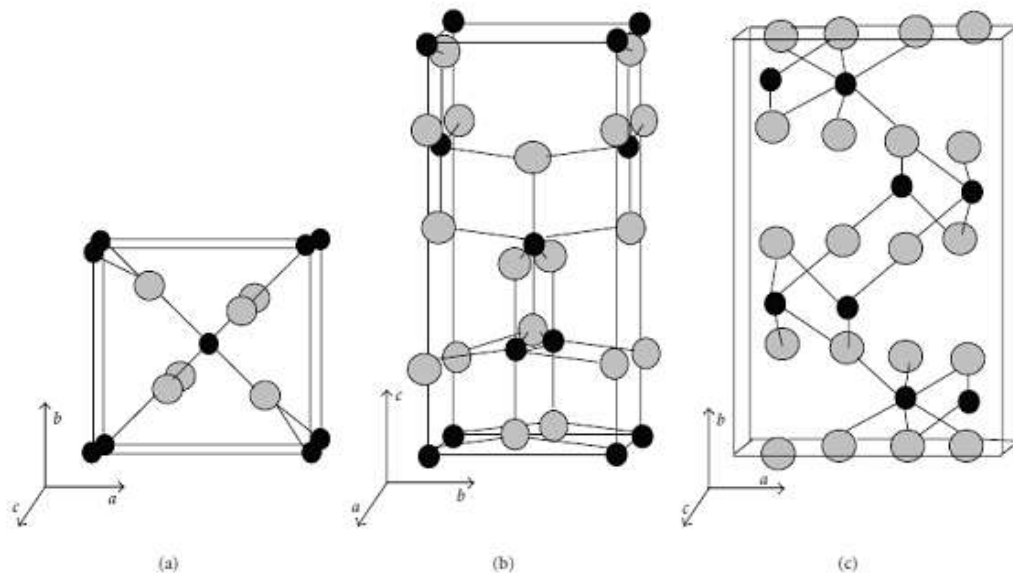
*Vía dérmica:* Una de las funciones de la piel es proteger a los órganos subyacentes. El estrato de la capa córnea de la epidermis es una fuerte barrera que permite una penetración muy limitada de partículas. La penetración transdermal de finas partículas a través de piel intacta ha sido documentada, sin embargo, existen muy pocos datos sobre las Nanopartículas de plata (Tinkle, 2003). En estudios con piel dañada se han observado, tras la exposición de las nanopartículas de plata, depósitos de plata dentro de la piel, lo que se conoce como argiria. es probable que la exposición de las Nanopartículas en la piel dañada permita el acceso a estas y a través de los capilares dermales a la circulación sanguínea y así ejercer su toxicidad en sitios distales.

Investigaciones previas sugieren que existen diversas propiedades físico-químicas de las Nanopartículas de plata que están involucradas en su toxicidad intrínseca, como son principalmente el tamaño, la superficie específica, estado de aglomeración, la forma, la solubilidad y la carga superficial (Carlson, 2008; Choi y Hu, 2008; Horie, 2012).

## 2.3 Dióxido de titanio

El  $\text{TiO}_2$  es un óxido cerámico semiconductor con propiedades fotocatalíticas que presenta polimorfismo con tres fases cristalinas: Anatasa (tetragonal), Rutilo (tetragonal) y Broquita (ortorrómbica); cada fase con propiedades físicas diferentes, las cuales presentan diferente banda prohibida y actividad química, en la cual la fase anatasa siempre se ha encontrado como mejor fotocatalizador. (Marinas, 2001).

Uno de los métodos más utilizados en el tratamiento de aguas residuales es la fotocatalisis, el  $\text{TiO}_2$  ha sido ampliamente investigado como fotocatalizador debido a que es estable químicamente, de bajo costo y sus valores de banda de energía prohibida ( $E_g$ ) lo hacen adecuado para esta aplicación. Para ello, es necesario encontrar métodos de síntesis sencillos que nos permitan mejorar las propiedades de dicho material, así como su obtención a un bajo costo.



**FIGURA 2:** Estructuras cristalinas del  $\text{TiO}_2$  a) Rutilo, b) Anatasa y c) Broquita (Jin-Chung, Sze-Mun., 2012).

El  $\text{TiO}_2$  tiene un sinfín de aplicaciones fotocatalíticas, por ejemplo:

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

La seria desventaja de la fotocatalisis heterogénea con  $\text{TiO}_2$  es que puede ser usado como fotocatalizador sólo con radiación UV ( $\lambda < 387 \text{ nm}$ ).

### 2.3.1 Síntesis sol-gel

El desarrollo de materiales con propiedades foto catalíticas, ha sido un campo de investigación muy activo en los últimos años, debido a las potenciales aplicaciones de dichos materiales en el área ambiental para la descomposición foto inducida de compuestos orgánicos o en procesos de foto electrólisis para producción de hidrógeno y oxígeno, por mencionar algunas (A. Fujishima, 1972). Dentro de los materiales candidatos para estos propósitos, el  $\text{TiO}_2$  ha sido ampliamente estudiado debido a que presenta propiedades eléctricas, ópticas y químicas singulares.

El método sol-gel es un proceso que se descubrió a finales del siglo XIX, aunque no se estudió de manera intensa hasta que, en 1931, Steven. S. Kistler consiguió demostrar que un gel contenía una red sólida y continua del mismo tamaño y forma que un gel húmedo (Jesús Prado, 2011).

El proceso sol-gel es un método de síntesis de  $\text{TiO}_2$  en el cual, partiendo de precursores moleculares como alcóxidos metálicos o sales inorgánicas, se obtiene un esqueleto del óxido mediante reacciones de hidrolisis y polimerización a baja temperatura, lo cual permite la síntesis de fases metaestables del óxido e incluso de

sólidos mixtos organo-inorgánicos. Las especiales características de los soles y geles permiten la síntesis de fibras, láminas, cadenas, geles y polímeros tridimensionales (María Rojas, 2015). El método sol-gel consiste, de manera general, en la preparación de un sol, gelación del sol y remoción del solvente. (Burda, C; Qiu, X. 2007).

Las ventajas del procedimiento sol-gel son:

- Control de la pureza de los reactivos, del grado de homogeneidad de la mezcla de precursores y de la microestructura (uniformidad y distribución de tamaños de partículas) [Luz Amparo, 2004].
- La posibilidad de Fabricación en Formas útiles no tradicionales (fibras, películas delgadas, burbujas, elementos ópticos, etc.) con propiedades muy controladas (Luz Amparo, 2004).
- Otra importante innovación que aporta el procedimiento sol-gel es la de poder preparar, a temperaturas bajas, materiales muy puros con alto grado de homogeneidad, que no siempre pueden conseguirse por los métodos tradicionales (Luz Amparo, 2004).

### **2.3.2 Síntesis Hidrotérmica**

La química hidrotérmica es el mayor modo geológico de formación de una variedad de minerales que parecen tener la propiedad de que su estructura se puede descomponer dentro de bloques de construcción comunes.

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

Hay variables en la síntesis hidrotérmica que se pueden alterar para producir diferentes materiales: los reactivos para el material microporoso, la solubilidad de estos, el solvente, el pH de la mezcla, añejamiento, temperatura y presión de la

reacción, agitación, agentes mineralizantes, la presencia y tipo de iones compensantes de carga y el tiempo de reacción. Este último parámetro es particularmente importante ya que las síntesis son, en general, cinéticamente controladas, a partir de diferentes fases metaestables que se forman en el tiempo. Los materiales microporosos también se forman fuera de esas condiciones generales. Este es el método más utilizado para preparar sólidos microporosos. Típicamente, se preparan bajo condiciones solvotérmicas (temperatura entre 80 y 200 °C, presión autógena entre 30 y 910 bar) en autoclaves de acero inoxidable recubiertas internamente con teflón y con un tiempo de calentamiento que va desde unas pocas horas a aproximadamente treinta días (Palacios; Amparo 2004).

Este tratamiento tiene varias ventajas: la obtención de un producto altamente cristalino y homogéneo a una temperatura relativamente baja, esto favorece la baja aglomeración entre partículas, un homogéneo tamaño de partícula y el control de la morfología de la partícula. También ofrece una composición uniforme, partículas monodispersadas y control en la forma y en el tamaño de las partículas.

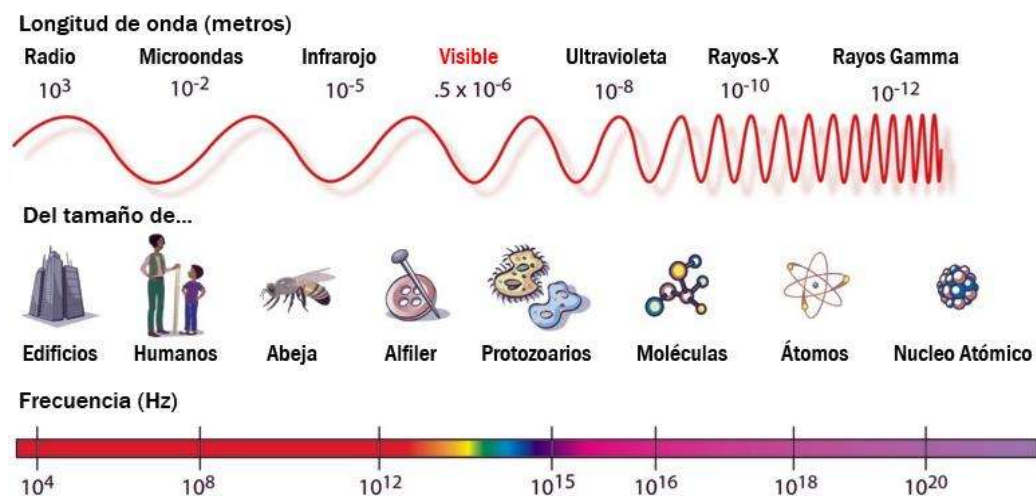
### **2.3.3. Microondas**

Existen procedimientos químicos que poseen gran efectividad, sin embargo, el uso de ellos es poco respecto a que tiene elevados consumos de energía, pérdidas de materiales volátiles o la necesidad de hacer moliendas. Para ello se propone una serie de procedimientos en estos últimos años, destacan entre ellos, la combustión, la sonoquímica, *spark plasma* y la síntesis asistida por microondas. Esta última resulta ser un método muy rápido, económico, eficaz y respetuoso con el medio ambiente (Jesús Prado; Emilio Morán, 2011).

El descubrimiento del calentamiento por medio de microondas ocurrió en 1940 durante la Segunda Guerra Mundial, cuando los científicos británicos John Randall y H. A. Boot inventaron una válvula magnetrón para generar microondas, componente fundamental de los sistemas de radar. En 1946, Percy Spencer, un ingeniero que trabajaba en la empresa Raytheon realizaba unas pruebas sobre magnetrón y tomó



un chocolate que tenía en su bolsillo, cuando la tocó percibió que éste estaba derretido. Sabiendo que el magnetrón produce calor se cuestionó si había derretido el chocolate. Tras realizar distintos ensayos con otros alimentos se observó que las microondas los cocinaban de una forma mucho más rápida (B. L. Hayes, 2002). Sin embargo, fue en 1975 cuando Sutton observó que la radiación microondas calentaba los materiales cerámicos (D.E. Clark, 2005) algo que podría resultar sorprendente considerando que la región de microondas en el espectro electromagnético está situada por debajo del infrarrojo lo que supone una zona de baja energía entre 0.3 y 300 Ghz.

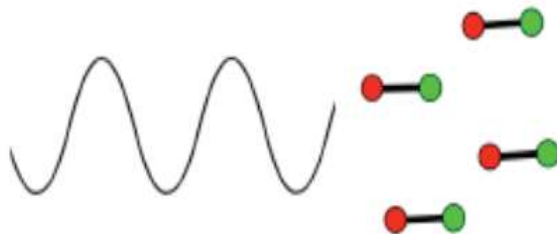


**FIGURA 3:** Espectro electromagnético

El calentamiento es producido debido a que el campo de las ondas electromagnéticas es alterno provocando un rápido movimiento sobre las especies polares que tratan de alinearse en el campo. La resistencia a dicho movimiento genera calor (Jesús Prado; Emilio Morán, 2011). Sin embargo, aún se desconoce con exactitud los alcances de las microondas con los materiales sólidos ya que no ha sido del todo explorada. Los componentes eléctricos provocan calentamiento por dos mecanismos: polarización dipolar y conducción iónica.

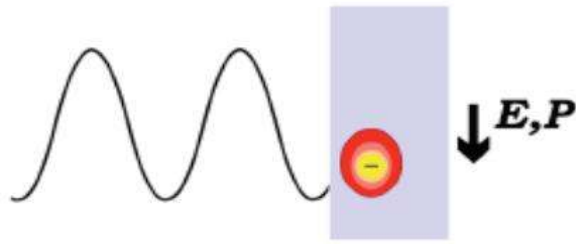
1) *Polarización dipolar:* La interacción del campo eléctrico con moléculas polares es llamada mecanismo de polarización dipolar. Cuando son expuestas a

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



**Figura 4:** Interacción dipolar

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



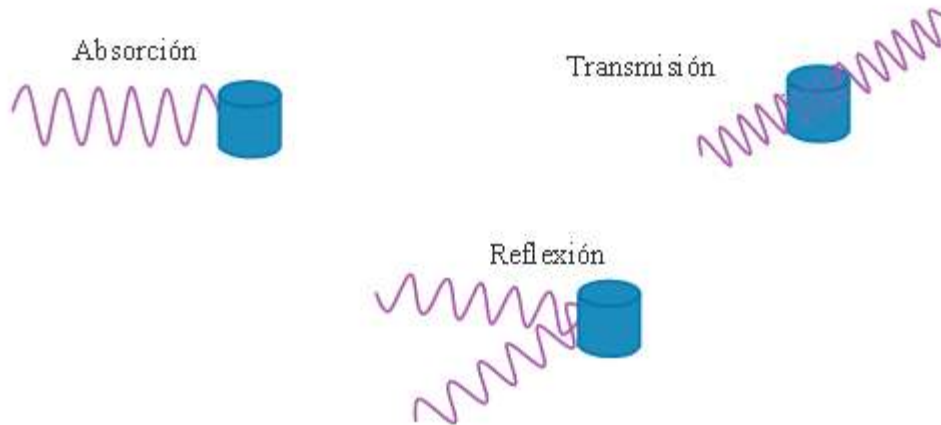
**Figura 5:** *Conducción Iónica*

Como bien se sabe, una onda electromagnética tiene un componente eléctrico y otro magnético. El componente eléctrico de una onda electromagnética puede ser reflejado, transmitido o absorbido por los materiales. En función de la interacción de las microondas con la materia (M. Gupta, 2007):

I) Materiales reflectantes: Materiales conductores con electrones libres, como los metales, que reflejan la radiación y no permiten que la onda electromagnética atraviese el material.

