



**UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA



**INHIBICIÓN DE E. COLI
Y S. TYPHI CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y
ORO SOPORTADAS EN ZEOLITAS SINTÉTICAS.**

TESIS QUE PRESENTA

PIQ. ELOISA GARCÍA BAUTISTA

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO QUÍMICO

ASESOR:

DC. ROBERTO GUERRA GONZÁLEZ

Morelia, Michoacán, a Mayo del 2018.

DEDICATORIA

A mis padres como prueba del eterno agradecimiento que les tendré siempre por el gran apoyo que me han brindado.

Por haber sido capaces de sacrificar gran parte de su vida para formarme, por confiar y apoyar mis decisiones.

A mi padre por tantas horas de trabajo dedicadas para poder solventar mis estudios y a mi madre por tantas noches de preocupación y de desvelo que le he causado pidiendo a Dios por mí y porque sé que nunca podré pagarles tanto que me han dado.

A ellos que fueron capaces de detener su vuelo para que yo emprendiera el mío.

AGRADECIMIENTO

A toda mi familia y principalmente agradezco a mis padres Silvia Bautista Vega y Luis García Castillo, por estar siempre preocupados por mi bienestar y por haberme apoyado en todas y cada una de mis decisiones, principalmente por aquella que tomé a mis 14 años, pues 9 años después aquí están los resultados.

A mi asesor de tesis y gran amigo el Dr. Roberto Guerra González por su paciencia infinita durante todo este proceso, por todo ese tiempo dedicado a mi crecimiento profesional y además personal, pero sobre todo le quiero agradecer por creer en mi aun cuando yo no lo hacía y por siempre asegurarme que este día llegaría.

También a mis hermanos Luis Manuel, Ana Rosa, Mariela, Silvia, Marlene y Alicia, por el apoyo que hasta el día de hoy me han brindado, por siempre estar ahí cuando más los necesitaba alentándome para seguir adelante cada vez que creía que ya no podía.

Quisiera continuar agradeciendo a la familia Verduzco V. que me apoyaron al adoptarme durante mi formación en el bachillerato y a Rodolfo V. por brindarme la oportunidad de conocer un estilo de vida diferente. Al Dr. Luis Ignacio Salcedo Estrada que con poco de conocerme se aseguró de que comenzara mis estudios en esta facultad, al Ing. Luis Germán Castillo Maciel por transmitirme esa gran pasión y amor a la ingeniería. Quiero agradecer al Dr. José Apolinar Cortes por permitirme trabajar a su lado, pues gracias a su ejemplo y dedicación me inspiro para tomar la decisión de titularme por esta modalidad.

A todos mis amigos de la facultad en especial a Isaac Castro que aunque ya no estén cerca aportaron un granito de arena y gracias a su apoyo incondicional culminamos esta maravillosa etapa con éxito.

A por ultimo pero no menos importante, agradezco a Joel Pérez mi gran amigo y compañero, por estar a mi lado todo este tiempo alentándome y exigiéndome siempre lo mejor de mí, gracias...

Y gracias a Dios, por poner a cada una de estas personas en mi vida.

Resumen

Se soportaron partículas de plata u oro en zeolitas sintéticas y se evaluaron como bactericidas de *Escherichia coli* y *Salmonella typhi*. Las variables estudiadas fueron la cantidad de plata y oro soportada en las zeolitas. Los materiales se caracterizaron por Difracción de rayos X (DRX), Resonancia magnética nuclear (RMN) de ^{29}Si y ^{27}Al y Microscopía electrónica de transmisión (MET). Los microorganismos se incubaron en caldo de soya tripticaseína, empleando agar selectivo para su detección y cuantificación; la determinación del número de unidades formadoras de colonia (UFC) se hizo con la técnica de conteo de colonias y área de las mismas.

Cantidades de Ag-zeolita y Au-zeolita aproximadamente 0.06 g/18 ml de cultivo, con una concentración de 2.1% en peso de plata u oro, eliminaron todas las colonias de *Escherichia coli* a tiempos de 30 min. Para la eliminación de colonias de *Salmonella typhi*, se requirió mayor cantidad de muestra biocida (0.12 g/18 ml) para la eliminación total de la *Salmonella typhi* en 60 min.

Palabras claves: Zeolita; bactericida; bacteriostático; *Escherichia coli*; *Salmonella typhi*;

Abstract

Silver and gold particles were supported in synthetic zeolites and evaluated as bactericides of *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*. The variables studied were the amount of silver and gold supported in the zeolites. The materials were characterized by X-ray diffraction (XRD), nuclear magnetic resonance (NMR) of ^{29}Si and ^{27}Al and transmission electron microscopy (TEM). The microorganisms were incubated in trypticase soy broth, using selective agar for detection and quantification; The determination of the number of colony forming units (CFU) was done with the colony counting technique and area of them.

Amounts of Ag-zeolite and Au-zeolite approximately 0.06 g / 18 ml of culture, with a concentration of 2.1% by weight of silver or gold, all colonies of *Escherichia coli* at a time of 30 min. For the elimination of *Salmonella typhi* colonies, a larger amount of biocidal sample (0.12 g / 18 ml) is required for the total elimination of *Salmonella typhi* in 60 min.

Keywords: Zeolite; bactericide; bacteriostatic; *Escherichia coli*; *Salmonella typhi*;

Contenido

DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
Resumen.....	vi
Abstract.....	vii
Índice de figuras y tablas.....	xi
Abreviaturas.....	xiii
Capítulo 1. Introducción.....	1
Capítulo 2. Antecedentes.....	2
2.1 Partículas metálicas de plata y oro como bactericidas.....	2
2.2 Partículas de Ag y Au soportadas como bactericidas.....	3
2.3 Los soportes tipo zeolita.....	4
2.4 Estructura de las zeolitas.....	5
2.4.1 Zeolita faujasita (FAU).....	5
2.4.2 Zeolita mordenita (MOR).....	6
2.5 Plata y oro soportados en zeolitas.....	7
Capítulo 3. Objetivos e hipótesis.....	8
3.1 Objetivo general.....	8
3.1.1 Objetivos específicos.....	8
3.2 Hipótesis.....	8
Capítulo 4. Parte experimental.....	9
4.1 Preparación de Soportes.....	9
4.1.1 Faujasita Y.....	9
4.1.2 Mordenita.....	9

4.2	Materiales.....	9
4.3	Soportes-Ag.....	10
4.3.1	Faujasita Y-Ag	10
4.3.2	Modernita-Ag	10
4.4	Soportes-Au.....	10
4.4.1	Faujasita Y-Au	10
4.4.2	Mordenita-Au	11
4.5	Materiales biológicos	11
4.5.1	Preparación de caldos nutritivos.....	11
4.5.2	Preparación de placas de agar	12
4.5.3	Cepas bacterianas.....	12
4.5.4	Preparación de los inóculos.....	12
4.6	Caracterización de los materiales.....	12
4.6.1	Difracción de rayos-X	12
4.6.2	Resonancia magnética nuclear.....	13
4.6.3	Microscopia electrónica de transmisión	13
4.7	Evaluación de los materiales como bactericidas	13
4.7.1	Bactericida en medio líquido.....	13
4.7.2	Bactericida en medio sólido.....	14
4.8	Crecimiento bacteriano en presencia de los materiales biocidas	15
Capítulo 5. Resultados y discusión		16
5.1	Materiales.....	16
5.1.1	Propiedades estructurales	16
5.1.2	Soportes-Ag.....	16
5.1.3	Soportes-Au.....	19

5.2	Propiedades texturales	23
5.2.1	Soportes-Ag-Au	23
5.3	Evaluación de materiales como bactericidas.....	26
5.3.1	Ensayo de concentraciones mínimas inhibitorias para materiales soporte-Ag como biocida de E. Coli y S. typhi.....	26
5.3.2	Ensayo de concentraciones mínimas inhibitorias para materiales soporte-Au como biocida de E. Coli y S. typhi.....	27
5.4	Materiales como inhibidores del crecimiento bacteriano	28
5.4.1	Soporte-Ag como biocidas de E. Coli	31
5.4.2	Soporte-Ag como biocidas de S. typhi.....	33
5.4.3	Soporte-Au como biocidas de E. Coli	35
5.4.4	Soporte-Au como biocidas de S. typhi.....	38
Capítulo 6. Conclusiones y perspectivas.....		41
Conclusiones.....		41
Perspectivas.....		42
Bibliografía		43