II) Materiales transparentes: Materiales con una baja pérdida dieléctrica o aislantes, como el vidrio, que permiten que la onda atraviese el material con una pequeña atenuación.

III) Materiales absorbentes: Es el caso de los materiales dieléctricos, son capaces de absorber la onda electromagnética y transformarla en calor.



**FIGURA 6:** Tipos de interacción del campo electromagnético con los materiales (Jesús Prado; Emilio Morán, 2011)

Existen dos efectos principales de la radiación con microondas:

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

En lo que respecta al calentamiento por microondas existen diversas interacciones y las principales características de ellas son las siguientes:

I) *Radiación penetrante:* La energía es transferida al material mediante conducción y convección creando gradientes térmicos. En el caso del calentamiento por microondas, la energía se transfiere directamente al material mediante una interacción a nivel molecular con el campo electromagnético. La profundidad que alcanza la radiación varía en función del material, propiedades dieléctricas y magnéticas, la frecuencia y potencia del microondas, la temperatura, la conductividad, el tamaño y la densidad del material.

II) *Calentamiento rápido:* El empleo de microondas reduce significativamente el tiempo de procesamiento respecto, manteniendo sus propiedades o mejorándolas. Sin embargo, hay que tener cuidado para prevenir la creación de puntos calientes

durante un calentamiento tan rápido (S.F. Lui, 1999; S. Komameni, 2002). Algunos autores aseguran que las reacciones se aceleran entre 10 y 1.000 veces cuando se realizan asistidas por microondas (C. Parada, 2006).

III) *Calentamiento selectivo de los materiales*: El calentamiento, muchas veces, se manifiesta dependiendo de las características del material empleado y su habilidad para acoplarse con el campo eléctrico y/o magnético, debido a esto, el calentamiento se localiza en ciertas regiones. Muchos materiales, como  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{Si}_3\text{N}_4$  no se acoplan bien con las microondas de 2,45 GHz (las más frecuentes) a temperatura ambiente, por lo tanto, es necesario adicionar un susceptor de la radiación (como grafito o carbón activo) que se acople fuertemente con la radiación, provocando un aumento considerable de temperatura, suficiente para permitir el auto-calentamiento de los materiales (M. Gupta, 2007; C. Parada, 2006).

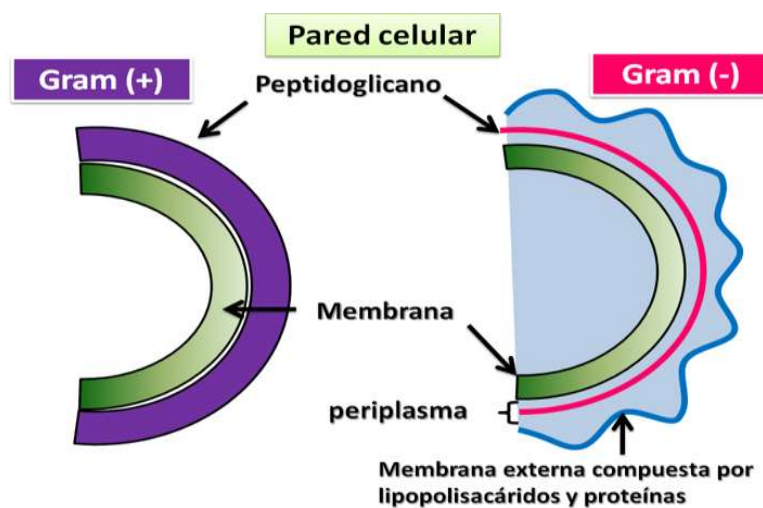
II) *Efectos no térmicos*: Estos efectos incluyen todo aquello que es distinto al calentamiento de los métodos convencionales y que no puede ser predicho ni explicado fácilmente basándose en la diferencia de perfil de temperaturas entre el calentamiento por microondas y el convencional. Posiblemente esto radica en la presencia de algún tipo de efecto entre el campo eléctrico y las interfases de las partículas, la posible formación de un plasma causado por la radiación microondas o el aumento de la difusión en los sólidos por efectos de segundo orden (R. Wroe, 1996; A. de la Hoz, 2005).

## **2.4. Bacteria Escherichia coli**

Las bacterias forman el grupo de microorganismos más importante y son indispensables para el ciclo de nutrientes de un ecosistema, sin embargo, las bacterias patógenas una vez que se introducen en el cuerpo se multiplican potencialmente causando diversas enfermedades infecciosas como el tétanos, fiebre, diarrea, sífilis, etc. además, son organismos unicelulares procariotas con dimensiones dentro de la escala del micrómetro. Estos organismos no poseen

membrana nuclear, mitocondrias o un núcleo verdadero, y se reproducen por división asexual (Madigan, 2003).

Las bacterias pueden dividirse en dos grandes grupos de acuerdo a su respuesta frente a la tinción diferencial de Gram, la cual divide a las bacterias en Gram positivas y Gram negativas de acuerdo a la estructura de su pared celular (Madigan, 2003), permitiendo así determinar la morfología del microorganismo. La estructura de la pared celular en las bacterias Gram positivas y Gram negativas es muy distinta, ya que en las Gram positivas están compuesta por una gruesa capa de un solo tipo de moléculas, denominadas peptidoglicanos, con ácidos teicoicos intercalados. Por el contrario, las bacterias Gram negativas están compuestas por una capa delgada de peptidoglicano y membranas celulares externas e internas, obteniéndose así una pared más compleja que las Gram positivas (Madigan, 2003).



**FIGURA 7:** Esquema simplificado de la pared celular de las bacterias Gram positivas y Gram negativas (Y. Flores 2014)

Podríamos identificar a la bacteria *E. Coli* por sus características como parte del grupo Gram negativo. Esta especie, fue descrita por primera vez en 1885, por el bacteriólogo alemán Theodore Von Escherich, quien la denominó *Bacterium coli commune*, pasando luego a conocerse como *E. coli*, en honor a su descubridor.

Si bien son habitantes normales del tracto intestinal del hombre y los animales de sangre caliente pocas horas después del nacimiento, existen seis serotipos bien definidos que están asociados a infecciones del tracto urinario y entérico: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y de adherencia difusa (DAEC) (Carlos Amasino, 2017).

I) *E. coli enterotoxigénica*: Es transmitida generalmente por contaminación fecal del agua o de los alimentos, con una dosis infectiva de 10<sup>8</sup> unidades formadoras de colonias. La diarrea producida por estos agentes puede ser leve, breve y autolimitada o en algunos casos ser más grave llegando hasta una colitis hemorrágica semejante a cólera con deshidratación (Carlos Amasino, 2017).

II) *E. coli enterohemorrágica*: Es el agente causal de numerosos brotes epidémicos asociados a la ingesta de agua y alimentos contaminados, a partir de la cual los individuos afectados padecen desde diarreas comunes o sanguinolentas, hasta inclusive, el síndrome urémico hemolítico, responsable de grandes epidemias en diversos países (Carlos Amasino, 2017).

III) *E. coli enteroinvasiva*: La bacteria se adhiere, invade y destruye las células intestinales. Producen pocos casos de infección, los que se caracterizan por presentar fiebre, dolor abdominal y diarrea con moco y sangre (Carlos Amasino, 2017).

IV) *E. coli enteropatógena*: Estas cepas afectan al hombre y a los animales produciendo una diarrea líquida con moco, dolores abdominales, vómitos y fiebre moderada. En los países en vías de desarrollo son considerados como una de las principales causas de diarrea infantil, predominando especialmente los serotipos (Carlos Amasino, 2017).

V) *E. coli enteroagregativa*: Esta bacteria puede causar brotes o casos aislados de diarrea persistente, manifestándose como una diarrea líquida, de color verde, con moco, sin sangre, y que en ocasiones puede llegar a ser severa y requerir

rehidratación intravenosa. Algunas veces pueden aparecer vómitos sin o con poca fiebre (Carlos Amasino, 2017).

VI) *E. coli de adherencia difusa*: se puede aislar tanto de personas sanas como en personas con diarrea, siendo más importante en niños de 4 a 5 años. Los principales síntomas que se presentan son diarrea acuosa sin sangre y sin leucocitos (Carlos Amasino, 2017).

## **2.5 Técnicas para la evaluación de inhibición bacteriana**

Las técnicas para la evaluación de inhibición de la bacteria *E. Coli* son indispensables para la demostración del desempeño del material bactericida, así como para conocer la cantidad optima de material soportado para inhibir esta bacteria, para ello, se pueden usar técnicas simples que permitan ver con efectividad, de una manera cuantitativa y cualitativa ese desempeño. De las diversas técnicas, existen dos en particular que se abordarán para este trabajo, la técnica de disolución en agar y la técnica de disolución en caldo.

### **2.5.1 Técnica de Disolución en Agar**

Los métodos de difusión en agar son comunes en un laboratorio clínico de bacteriología, económicos y fáciles de realizar como rutina en un laboratorio clínico [Casals, 1991]

Existe una diversidad de métodos comerciales alternativos a los de referencia basados en las pruebas de difusión y dilución en agar, a una concentración fija o en concentraciones diferentes, determinando cualitativamente si la bacteria es sensible, resistente o moderadamente sensible; o bien se puede conocer cuantitativamente utilizando una serie de diluciones seriadas que nos permiten determinarlo [Drouhet, 1986].



. El National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomienda el método del antibiograma disco-placa para la determinación de la sensibilidad bacteriana que consiste en depositar, en la superficie de agar de una placa de Petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde hacia el agar radialmente formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18-24 horas de incubación, los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición. La concentración de antibiótico en la interface formada entre las bacterias en crecimiento y las bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se aproxima a la concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenida por métodos de dilución. Sin embargo, los métodos disco-placa no permiten reconocer un valor en la concentración. (A.W. Bauer, 1966).

## 2.5.2 Técnica de disolución en caldo

En la dilución en caldo se colocan concentraciones decrecientes del agente antimicrobiano. en estas el medio más comúnmente usado es el *Mueller Hinton* [Punam, 2007] al que se añadirán los suplementos necesarios para asegurar el crecimiento de organismos exigentes. El agente se prepara en una solución madre concentrada que es diluida en caldo hasta obtener las concentraciones apropiadas. Además, se preparan tubos de ensayo sin microbicida como control de crecimiento del microorganismo. El microorganismo crecerá en ausencia del agente bactericida y en aquellos medios en los que su concentración no sea suficiente para inhibir su crecimiento. Sin embargo, a medida que aumenta la concentración del agente microbicida se inhibirá completamente el crecimiento del microorganismo. Generalmente las diluciones son de 1:2 con un caldo de cultivo que sostenga el desarrollo del microorganismo. Por último, mediante recuento en placa se determina el número de las bacterias que sobrevivieron al tratamiento (Flores, 2014).

### 3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad la sociedad ha demandado la necesidad de consumir un agua capaz de usarse para riego y el uso potable, para ello, se han buscado alternativas y soluciones actuales capaces de combatir y reparar los daños existentes del agua, una alternativa en particular es el uso de nanopartículas de plata para la inhibición de la bacteria *E. coli*, esta partícula es efectiva, sin embargo, en el uso directo es costoso y no genera una rentabilidad aceptable, para ello, se cuenta con un soporte mesoporoso para evitar las pérdidas y el aprovechamiento máximo del material, el soporte será el  $TiO_2$ , además se pueden aprovechar las propiedades inhibitorias de este material.

La bacteria *E. Coli* es la causante de diversas enfermedades infecciosas a lo largo del mundo, y al no tener aún un tratamiento actual, es necesario crear síntesis sencillas y efectivas para la elaboración de un material de bajo costo, sencillo y efectivo para el combate de esta bacteria.

## 4. OBJETIVOS E HIPOTESIS

### 4.1 Objetivo General

Sintetizar por dos diferentes métodos de obtención el  $TiO_2$  para que al ser soportado con nanopartículas de plata puedan demostrar su desempeño para inhibir las bacterias de *E. coli*.

### 4.2 Objetivos Particulares

- Sintetizar el  $TiO_2$  por el método de síntesis sol-gel asistido por microondas y síntesis hidrotérmica, para demostrar la efectividad del método.
- Estudiar las dos formas del  $TiO_2$  sintetizado necesario para el soporte de las nanopartículas de plata.
- Realizar el soporte de las nanopartículas de plata en el  $TiO_2$  a diferentes concentraciones para verificar la efectividad de proporciones necesarias para la inhibición de las bacterias.
- Evaluar el efecto bactericida de cada concentración de nanopartículas de plata soportada en  $TiO_2$ .

### 4.3 Hipótesis

Las nanopartículas de plata serán soportadas eficientemente en un material mesoporoso,  $TiO_2$ , sintetizado este por la técnica sol-gel asistida por microondas. El conjunto de la plata soportada en  $TiO_2$  irradiado o no con rayos Ultravioleta inhibirá efectivamente las bacterias de *E. coli*.

## 5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Dentro de este apartado se describirán las síntesis correspondientes del  $TiO_2$  por los métodos sol-gel asistido por microondas y síntesis hidrotérmica, basándonos en la facilidad del  $TiO_2$  sintetizado para adherir las nanopartículas de plata y que estas fueran compatibles, tiempos de síntesis y costos, mediante las técnicas de caracterización correspondientes del material. Se describe la experimentación de los materiales para la inhibición de bacterias *E. coli*, así como los métodos de reconocimiento de la inhibición de la bacteria para, de esta manera, considerar la cantidad mínima inhibitoria de las nanopartículas de plata impregnadas en el  $TiO_2$ .

### 5.1. Síntesis de Materiales

#### 5.1.1. Síntesis Sol-Gel asistida por Microondas

Se prepara una disolución en un vaso de precipitado de la sal precursora de propóxido de titanio en agua, a una temperatura de  $60^{\circ}C$ , con agitación constante por 2 horas, en otro vaso de precipitado, se tiene etilenglicol en agua, bajo las mismas condiciones, el etilenglicol actúa como agente gelificante. Una vez cumplido el tiempo y efectuada la hidrólisis, se procede a mezclar las dos soluciones con agitación continua gota a gota. El tratamiento asistido por microondas será a las condiciones de  $150^{\circ}C$  por 20 minutos a 18 atm de presión, 600 watts a una rampa de calentamiento de  $5^{\circ}C$ . Posteriormente se seca durante 24 horas entre  $100^{\circ}C$  y  $120^{\circ}C$ ; el polvo es macerado suavemente y tamizado, posteriormente se coloca en un crisol, sometiéndose a calcinación durante 4 horas a  $450^{\circ}C$  y permitiendo que el material se enfríe en la misma mufla. El siguiente esquema muestra de manera general lo descrito anteriormente.