Índice de figuras y tablas

Figura 1. (a) Estructura de la zeolita faujasita (FAU), (b) anillos de 12 tetraedros que forman las ventanas de los canales.	6
Figura 2. (a) Estructura de la zeolita mordenita (MOR), (b) anillos de 12 tetraedros que forman las ventanas de los canales.	7
Figura 3. Patrones de difracción de rayos X de la muestra FaujaAg-500-2.1.	16
Figura 4. Espectro ^{29}Si RMN de la muestra FaujaAg-500-2.1.	17
Figura 5. Espectro ^{27}Al RMN de las muestras Fauja H y FaujaAg-500-2.1.	17
Figura 6. Patrón de difracción de rayos X de la muestra MordeAg-500-1.1.	18
Figura 7. Espectro ^{29}Si RMN de las muestras Morde y MordeAg-500-1.1.	19
Figura 8. Patrón de difracción de rayos X de la muestra FaujaAu-500-2.1.	20
Figura 9. Espectro ^{29}Si RMN de la muestra FaujaAu-500-2.1.	21
Figura 10. Patrón de difracción de rayos X de las muestras a) MordeAu-500-1.7 y b) MordeAu-500-2.9.	22
Figura 11. Espectro ^{29}Si RMN de la muestra MordeAu-500-1.7.	23
Figura 12. Espectro ^{27}Al RMN de la muestra MordeAu-500-1.7.	23
Figura 13. Histogramas de distribución de tamaño de partícula de FaujaAg-500-2.1 Y FaujaAu-500-2.1.	24
Figura 14. Histogramas de distribución de tamaño de partícula de MordeAg-500-1.1 y MordeAu-500-1.7.	25
Figura 15. Crecimiento de colonias de <i>E. coli</i> expuestas a los soportes sin material biocida.	29
Figura 16. Crecimiento de colonias de <i>E. coli</i> expuestas a 0.06 g/18 ml de los materiales con Plata.	30
Figura 17. Efecto inhibitorio de (—■—) Fauja y (—●—) FaujaAg-500-2.1 a CMI de 3.3×10^{-3} g/mL sobre el crecimiento de <i>E. coli</i>	31
Figura 18. Efecto inhibitorio de (—■—) Morde y (—●—) MordeAg-500-1.1 a CMI de 4.4×10^{-3} g/mL sobre el crecimiento de <i>E. coli</i>	32
Figura 19. Efecto inhibitorio de (—■—) Fauja y (—●—) FaujaAg-500-2.1 a CMI de 5.5×10^{-3} g/mL sobre el crecimiento de <i>S. typhi</i>	33

Figura 20. Efecto inhibitorio de (—■—) Morde y (—●—) MordeAg-500-1.1 a CMI de 5.5×10^{-3} g/mL sobre el crecimiento de <i>S. typhi</i>	34
Figura 21. Efecto inhibitorio de (—■—) Morde, (—●—) MordeAu-500-1.7 y (—▲—) MordeAu-500-2.9 a CMI de 6.6×10^{-3} g/mL sobre el crecimiento de <i>E. coli</i>	36
Figura 22. Efecto inhibitorio de (—■—) Fauja y (—●—) FaujaAu-500-2.1 a CMI de 6.6×10^{-3} g/mL sobre el crecimiento de <i>E. coli</i>	37
Figura 23. Efecto inhibitorio de (—■—) Morde, (—●—) MordeAu-500-1.7 y (—▲—) MordeAu-500-2.9 a CMI de 5.5×10^{-3} g/mL sobre el crecimiento de <i>S. typhi</i>	39
Figura 24. Efecto inhibitorio de (—■—) Fauja y (—●—) FaujaAu-500-2.1 a CMI de 5.5×10^{-3} g/mL sobre el crecimiento de <i>S. typhi</i>	40
Tabla 1. Contenido de Ag en los materiales soporte-Ag.	10
Tabla 2. Contenido de Au en los materiales soporte-Au.	11
Tabla 3. Áreas específicas de los materiales soporte-Ag.....	26
Tabla 4. Concentraciones mínimas inhibitorias de los materiales soporte-Ag para <i>E. coli</i>	26
Tabla 5. Concentraciones mínimas inhibitorias de los materiales soporte-Ag para <i>S. typhi</i>	27
Tabla 6. Concentraciones mínimas inhibitorias de los materiales soporte-Au para <i>E. coli</i>	27
Tabla 7. Concentraciones mínimas inhibitorias de los materiales soporte-Au para <i>S. typhi</i>	28
Log (No) – Log (N) = Reducción logarítmica.	28
Ecuación 1	28

Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

CMI: Concentración mínima inhibitoria.