**FIGURA 8:** Diagrama general de síntesis sol-gel de  $\text{TiO}_2$



**FIGURA 9:** Reactor de microondas marca Anton Paar modelo Synthos.

### 5.1.2. Síntesis Hidrotérmica de $\text{TiO}_2$

Se disuelve la sal precursora de propóxido de titanio en 10 ml de agua, calentando a una temperatura de  $60^\circ\text{C}$ , con agitación constante hasta su disolución completa, posteriormente se transfiere al reactor con 10 ml de Hidróxido de Sodio. Cerrar el reactor herméticamente y llevar a la estufa a una temperatura de  $180^\circ\text{C}$  durante 48 horas. Posteriormente sacar y dejar atemperar para lavar con agua el vaso de precipitado hasta un pH neutro. Posteriormente se seca de 12 a 24 horas a una temperatura entre  $100$  y  $120^\circ\text{C}$ ; el polvo es macerado suavemente y tamizado, posteriormente se coloca en un crisol, sometiéndose a calcinación durante 4 horas a  $350^\circ\text{C}$  y permitiendo que el material se enfríe en la misma mufla.



**FIGURA 10:** Diagrama general de síntesis hidrotérmica de  $TiO_2$ .

### 5.1.3. Impregnación de nanopartículas de plata en $TiO_2$

Se Disuelve la sal de Nitrato de Plata en agua destilada su homogenización, en otro vaso de precipitado, el  $TiO_2$  se llevará a baño maría a una temperatura de  $70^{\circ}C$ . Posteriormente agregar gota a gota la solución de Nitrato de Plata manteniendo húmedo el  $TiO_2$  en agitación constante, al momento de terminar la solución de Nitrato de Plata, mantener en humedad constante con agua destilada durante 2 horas y con agitación constante y de forma homogénea para mantener una impregnación total. Pasadas las dos horas después de formado el gel, secar en estufa a  $100-120^{\circ}C$ , macerar suavemente y llevar a sinterizar a la mufla a  $350^{\circ}C$  por 2 horas, atemperar el crisol y el polvo obtenido será reducido con gas de Hidrogeno por tres horas a una temperatura de  $400^{\circ}C$ .



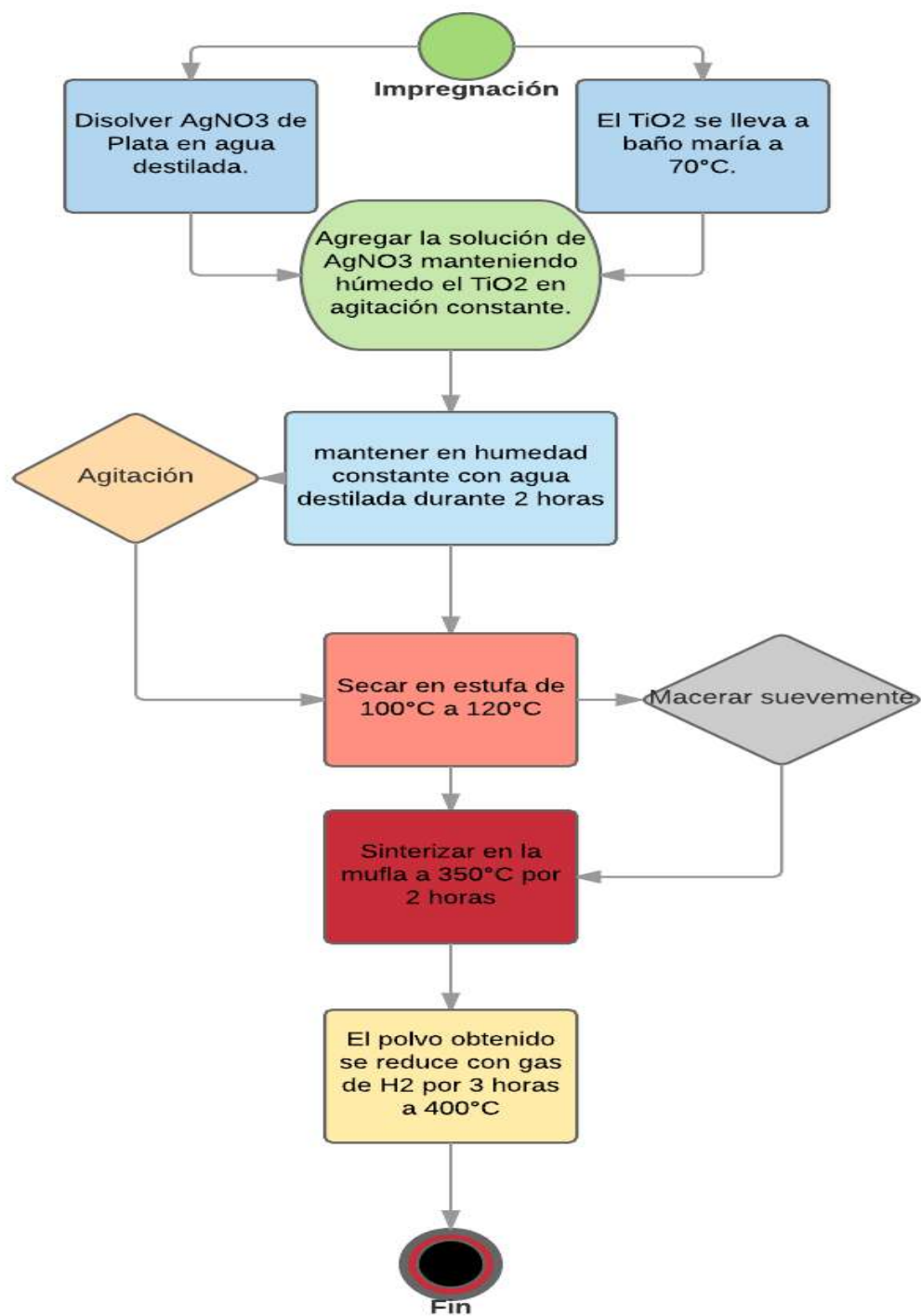


FIGURA 11: Diagrama de Impregnación de nanopartículas de plata sobre  $TiO_2$

## 5.2. Caracterización de los Materiales

Para comprobar la efectividad de las síntesis empleadas en los materiales, así como la técnica de impregnación, es necesario también usar métodos de caracterización de los materiales, en los que se encuentra la microscopía electrónica de barrido y difracción de rayos X, que fueron los métodos a los que se sometió el material.

### 5.2.1. Microscopía Electrónica de Barrido

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

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



**FIGURA 12:** *Microscopio Electrónico de Barrido JSM-6400 JEOL Noran Instruments.*

## 5.2.2 Difracción de Rayos X

Las estructuras cristalinas poseen planos, producidos por ordenamientos repetitivos de átomos, estos son capaces de difractar rayos-X; William Bragg, físico inglés, desarrolló una explicación para esto: Cuando un haz de rayos-X incide con un ángulo  $\theta$  en una estructura ordenada, para que estas ondas reflejadas estén en concordancia de fase, y por tanto den lugar a una interferencia constructiva, es necesario que la diferencia de camino recorrido de las dos reflexiones sea múltiplo entero de la longitud de onda del haz incidente. Estas observaciones se traducen matemáticamente en la ecuación:

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

Donde  $d$  es la distancia interplanar,  $n$  un número entero que representa el orden de difracción y  $\lambda$  la longitud de onda de la fuente de rayos-X. Los sólidos que poseen suficiente orden periódico son cristalinos y por tanto dan lugar a patrones de difracción definidos. Las distancias entre los diferentes planos que definen la red cristalina determinan el valor del ángulo de Bragg, cuya posición se considera como “huella única” del sólido ordenado. De este modo, los patrones de difracción

suministran información inequívoca de la estructura cristalina. La posición angular de los máximos de difracción se relaciona con los parámetros de la celda unidad mientras que las intensidades reflejan la simetría de la red y la densidad electrónica dentro de la celda unidad. Esta caracterización se hizo en un equipo de difracción de rayos-X marca SIEMENS modelo D-500 usando radiación CuK $\alpha$  ( $\lambda = 1.54$  nm).

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



*FIGURA 13: Equipo de difracción de rayos x SIEMENS modelo D-500*

### 5.3. Preparación de Material Antibacterial

Para garantizar el desempeño del material es necesario someter nuestros materiales a prueba en un ambiente abundante de bacterias con distintos métodos

### 5.3.1. Preparación de caldos nutritivos

*Caldo soya tripticaseína:* Se preparó según indicaciones del fabricante. Después de esterilizar el caldo en autoclave, éste se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente en forma estéril bajo campana de flujo laminar horizontal (Lumistell LH-120). Posteriormente se agregaron 10 ml de caldo en tubos de ensaye con tapa roscada, en condiciones asépticas

*Caldo de Müller-Hinton:* Se preparó siguiendo las indicaciones del fabricante y suplementado con  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$  ajustando a una concentración final de 25 mg de Ca/L y 12.5 mg de Mg/L de caldo.

### 5.3.2. Preparación de Placas con Agar

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

### 5.3.3. Preparación de cepa bacteriana

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

### 5.3.4 Pruebas de pureza

Para verificar pureza de la cepa de *E. coli* se realizó una coloración de Gram. 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. Posteriormente, se les trató con un colorante de contraste donde únicamente las bacterias gram-negativas se tiñeron.

### 5.3.5. Preparación de los inóculos

Se tomaron tres colonias aisladas de cepas del mismo tipo mantenidas en cuñas de agar soya tripticaseína, se hicieron crecer en tubos con 5 ml de caldo de soya tripticaseína a 37 °C hasta alcanzar su turbidez estándar (0.7 a 0.8 de densidad óptica). Esta suspensión contiene aproximadamente  $1 \times 10^8$  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.

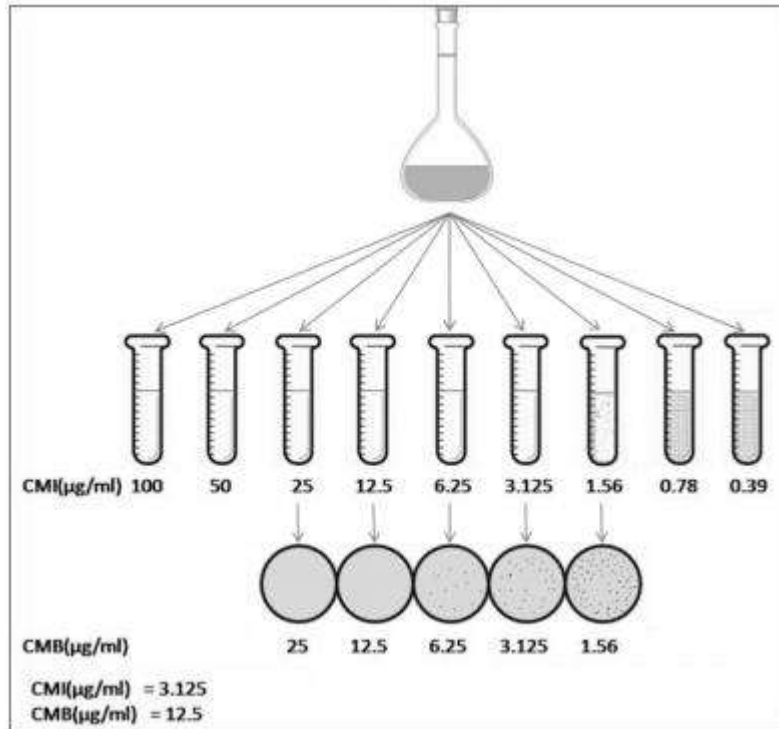
## 5.4. Disoluciones

La capacidad bactericida de los materiales se verifica mediante la técnica de ensayo de dilución en caldo Müller-Hinton y la técnica de disolución en agar, la primera de ellas proporciona información preliminar acerca de la actividad antimicrobiana, la segunda técnica se llevó a cabo de acuerdo con el manual de procedimientos para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos en bacterias aisladas.

### 5.4.1. Disolución en caldo

Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria, se realizaron diluciones seriadas 1/10 de material en caldo Müller-Hinton. Se emplearon dos controles: el primero fue el control positivo (caldo Müller-Hinton al que se añadió la suspensión bacteriana) y el segundo fue el control negativo (caldo Müller-Hinton sin antimicrobiano y sin suspensión bacteriana). Los tubos fueron inoculados con una cantidad calibrada de los microorganismos y los materiales bactericidas, estos se incubaron por 24 horas a una temperatura de 37 °C. 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 Müller-Hinton, para determinar la concentración mínima bactericida.

Para determinar la concentración mínima bactericida se extrajeron 100 µL de los tubos en los cuales no se observó crecimiento visible de la bacteria; estas suspensiones fueron inoculadas en placas Petri con agar Müller-Hinton debidamente rotuladas con su concentración. 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 14.** Metodología para la determinación de la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida.

#### 5.4.2. Disolución en Agar

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. En cada ensayo se inoculó, una placa sin material bactericida, al comienzo y al final, para determinar viabilidad 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.



## 5.5. Crecimiento de bacterias en presencia de los materiales

Se determinó el crecimiento de la bacteria en presencia de los materiales bactericidas. Para ello, se valoró la capacidad bactericida de los materiales en relación con el tiempo y la concentración promedio. Se inoculó una muestra de 0.5 ml de los sistemas con bacterias *E. coli* en 5 ml de caldo de soya tripticaseína contenido en tubos de ensaye. Se agregó una cantidad de material biocida a cada tubo incubándose a 37 °C con agitación a 30 rpm. Se tomaron muestras a diferentes tiempos (0, 15, 30, 60, 90, 120, 180 y 240 min). Las muestras se sembraron en cajas Petri con 20 ml de agar MacConkey. Una placa se inoculó con cultivo sin material bactericida, al comienzo y al final. Las placas se incubaron invertidas a 37 °C por 24 h en atmósfera aeróbica y se realizó el conteo de colonias.

## 6. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 6.1. Caracterizaciones

Para evitar los costos de distintas caracterizaciones a materiales similares, se debe seleccionar las que evidentemente tienen menor desempeño y descartarlas, es decir, someter los materiales sintetizados a pruebas sencillas para verificar cual método de síntesis cumple mejor su desempeño.

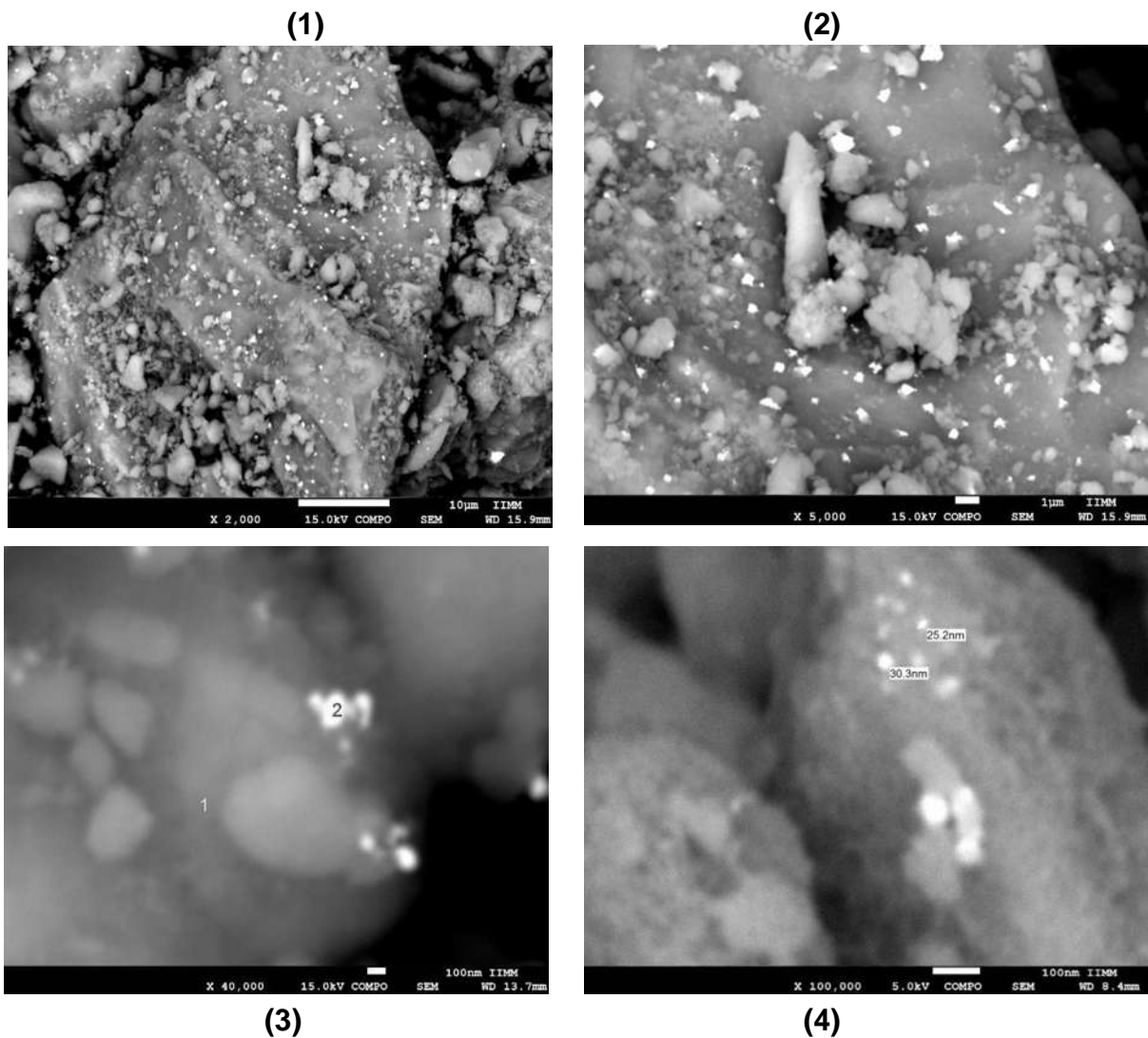
Respecto al  $\text{TiO}_2$  por ambos métodos de síntesis (sol-gel e hidrotérmica), se sometieron a una prueba inhibitoria de bacterias con una impregnación de 0.5% de nanopartículas de plata presentando el material sintetizado por el método sol-gel una concentración mínima inhibitoria de 1/100 mientras que el material sintetizado por el método hidrotérmico una concentración mínima inhibitoria de 1/1000, con esto podemos decir que la difracción por rayos x se llevó a cabo en el material sintetizado por el método sol-gel arrojando resultados de que el 0.5% de nanopartículas de plata es insuficiente para cubrir en su totalidad la superficie del  $\text{TiO}_2$ , esta situación es preocupante debido a que el rendimiento del material se determina por la cantidad de plata en el soporte, la distribución en la superficie, el tamaño de las partículas y la dimensión fractal de las partículas metálicas (Roberto Guerra, 2012) por ello se aumenta al 1.5% para garantizar su inhibición.

Por consecuente se determina solo usar como soporte el material sinterizado por el método sol-gel y aumentar el porcentaje de las nanopartículas de plata a 1.5% dados los resultados y la viabilidad de las primeras pruebas. Estos materiales deberán ser analizados antes de la inhibición y después de la inhibición (recuperación) con y sin rayos UV.

## 6.1.1. Microscopía electrónica de barrido

### 6.1.1.1. Nanopartículas de plata soportadas sobre TiO<sub>2</sub>.

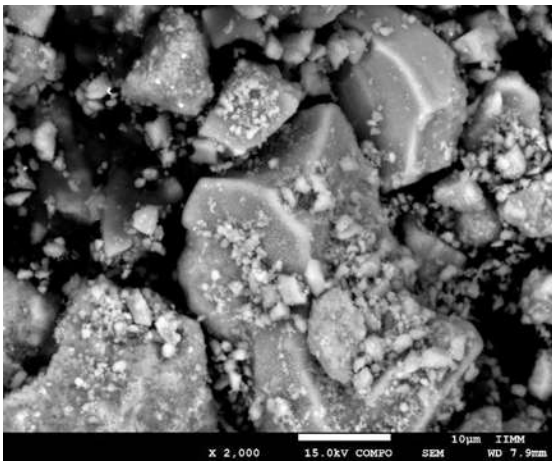
En la figura 15, se presentan las micrografías para las nanopartículas de plata soportadas sobre TiO<sub>2</sub> al 1.5% donde las imágenes corresponden a los aumentos de 2000X, 5000X, 40000X y 100000X. A bajas magnificaciones se aprecia una vista del soporte y las nanopartículas de plata impregnadas uniformemente, donde estas aparecen de forma brillante sobre la superficie. El tamaño de las partículas de plata oscila entre los 25 y 30 nm.



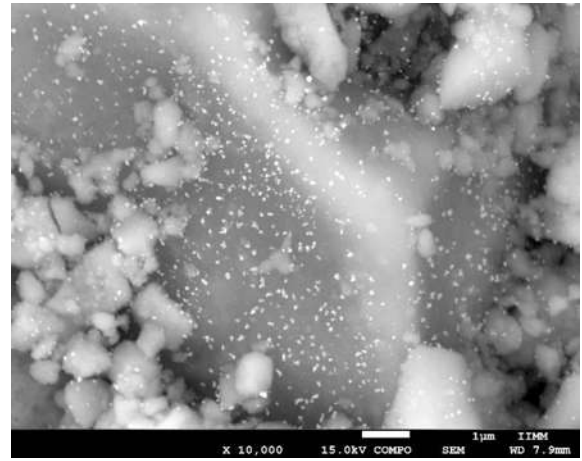
**FIGURA 15:** Micrografías de TiO<sub>2</sub>-Ag (1)2000X, (2)5000X, (3)40000X Y (4)100000X.

### 6.1.1.2 Nanopartículas recuperadas de plata soportadas sobre TiO<sub>2</sub>

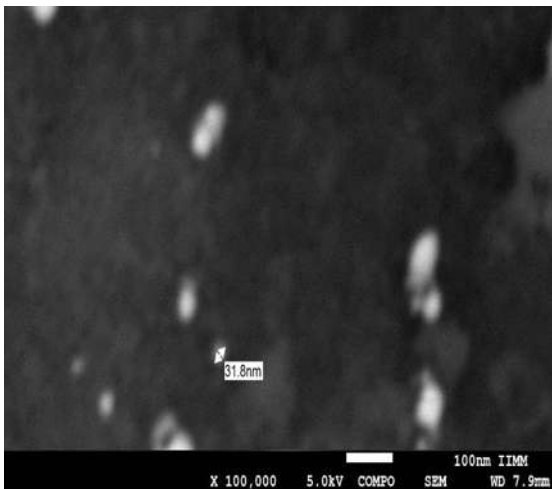
En la figura 16 se presentan las micrografías para las nanopartículas de plata soportadas en TiO<sub>2</sub> al 1.5% recuperado de la prueba de inhibición. Las imágenes corresponden a los aumentos de 2000X, 10000X, y 100000X. Se aprecia una vista del soporte y las nanopartículas de plata impregnadas uniformemente y en este no hay un cambio conformacional del material, Además, podemos observar el tamaño de las partículas de plata que oscilan entre los 30 y 32 nm.



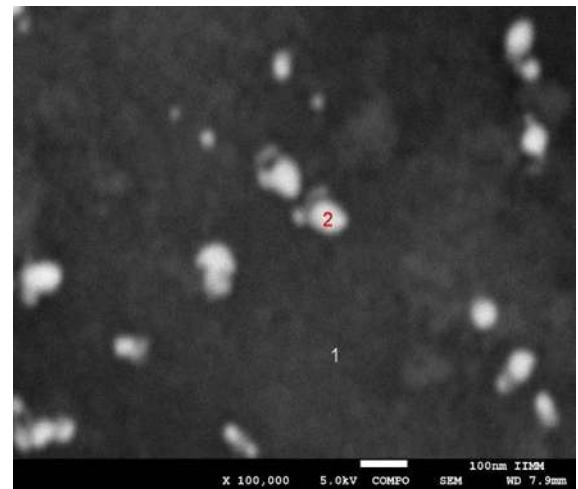
(1)



(2)



(3)

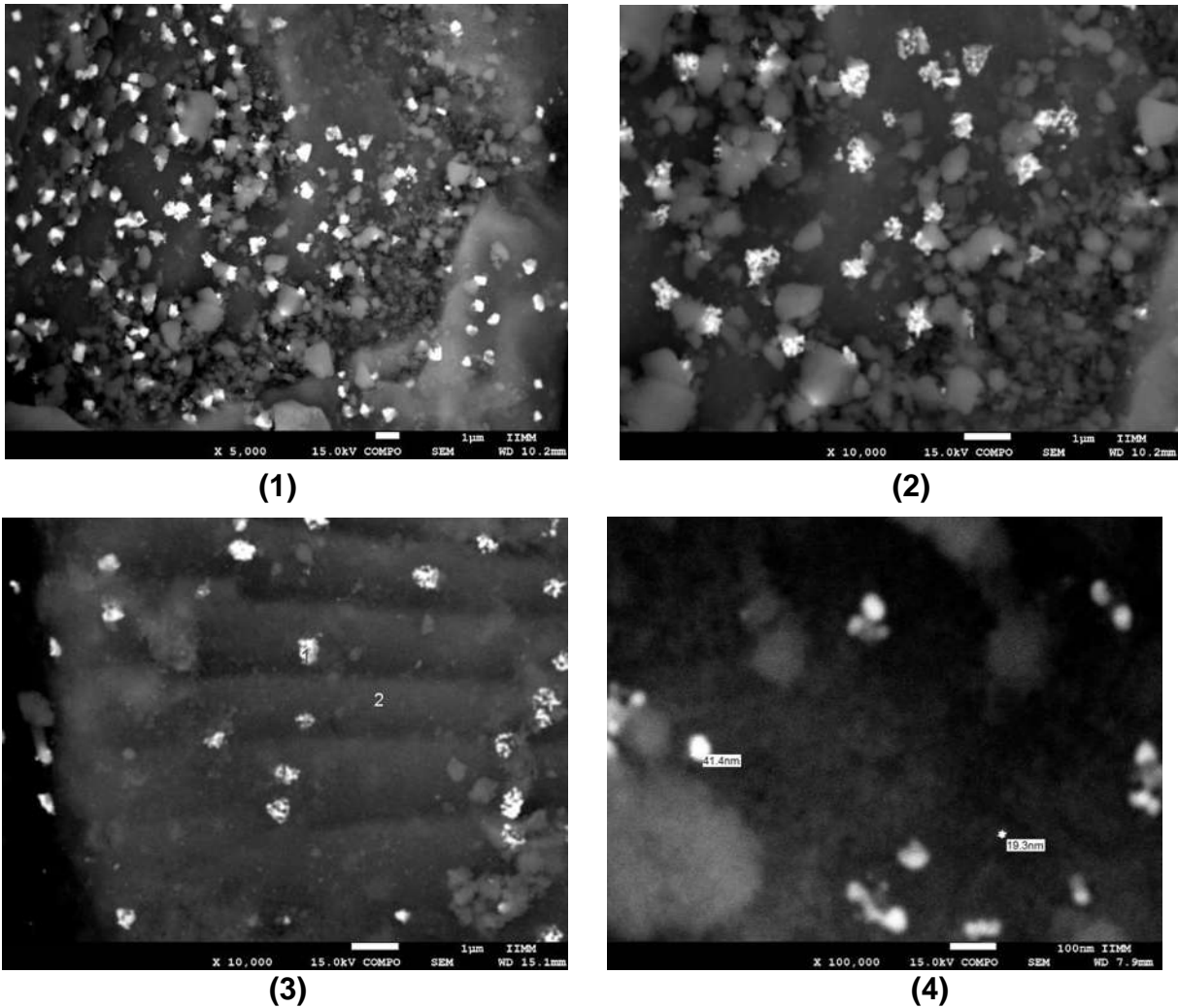


(4)

**FIGURA 16:** Micrografías de TiO<sub>2</sub>-Ag Recuperado (1)2000X, (2)10000X, (3)100000X Y (4)100000X.

### 6.1.1.3 Nanopartículas recuperadas de plata soportadas sobre TiO<sub>2</sub> irradiado con rayos UV.

En la figura 17 se presentan las micrografías para las nanopartículas de plata soportadas en TiO<sub>2</sub> al 1.5% recuperado que fue irradiado con luz UV para la prueba de inhibición. Las imágenes corresponden a los aumentos de 5000X, 10000X, y 100000X. Se aprecia una vista del soporte y las nanopartículas de plata impregnadas uniformemente, donde hay un cambio en las moléculas de plata al verse aglomeradas en forma de triángulos sobre el soporte. Podemos observar el tamaño de las partículas de plata que oscilan entre los 19 y 42 nm aglomeradas.