CMB: Concentración mínima bactericida.

NTU: Unidades Nefelométricas de turbidez.

UFC: Unidades formadora de colonias.

Capítulo 1. Introducción

La transmisión de patógenos por medio del agua continúa siendo un problema grave. Por ello, los agentes antimicrobianos son necesarios para inhibir la reproducción de patógenos. Una amplia variedad de agentes antimicrobianos se han empleado para este fin, cuya eficacia está determinada por varios factores físico-químicos. Muchos de ellos, sin embargo, son tóxicos, lo que los limita para su aplicación en algunos medios como agua potable, alimentos y productos textiles. En este sentido, la plata es un bactericida no tóxico para el ser humano, que puede reducir significativamente muchas infecciones bacterianas (Yin H., 1999).

La actividad antimicrobiana de especies de plata, los iones en particular, está bien documentada y se ha utilizado durante mucho tiempo para el tratamiento de heridas (Hugo W., 1995; Demling R., 2001). Por ejemplo, las soluciones de AgNO_3 se han utilizado con frecuencia para el tratamiento de quemaduras. En la actualidad, la plata sigue siendo un agente común en el tratamiento de las heridas debido a que en muchos casos la prescripción de antibióticos está limitada (Gemmell C., 2006).

Además de los compuestos de plata, la medicina moderna ha empleado otros metales como el oro, que es un inhibidor del crecimiento del bacilo que causa la tuberculosis. En el tratamiento de varias formas de cáncer, se fijan partículas de oro a las células cancerígenas (Lapotko D., 2006). Posteriormente, con un rayo láser se calientan estas partículas hasta que se consigue quemar las células tumorales. Esto permite destruir sólo las células cancerígenas y salvar los tejidos sanos, lo que posibilitaría desmarcarse de las técnicas actuales, radioterapia y quimioterapia, que sí destruyen las zonas no afectadas por la enfermedad, con perniciosos efectos secundarios para el paciente. Algunas sales inorgánicas de oro, conteniendo grupos sulfhidrilos (-SH), tienen propiedades antibacterianas; estos compuestos pueden inhibir la actividad enzimática de los liposomas.

Capítulo 2. Antecedentes

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

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

Las bacterias patogénicas, como *Salmonella typhi* (*S. typhi*) y *Escherichia coli* (*E. Coli*), son de particular interés por ser transmisoras de enfermedades por alimentos; son causantes de enfermedades peligrosas, como la salmonelosis en el caso de la *S. typhi* y el síndrome urémico hemolítico por *E. Coli*, ambas con consecuencias graves y permanentes para el ser humano.

2.1 Partículas metálicas de plata y oro como bactericidas

La plata iónica interacciona electrostáticamente con la membrana de la célula,

desalojando los iones de calcio y zinc por intercambio iónico. Sin embargo, los iones de plata interaccionan con los iones del medio externo a la célula, disminuyendo la concentración de iones de plata para interactuar con la membrana de la célula. Entonces, la plata metálica parcialmente cargada ($\text{Ag}^{\delta+}$), puede proponerse como bactericida. En este caso no se tendría el problema de disminución en la concentración por intercambio iónico con el medio externo a la célula. Además de la plata también existen otras partículas metálicas que pueden interactuar con la membrana de la célula, por ejemplo oro, que es también un metal noble que puede seguir el mismo mecanismo que las partículas de plata sobre todo las partículas a escala nanométrica, como ya se ha mostrado en catálisis (Huang et al., 2007).

2.2 Partículas de Ag y Au soportadas como bactericidas

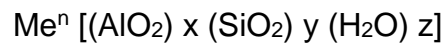
El objetivo de utilizar un soporte para dispersar el metal es maximizar la superficie activa. Los soportes, sin embargo, son muchos y muy diferentes con respecto a sus propiedades físico-químicas, que a su vez determinan las propiedades de los metales soportados. Las partículas de plata u oro soportadas pueden usarse para inhibir el crecimiento de patógenos, ya sea añadiéndolas directamente en agua o incorporándolas en varios materiales. Teniendo en cuenta estas aplicaciones, realizamos este trabajo con el objetivo de estudiar la eficiencia de plata y oro soportados en zeolitas sintéticas como un sistema para evitar el desarrollo bacteriano de *E. Coli* y *S. Typhi*.