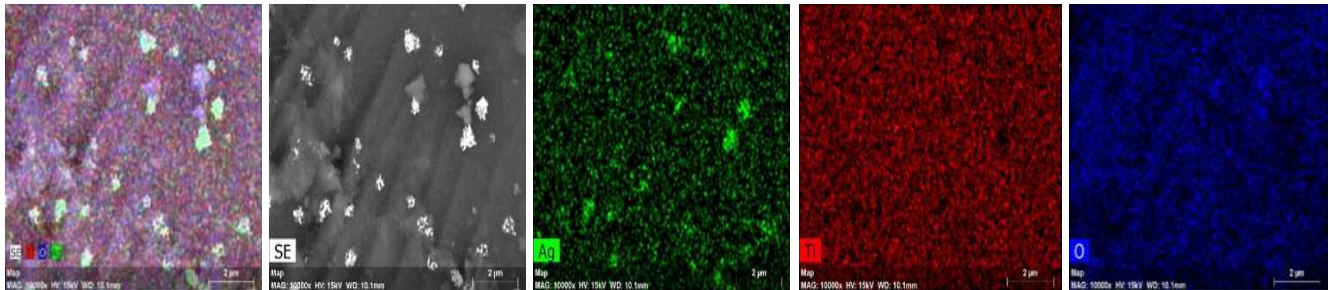


**FIGURA 17:** Micrografías de TiO<sub>2</sub>-Ag con luz UV (1)5000X, (2)10000X, (3)10000X Y (4)100000X.



### 6.1.1.3.1. Mapeo de nanopartículas recuperadas de plata soportadas sobre TiO<sub>2</sub> irradiado con rayos UV.

En la figura 18 se presentan las micrografías de un mapeo para el TiO<sub>2</sub> soportado por nanopartículas de plata al 1.5%, recuperado, que fue irradiado con luz UV para la prueba de inhibición

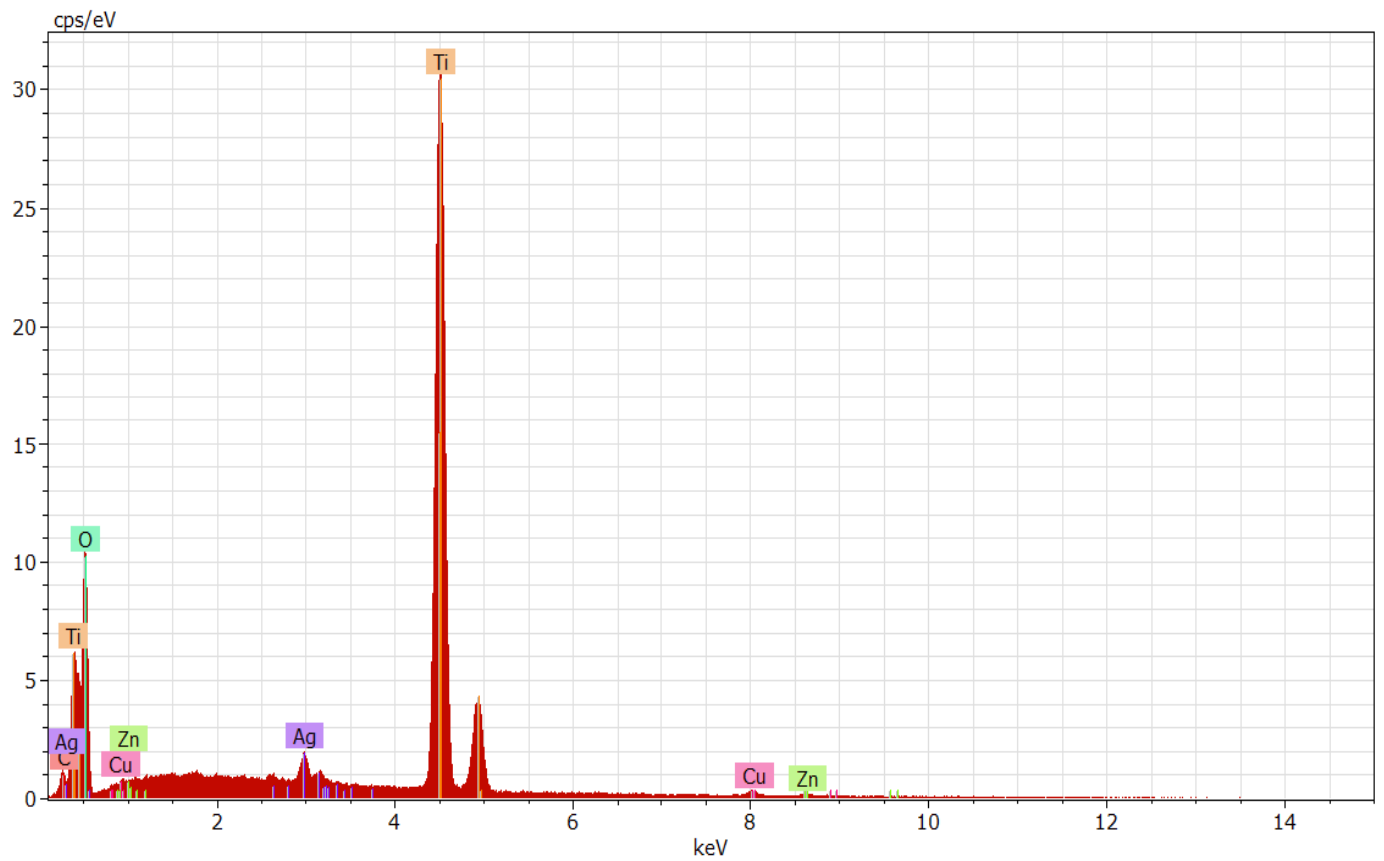


*FIGURA 18: Mapeo de TiO<sub>2</sub>-Ag recuperado irradiado con rayos UV*

### 6.1.2. Espectrómetro dispersivo de energía (EDS).

#### 6.1.2.1. EDS de nanopartículas de plata soportadas en TiO<sub>2</sub>

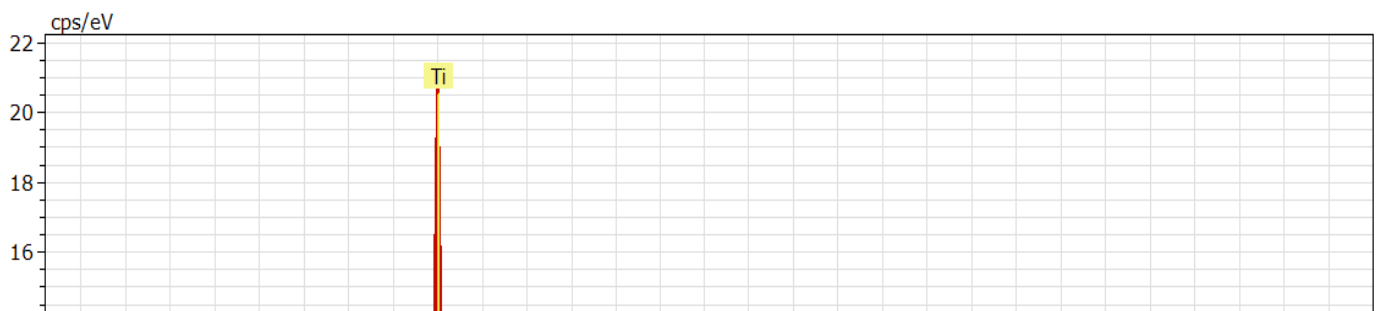
En la figura 19 se muestra el grafico donde observamos los picos con su respectivo componente, nos muestra los picos de los componentes que se encuentran en el material sin mostrar contaminación cruzada



**FIGURA 19:** Graficas de espectro dispersivo de la energía (EDS)  $TiO_2$ -Ag.}

### 6.1.2.2. EDS de nanopartículas de plata soportadas en $TiO_2$ recuperado.

En la figura 20 se muestra el grafico donde podemos observar los picos con su respectivo componente, encontramos partículas de Fosforo y Cobre, sin embargo, estas no afectan la capacidad inhibitoria del material.

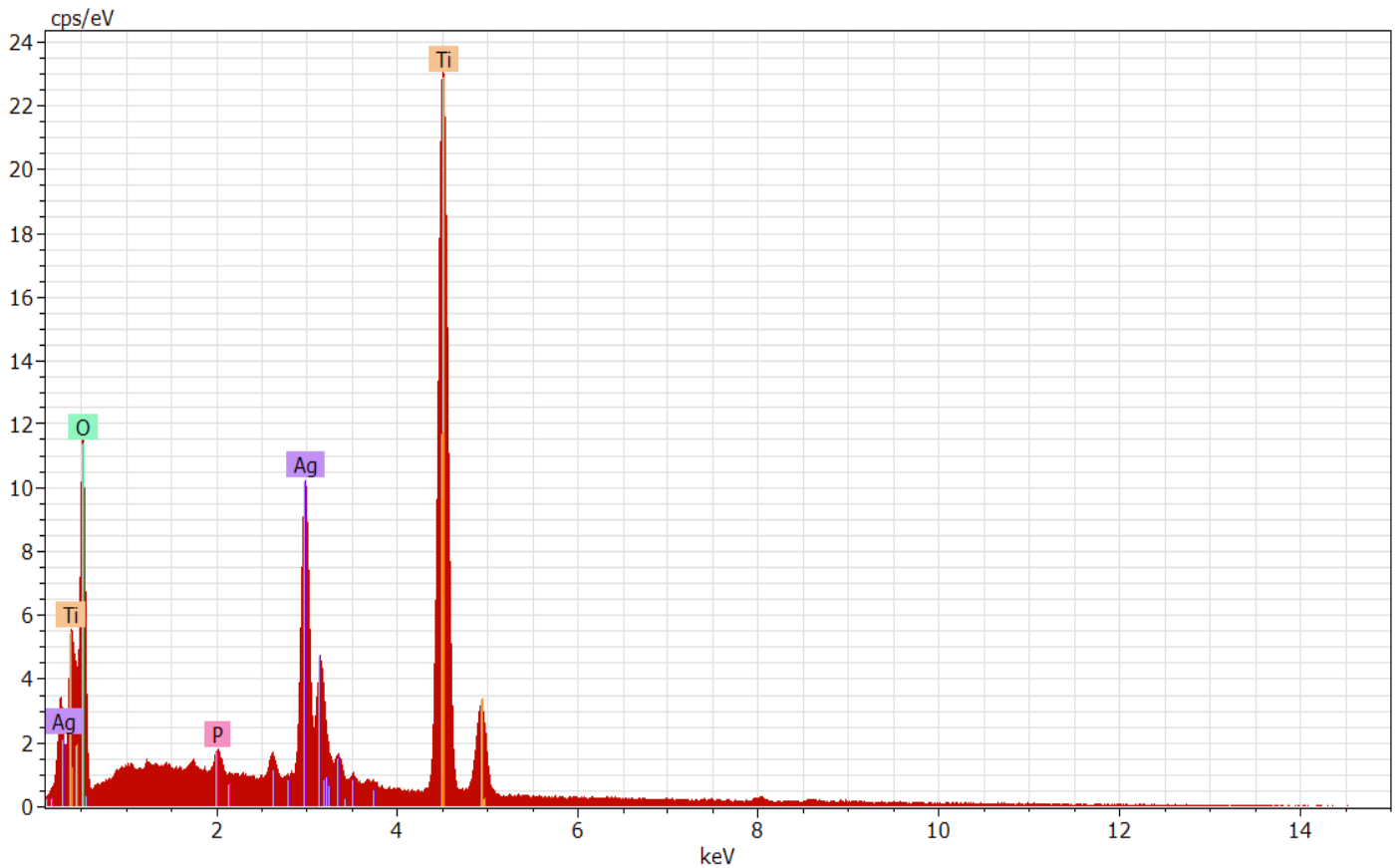


**FIGURA 20:** *Graficas de espectro dispersivo de la energía (EDS) TiO<sub>2</sub>-Ag recuperado.*

#### 6.1.2.3. EDS de nanopartículas de plata soportadas en TiO<sub>2</sub> recuperado irradiado con rayos UV.

En la figura 21 se muestra el grafico donde podemos observar los picos con su respectivo componente, nos muestran los elementos encontrados en el material, igual que el material anterior se encontró Fosforo sin afectar el crecimiento de la bacteria.



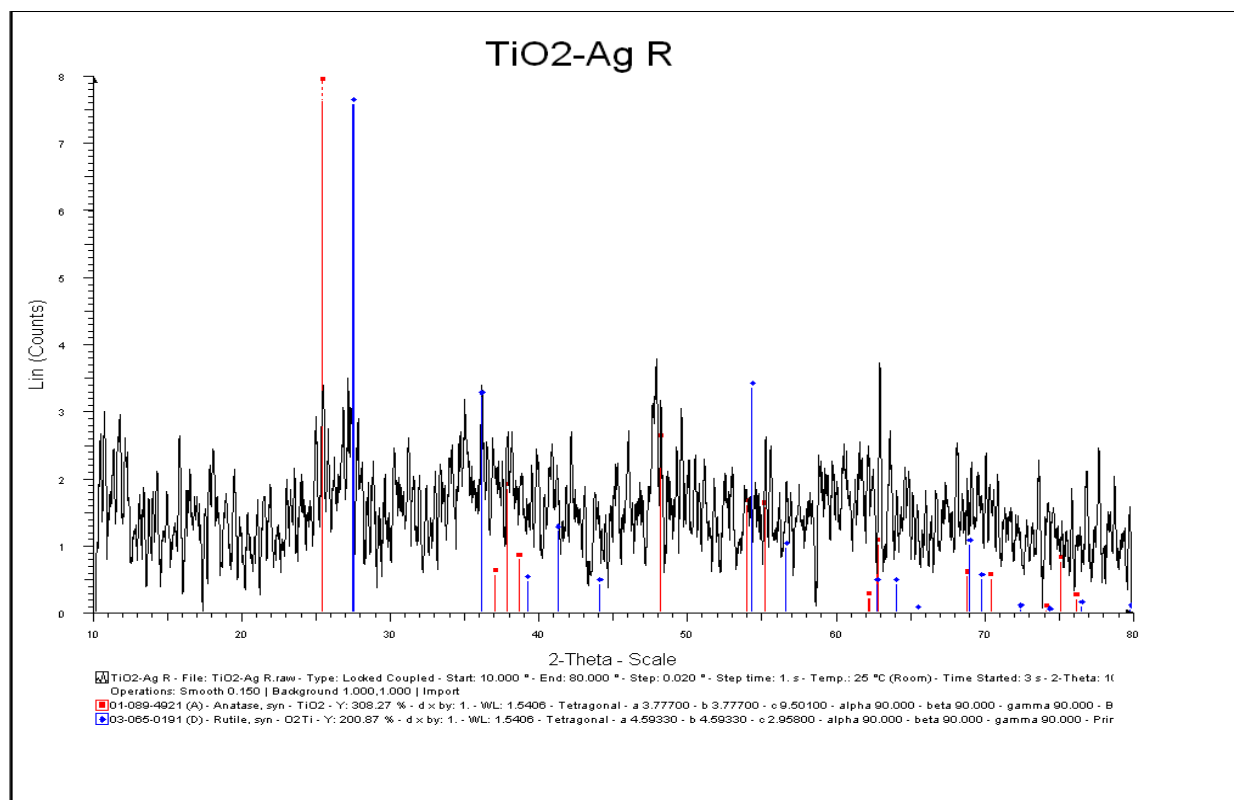


**FIGURA 21:** Graficas de espectro dispersivo de la energía (EDS)  $TiO_2$ -Ag recuperado irradiado con rayos UV.

### 6.1.3. Difracción con rayos X.

#### 6.1.3.1. Difracción de rayos x de nanopartículas de plata soportadas por $TiO_2$ 0.5% método sol-gel.

Se identifica al  $TiO_2$  en fase anatasa y en menor proporción al rutilo y que la plata demostrando que no es suficiente concentración para inhibir a la bacteria.