Existen antecedentes del uso de zeolitas como soportes de materiales para la desinfección de los efluentes de procesos biológicos aerobios y anaerobios. Se aplican para evitar la propagación de ciertos organismos que producen patologías al hombre. Se han realizado numerosos estudios con zeolitas naturales, demostrándose sus efectos bactericidas sobre aquellos organismos presentes en las aguas residuales y en los efluentes de desechos sólidos. Los metales soportados en zeolitas naturales son elementos que, dependiendo de su

naturaleza y su concentración en un medio determinado, pueden ejercer diferentes efectos sobre los microorganismos por ejemplo, en pequeñas cantidades son catalizadores del crecimiento microbiano pero a partir de determinadas concentraciones, son inhibidores microbianos.

2.3 Los soportes tipo zeolita

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



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

La sustitución isomórfica de átomos de silicio por átomos de aluminio genera un exceso de carga negativa que se neutraliza por cationes. Estos cationes ocupan posiciones poco estables y esto le confiere a la zeolita su capacidad de intercambio catiónico. La regla de Löwenstein establece que en una estructura zeolítica no pueden haber uniones Al-O-Al, es decir dos tetraedros $[\text{AlO}_4]$ vecinos. Por tanto, el valor mínimo de la relación Si/Al es 1. Una relación Si/Al baja implica un elevado número de cationes en los poros de la zeolita que originan fuertes campos electrostáticos locales e interaccionan fuertemente con los adsorbatos más polares. El intercambio iónico en las zeolitas depende de la naturaleza del catión (tipo, tamaño y carga), de la temperatura, de la concentración de especies catiónicas en disolución, del tipo de anión asociado a la disolución catiónica, del disolvente y de las características estructurales de la zeolita.

2.4 Estructura de las zeolitas

Estructuralmente, las zeolitas son caparazones de aluminosilicatos constituidos de una red tridimensional infinita de tetraedros de $(\text{SiO}_4)^{4-}$ y $(\text{AlO}_4)^{5-}$ unidos a través de los oxígenos y en los que la carga residual por la presencia de Al^{3+} en la red de silicio está neutralizada por cationes mono, di o trivalentes, orgánicos e inorgánicos.

Existen más de cien estructuras zeolíticas entre naturales y sintéticas. La combinación entre los tetraedros no es única; al contrario, existe una amplia gama de posibilidades para combinarse, lo que conduce a la existencia de numerosas estructuras zeolíticas, que se diferencian entre sí por el número y tipo de sistema de canales, la forma y tamaño de los poros y la existencia o no de cavidades.

Las zeolitas que más se utilizan a nivel industrial son las faujasitas (FAU), mordenitas (MOR), las silicalitas de tipo MFI y la clinoptilolita (HEU).

2.4.1 Zeolita faujasita (FAU)

Las zeolitas tipo FAU son de poro grande, contienen cavidades casi esféricas de unos 12 Å de diámetro (figura 1a) interconectadas por ventanas de 7.4 Å (figura 1b). Las faujasitas pueden ser del tipo X o Y según el contenido de aluminio de la celda unidad. Las faujasitas con densidad de aluminio entre 96 y 77 Al/celda unidad serán de tipo X y aquellas con densidades menores de Al son tipo Y. En consecuencia, el número de cationes de intercambio es superior en las Faujasitas tipo X. La zeolita Y es una zeolita sintética isomórfica con la faujasita existente en la naturaleza.

La unidad estructural básica de la zeolita Y es la sodalita, la cual consiste en un octaedro truncado, constituido por veinticuatro tetraedros de silicio o aluminio dispuestos de modo que conducen a seis ventanas de cuatro miembros y a ocho de seis. La conexión entre las distintas unidades de sodalita se realiza por puentes

de oxígeno a través de las caras con ventanas de seis miembros, resultando la estructura representada en la figura 1a, característica de la zeolita Y. Presenta una cavidad central, “la gran cavidad”, que se enlaza tridimensionalmente con las unidades siguientes a través de canales limitados por ventanas de doce átomos de oxígeno (Dwyer J., 1984).