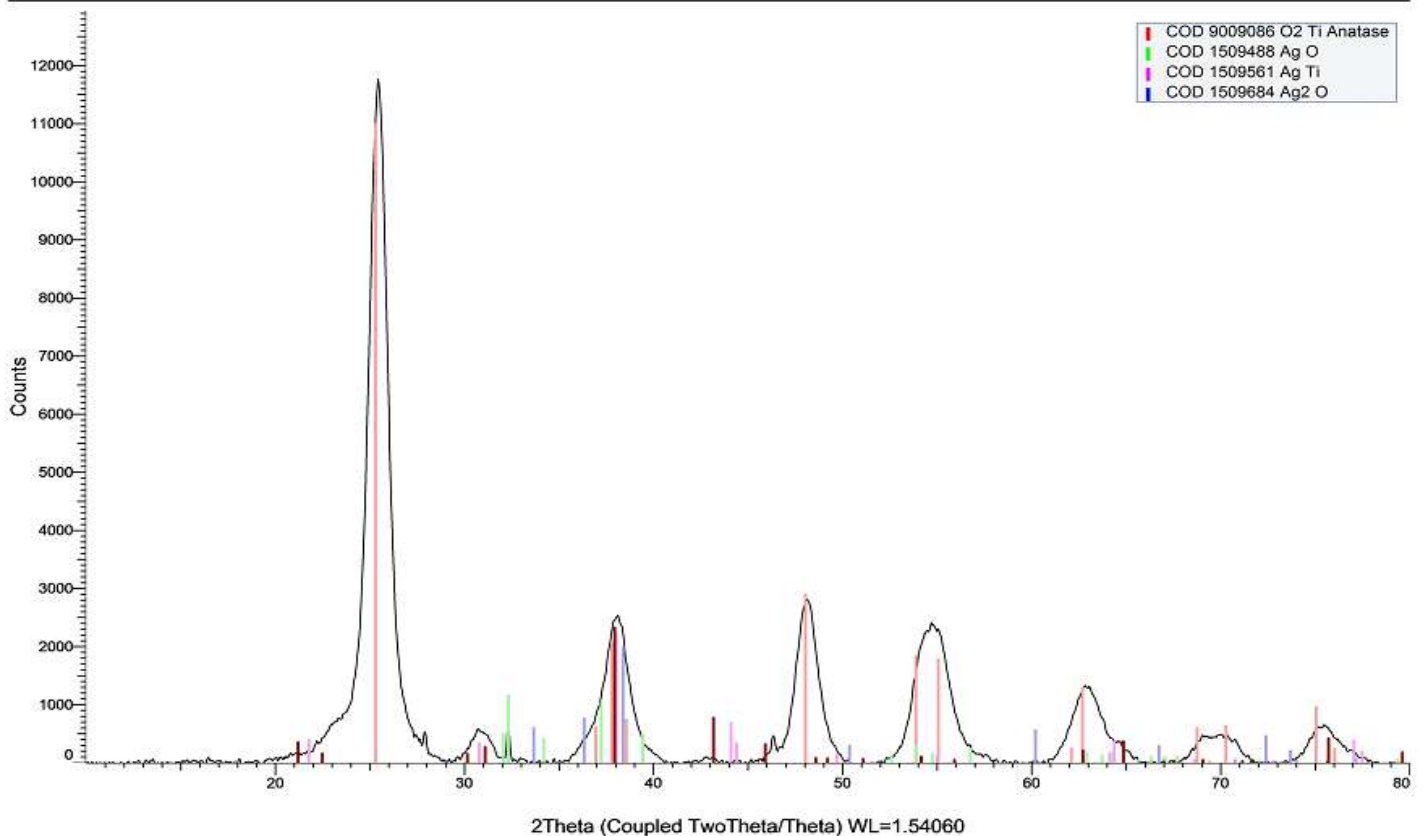


**FIGURA 22:** Graficas de difracción de rayos x sobre TiO<sub>2</sub>-Ag al 0.5% sintetizado por el método sol-gel.

### 6.1.3.2. Difracción de rayos x sobre nanopartículas de plata soportadas por TiO<sub>2</sub> 1.5% método sol-gel.

Se identifica al TiO<sub>2</sub> en fase anatasa y la plata queda indicada en el valor 2 theta = 38 grados demostrando que la concentración fue suficiente para inhibir a la bacteria conforme a las pruebas inhibitorias.

## Commander Sample ID (Coupled TwoTheta/Theta)



**FIGURA 23:** Graficas de difracción de rayos x sobre  $TiO_2$ -Ag al 1.5% sintetizado por el método sol-gel.

## 6.2. Evaluación antibacterial.






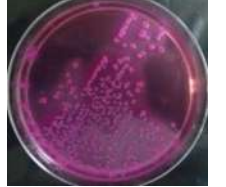
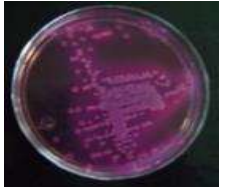






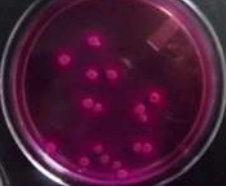










Se decidió utilizar el método de dilución en caldo. Como ya se mencionó en los antecedentes, el método de dilución en caldo se utiliza para determinar tanto la concentración mínima bactericida (CMB) como la concentración mínima inhibitoria (CMI). Definiendo como CMI la concentración más baja que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de incubar por 24 horas; y CMB como la concentración más baja que puede prevenir el crecimiento de un microorganismo después de subcultivar en un medio libre del compuesto evaluado. Los materiales en esta investigación pueden modificarse al ser usados y perder sus

propiedades antibacteriales. Resulta entonces interesante analizar los resultados de las pruebas antibacteriales de los materiales posterior a la prueba de dilución en caldo, esto para saber si sus propiedades se conservaron, se potenciaron o desaparecieron. De igual forma, se procedió a irradiar los materiales con energía UV antes de ponerse en contacto con la bacteria, y analizado para observar sus propiedades durante a la prueba de dilución en caldo y al final de la inhibición.

### 6.2.1. Evaluación del $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ al 1.5 % sobre bacterias de *Escherichia coli* con y sin presencia de luz UV.

En la Tabla 1 se observa el efecto inhibitorio en placa microbiana de las bacterias de *Escherichia coli* expuestas al material de nanopartículas de plata soportadas en  $\text{TiO}_2$ .

En la tabla 2 se muestran los valores en el conteo de colonias con respecto al tiempo de acción de las nanopartículas de plata soportadas en  $\text{TiO}_2$  al 1.5% contra las cepas de *Escherichia coli* utilizando el método de dilución y siembra en agar para cada uno de los tiempos de exposición.

TIEMPO (min)	PATRON	TiO <sub>2</sub> -Ag	TiO <sub>2</sub> -Ag UV
<b>0</b>			
<b>15</b>			
<b>30</b>			
<b>60</b>			
<b>90</b>			
<b>120</b>			
<b>180</b>			
<b>240</b>			

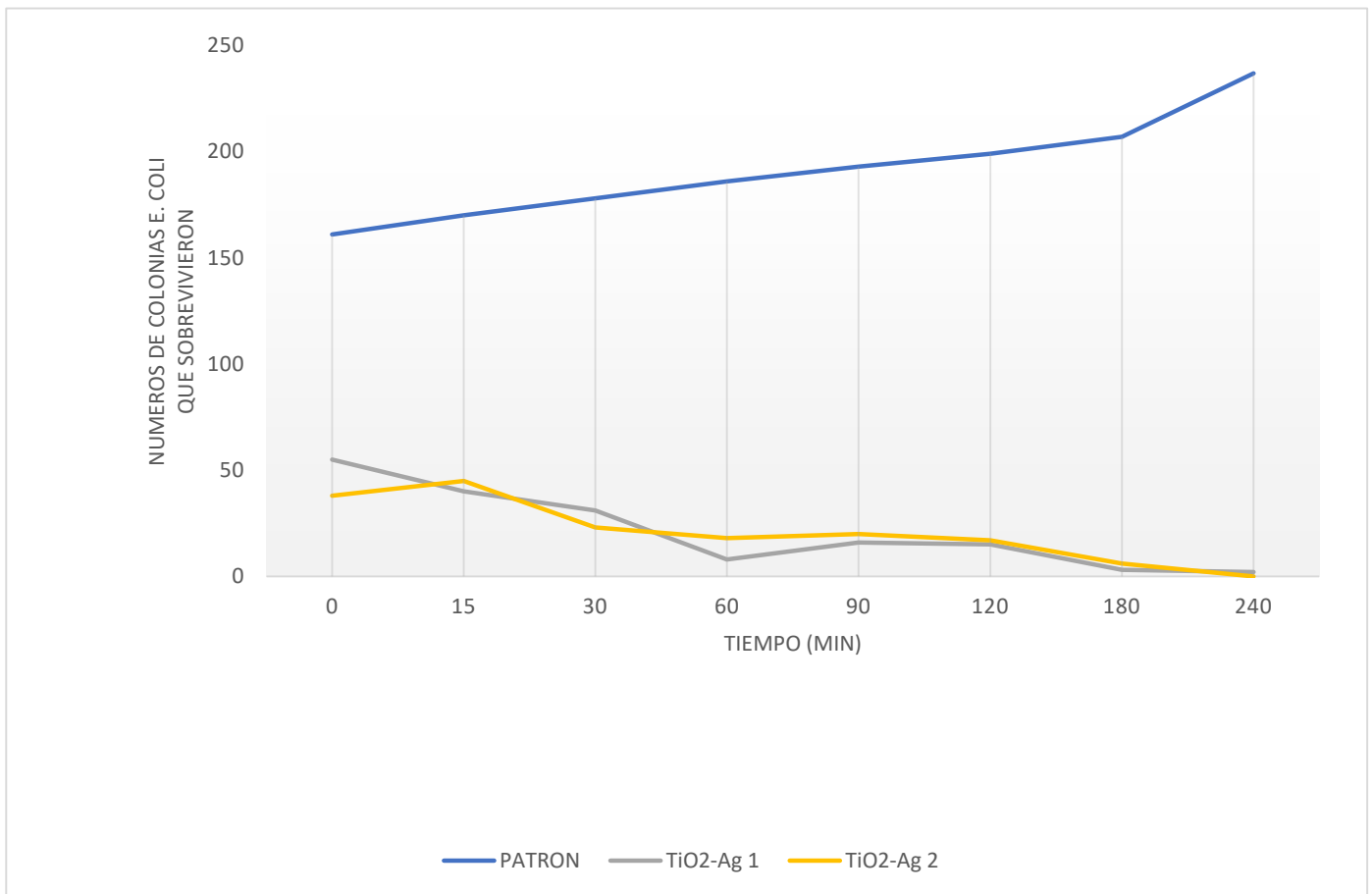
*TABLA 1: inhibición de colonias por cada prueba (duplicada).*

MATERIAL	TIEMPO (min)							
	0	15	30	60	90	120	180	240
PATRON	161	170	178	186	193	199	207	237
TiO <sub>2</sub> -Ag 1	55	40	31	8	16	15	3	2
TiO <sub>2</sub> -Ag 2	38	45	23	18	20	17	6	0
TiO <sub>2</sub> -Ag UV 1	250	200	104	5	0	0	0	0
TiO <sub>2</sub> -Ag UV 2	220	180	30	8	0	0	0	0

*TABLA 2: Numero de colonias contadas por cada prueba (duplicada).*

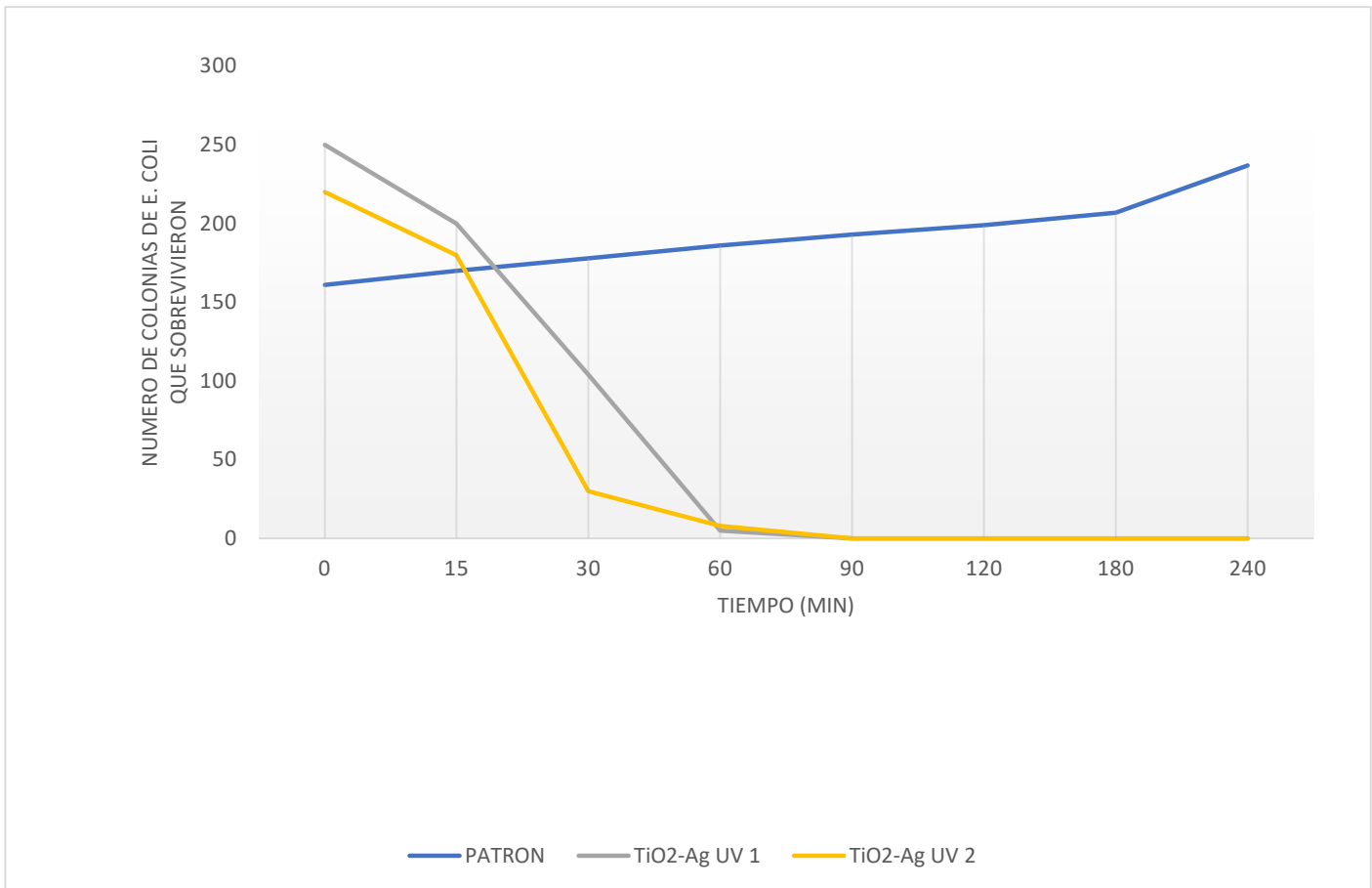
El crecimiento microbiano y el conteo de colonias de las cepas de Escherichia coli en presencia del material bactericida, se observó teniendo en cuenta el número de colonias iniciales en la suspensión de microorganismos inoculados y las colonias crecidas o eliminadas, en el transcurso del tiempo de exposición de 0, 30, 60, 90, 120, 180 y 240 minutos, así como la valoración del efecto bactericida del material sin irradiar e irradiado. Las pruebas se realizaron por duplicado en placas con agar McConkey. Estas pruebas permitieron definir el momento en el que el agente biocida actúa sobre el ciclo de replicación bacteriano.

En la figura 24 se observa que los materiales impregnados de plata son bactericidas para la bacteria de Escherichia coli. Las curvas control demostraron que con la presencia de las nanopartículas de plata existe inhibición bacteriana corroborando que el material de TiO<sub>2</sub>-Ag sin presencia de luz UV tiene efecto sobre la bacteria.



**FIGURA 24:** Efecto inhibitorio del TiO<sub>2</sub>-Ag sobre crecimiento de *E. coli*.

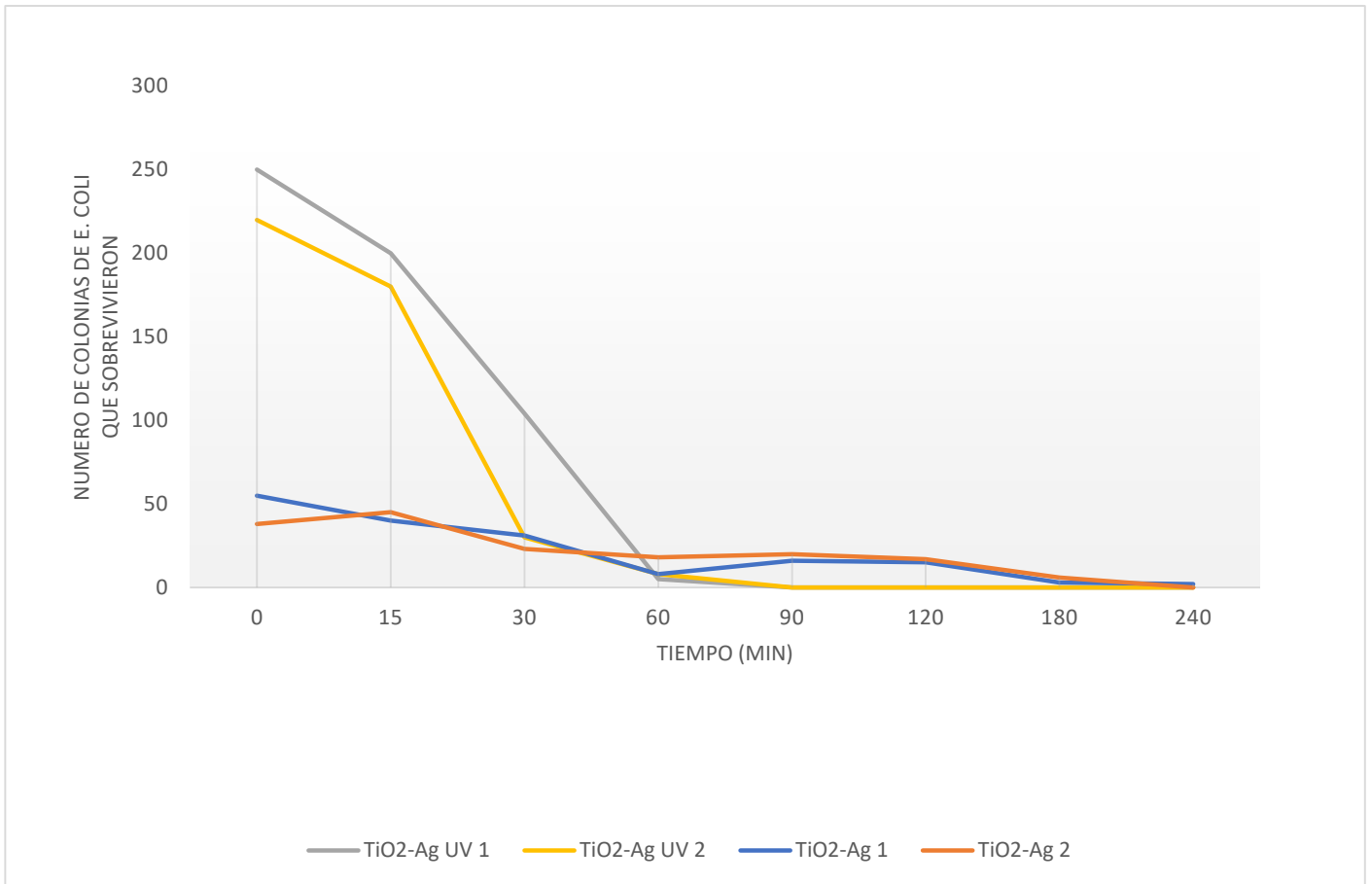
En la Figura 25 se observa que los materiales impregnados de plata e irradiados con luz UV son bactericidas en periodo más corto para la bacteria de *Escherichia coli*. Las curvas demostraron que con la presencia de las nanopartículas de plata y radiación UV existe inhibición bacteriana corroborando que el material TiO<sub>2</sub> en presencia de luz UV tiene efecto bactericida sobre la bacteria.



**FIGURA 25:** Efecto inhibitorio del TiO<sub>2</sub>-Ag irradiado con rayos UV sobre crecimiento de E. coli.

En la Figura 26 observamos que los materiales irradiados con luz UV, tienen mejores efectos bactericidas para la bacteria de Escherichia coli en un menor tiempo corroborando que el material de TiO<sub>2</sub> con presencia de luz UV tiene efectos bactericidas sobre la bacteria, demostrando que se puede irradiar antes de poner en contacto con la bacteria, evitando así exponer a la bacteria a los rayos UV que también tienen un efecto bactericida.



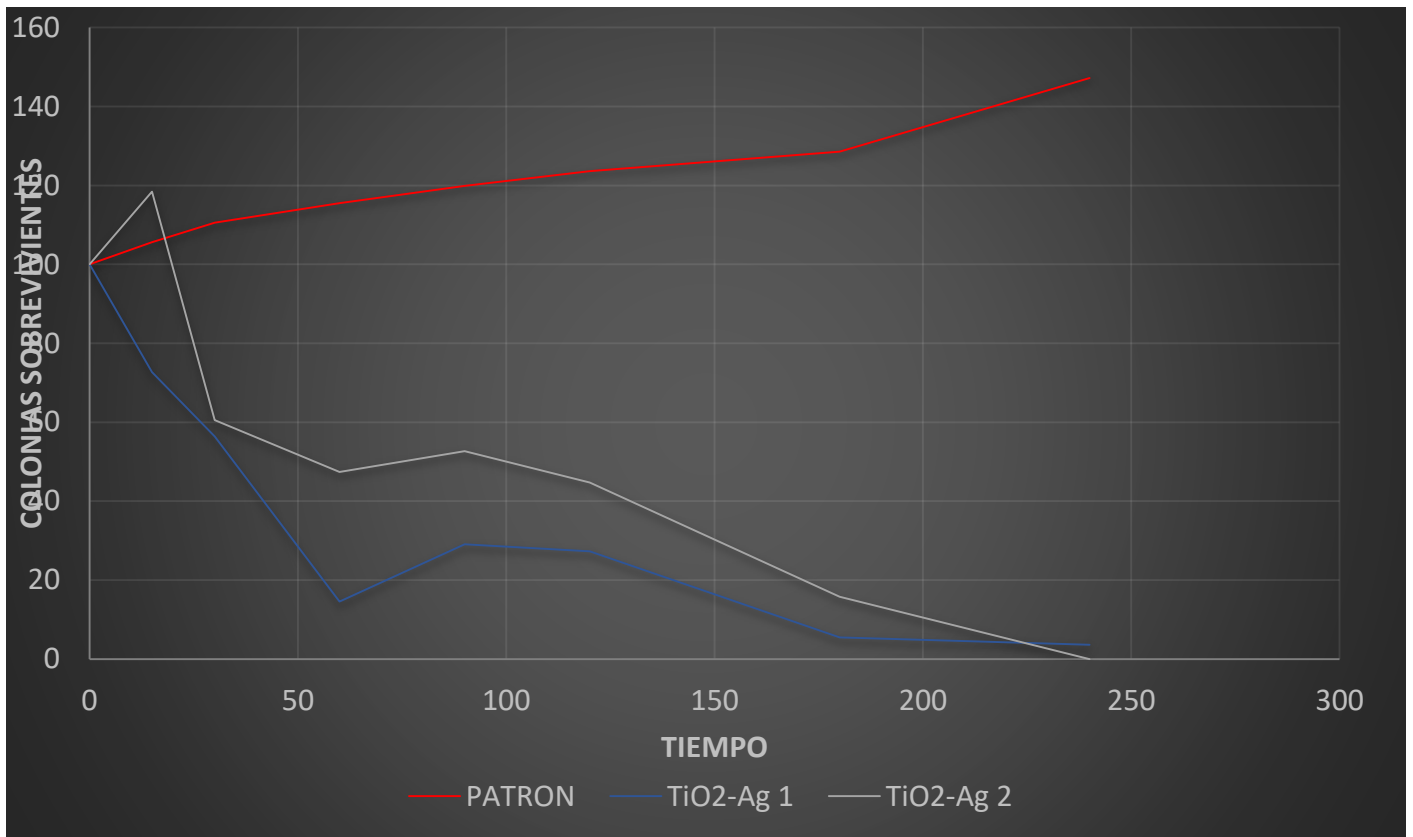


**FIGURA 26.** Comparación del efecto inhibitorio de los materiales sobre crecimiento de *E. coli*.

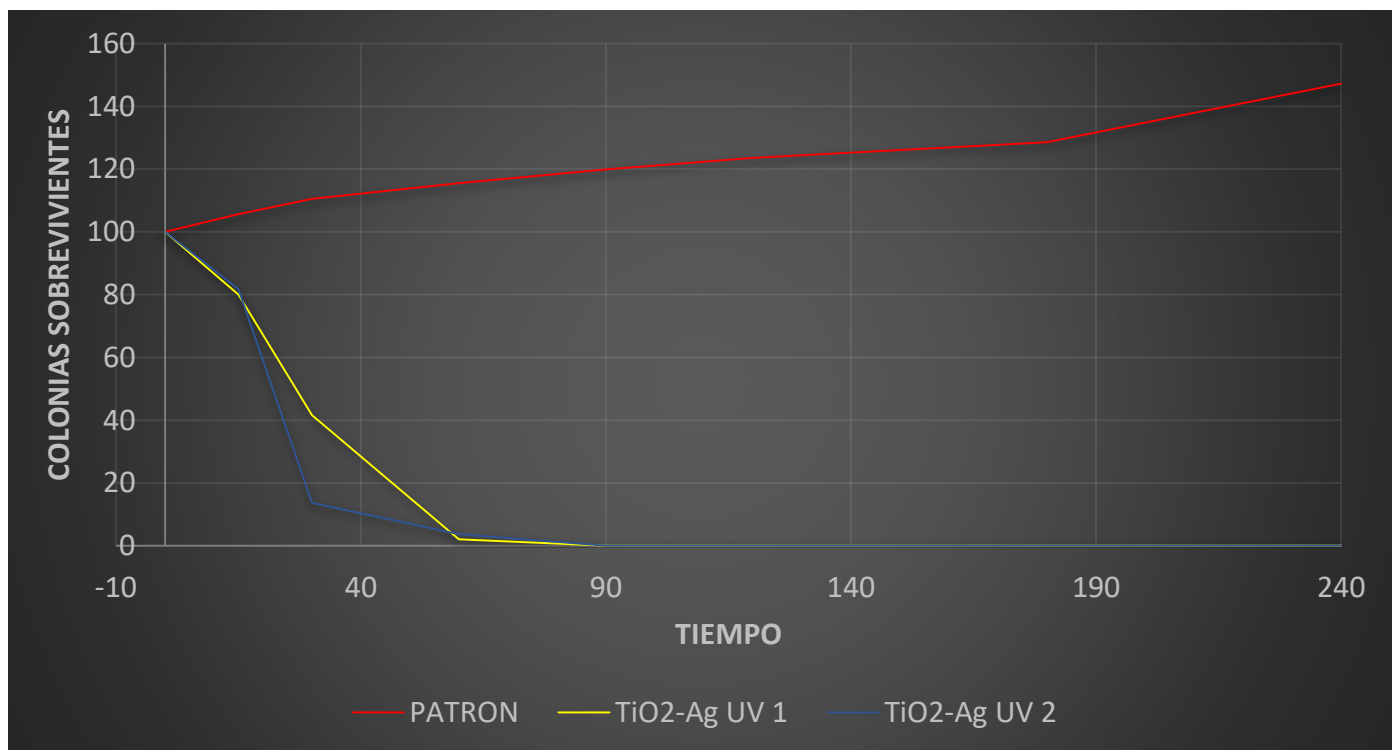
Dado que los datos mostrados anteriormente no muestran una comparación efectiva de los datos, ya que estos parten de puntos completamente diferentes, se realizó un ajuste donde se partió de un 100% de bacterias y consecutivamente la inhibición de estas, dando resultados mas accesibles a la hora de graficar y comparar.

MATERIAL	TIEMPO (min)							
	0	15	30	60	90	120	180	240
PATRON	100	106	111	115	120	124	129	147
TiO <sub>2</sub> -Ag 1	100	73	56	15	29	27	6	4
TiO <sub>2</sub> -Ag 2	100	118	60	47	53	45	16	0
TiO <sub>2</sub> -Ag UV 1	100	80	42	2	0	0	0	0
TiO <sub>2</sub> -Ag UV 2	100	82	14	4	0	0	0	0

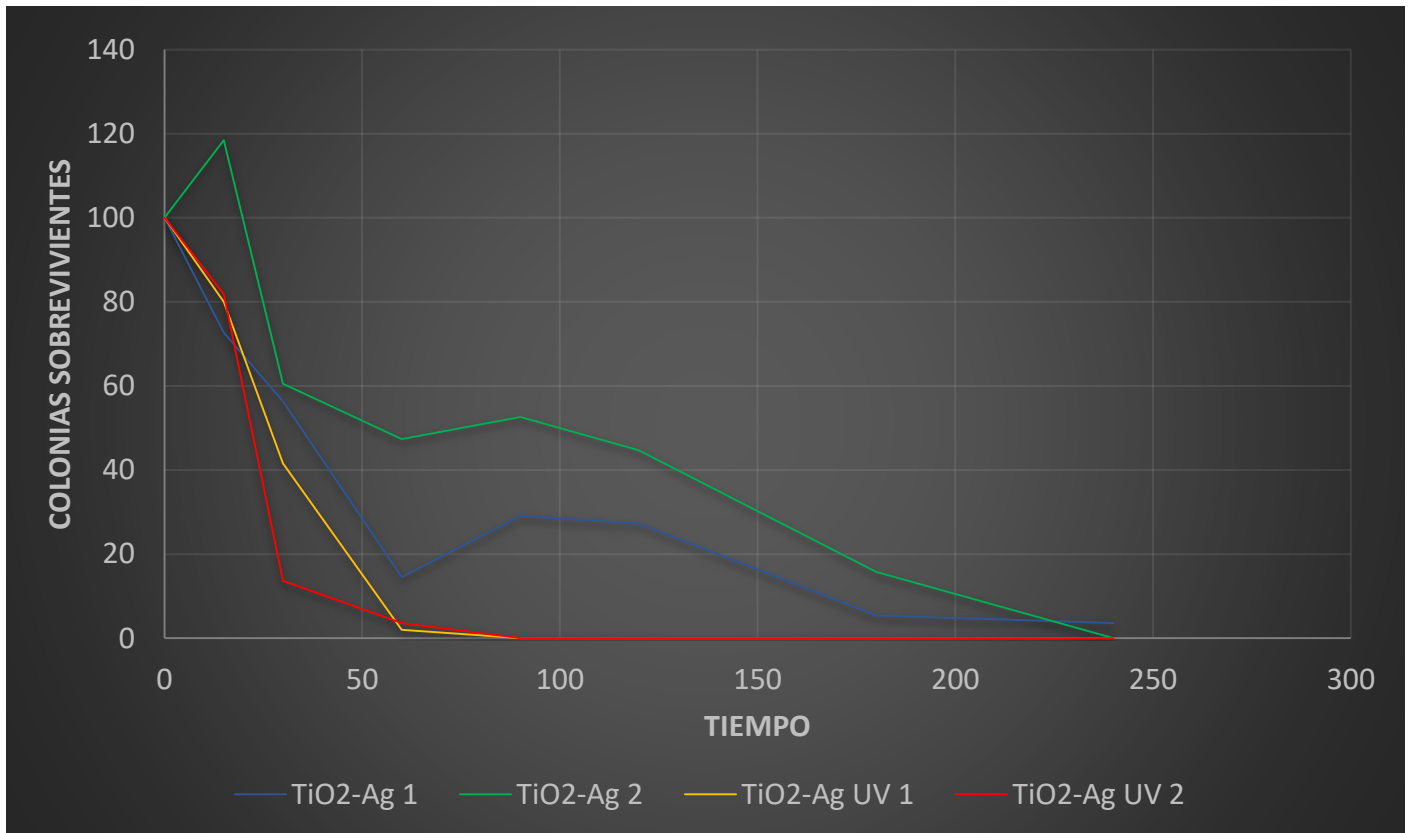
*TABLA 3: Porcentaje de colonias por cada prueba.*



**FIGURA 27:** Efecto inhibitorio del TiO<sub>2</sub>-Ag sobre crecimiento de *E. coli* (Porcentaje)



**FIGURA 28:** Efecto inhibitorio del TiO<sub>2</sub>-Ag irradiado con rayos UV sobre crecimiento de *E. coli* (Porcentaje).



**FIGURA 29:** Comparación del efecto inhibitorio de los materiales sobre crecimiento de *E. coli* (Porcentaje).

## 7. CONCLUSIONES

- El material sintetizado irradiado con luz ultravioleta dio buenos resultados en la inhibición de la bacteria E. Coli, esto es debido a que la luz UV activó las nanopartículas de plata.
- Los resultados muestran que efectivamente el material irradiado eliminó la bacteria E. coli en 90 minutos, un tiempo menor al material sin radiación que duró 240 minutos, a pesar de contener este un menor número de bacterias.
- Se pudo sintetizar efectivamente el  $\text{TiO}_2$  por ambos métodos, sin embargo, el que muestra menor tiempo de síntesis es el método sol-gel asistido por microondas así también cómo su adecuado soporte con nanopartículas de plata coloidal por el método húmedo incipiente.

## 8. AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por haberme permitido formarme cómo profesionista.
- A la Facultad de Ingeniería química y su cuerpo de académicos por brindarme los conocimientos correspondientes así cómo permitirme estudiar dentro de sus aulas.
- Al profesor Roberto Guerra por la asistencia en la elaboración de esta tesis
- Al personal del Laboratorio de Ingeniería Ambiental y de Servicios, de la Facultad de Ingeniería Química, de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Se contó también con la asistencia de los tesisas Erick y Dante de la facultad de Químico farmacobiología.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

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

14. P. C. Lee, D. J. Meisel, "Phys. Chem.", 1982, 86, 3391–3395.
15. J. A. Creighton, C. G. Blatchford, M. G. Albrecht, J. Chem. "Soc. Farad. Trans. II", 1979, 75, 790–798.
16. C. N. Lok, C. M. Ho, R. Chen, Q. Y. He, W. Y. Yu, H. Sun, P. K. H. Tam, J. F. Chiu, C. M. Che, "J. Biol. Inorg. Chem", 2007.
17. X. Chen, H. J. Schluesener, "Toxicol. Lett.", 2007.
18. O. Choi, K. K. Deng, N.-J. Kim, L. Ross, Jr., R. Y. Surampalli, Z. Hu, "Water Res", 2008.
19. Marinas A., Guillard C., Marinas J. M., Fernández-Alba A., Angüera A. y Herrmann J. M. 2001."Photocatalytic degradation of pesticide-acaricide formetanate in aqueous suspension of TiO<sub>2</sub>". Applied Catalysis B: Environmental., 34, 241-252.
20. Jin-Chung, Sze-Mun. 2011 "Degrading Endocrine Disrupting Chemical from Wastewater by TiO<sub>2</sub> photocatalysis: a Review" International Journal of Photoenergy. 2012.
21. Barajas-Ledesma, E; García-Benjume, M L; Espitia-Cabrera, I; Bravo-Patiño, A; Contreras-García, M.E. 2009 "Biocide Activity of TiO<sub>2</sub> Nanostructured Films" Journal of Nano Research. Vol 9, 17-24.
22. Stamate, M; Lazar, G. 2007 "Application of Titanium dioxide photocatalysis to create self-cleaning materials" Romanian technical sciences academy. 13, 280-185.
23. Contreras, R; García, R. 2009 "Degradación fotocatalítica de azul de metileno en aguas residuales utilizando TiO<sub>2</sub> como catalizador" Revista latinoamericana de recursos naturales. 5 (2), 92-97
24. Yu, H; Zheng, X. 2007 "Preparation of Nitrogen -doped TiO<sub>2</sub> nanoparticle catalyst and its catalytic activity under visible light" Chinese journal of chemical engineering. 15, 802-807.
25. Rezaee, A; Pourtaghi, G. 2008 "Photocatalytic decomposition of gaseous toluene by TiO<sub>2</sub> nanoparticles coated on activated carbon" Iran journal of environmental health science and engineering. 4, 305-310.
26. Ao, C; Lee, S. 2004 "Indoor air purification by photocatalyst TiO<sub>2</sub> immobilized on an activated carbon filter installed in air cleaner" Chemical engineering science. 60, 103-109.



27. J.P. M. T. Madigan, J. M. Martinko, Brock Biología de los microorganismos, 10ª edición, Madrid; España, 2004.
28. J.P. Nataro, J.B. Kaper, "Diarrheogenic Escherichia coli.", Clin. Microbiol." Rev. 11(1998) 142.
29. M. en C. Guadalupe Rodríguez-Angeles, "Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli", Salud Publica Mex 2002; 44: 464-475
30. Burda, C; Qiu, X. 2007 "Chemically Synthesized Nitrogen -Doped Metal Oxide Nanoparticles". ChemicalPhysics 339, 1-10.
31. Byrappa, K; Adschiri, T. 2007 "Hydrothermal technology for nanotechnology" Progress in crystal growth and characterization of materials. 53, 117-166.
32. A.W. Bauer, W.M. Kirby, J.C. Sherris, M. Turck, Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method., Am. J. Clin. Pathol. 45 (1966) 493.
33. M07-A9: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition, 2012. 34. H. M Kingston., S. J. Haswell. "Microwave-enhanced Chemistry." American Chemical Society Publication. 1997. 3-20.
35. Adán, D. "Fotocatalizadores nanoestructurados de TiO<sub>2</sub> y Fe-TiO<sub>2</sub> para la degradación de compuestos aromaticos en medio acuoso empleando luz solar" 2008 Instituto de catálisis y Petroquímica. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. España.
36. S. National Committee for Clinical Laboratory, Methodology for the serum bactericidal test. Approved Guideline. Document M21-A, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa, 1999.
37. P.F. McDermott, S.M. Bodeis-Jones, T.R. Fritsche, R.N. Jones, R.D. Walker, Broth microdilution susceptibility testing of Campylobacter jejuni and the determination of quality control ranges for fourteen antimicrobial agents., J. Clin. Microbiol. 43 (2005) 6136.
38. L.D. C. M. Isada, L. K. Bernard, M. P. Goldman, J.A.A. Gray, Infectious Diseases Handbook including Antimicrobial Therapy & Diagnostic Test/Procedures, 5th ed., Lexi Comp, 2001.

- 39.** Enrique Lima, Roberto Guerra, Víctor Lara and Ariel Guzmán; Gold nanoparticles as efficient antimicrobial agents for *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*; Rev. Chemistry Central, 2013.
- 40.** Roberto Guerra, Enrique Lima y Ariel Guzmán; Antimicrobial supported nanoparticles: Gold versus silver for the cases of *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*, 2012
- 41.** Roberto Guerra, Enrique Lima, Margarita Viniegra, Ariel Guzmán, Víctor Lara; Growth of *Escherichia coli* and *Salmonella typhi* inhibited by fractal silver nanoparticles supported on zeolites, 2012.
- 42.** Verónica Janette Cedeño Garcidueñas; Tesis: Estudio de Degradación de Lignina Asistida por Fotosemiconductores  $TiO_2$ ,  $CeO_2$ ,  $Bi_2MoO_6$  y  $Bi_2W_2O_9$  Impurificados con Nitrógeno en Presencia de Energía UV y Visible, 2011.
- 43.** Josué Daniel García Espinoza; Tesis: Síntesis de Estructuras Mesoporosas de  $NyTi_{1-x}CexO_{2-y}$  y su Actividad Fotocatalítica en la Degradación de Lignina, 2012.
- 44.** Carlos Francisco Amasino, Enfermedades infecciosas de los animales y zoonosis, 2017.
- 45.** Julman Rosiris Cermeño Vivas, Josep Torres, Sensibilidad de hongos miceliares dematiáceos a diez antifúngicos empleando un método de difusión enagar, 2001.
- 46.** Guadalupe Rodríguez-Angeles, Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*, 2002
- 47.** Luz Amparo Palacio Santos, Métodos de síntesis de nuevos materiales basados en metales de transición, 2004
- 48.** J. Pérez-Alvarez, L. Escobar-Alarcón, E. Camps, S. Romero, Caracterización de bicapas  $TiO_2/SnO_2$  depositadas por ablación láser para fotocatalisis, 2007.
- 49.** Sofía Estrada Flores, Catalina Pérez Berumen, Tirso E. Flores Guia, Marco A. García Lobato, Antonia Martínez Luévanos, Síntesis por Sol-Gel de partículas de  $TiO_2$  monodispersas y mesoporosas, 2017.
- 50.** Avalos, Haza, Mateo, D y Morales, nanopartículas de plata: aplicaciones y riesgos tóxicos para la salud humana y el medio ambiente, 2013.
- 51.** Tania González Flores, Rafael Antonio Rojas Herrera, Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico, 2005.

- 52.** Rubén Morones Ramírez, El uso de la plata en los antibióticos del futuro, 2009
- 53.** [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/es/](http://www.who.int/water_sanitation_health/es/)
- 54.** Maria Luisa Rojas Cervantes, Diseño y síntesis de materiales “a medida” mediante el método sol-gel, 2015.
- 55.** Jesús Prado-Gonjal, Emilio Morán, Síntesis asistida por microondas de sólidos inorgánicos, 2011.
- 56.** Nada Osseiran, OMS: 2100 millones de personas carecen de agua potable en el hogar y más del doble no disponen de saneamiento seguro, 2017.
- 57.** Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994: "Salud ambiental, agua para uso y consumo humano-límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización".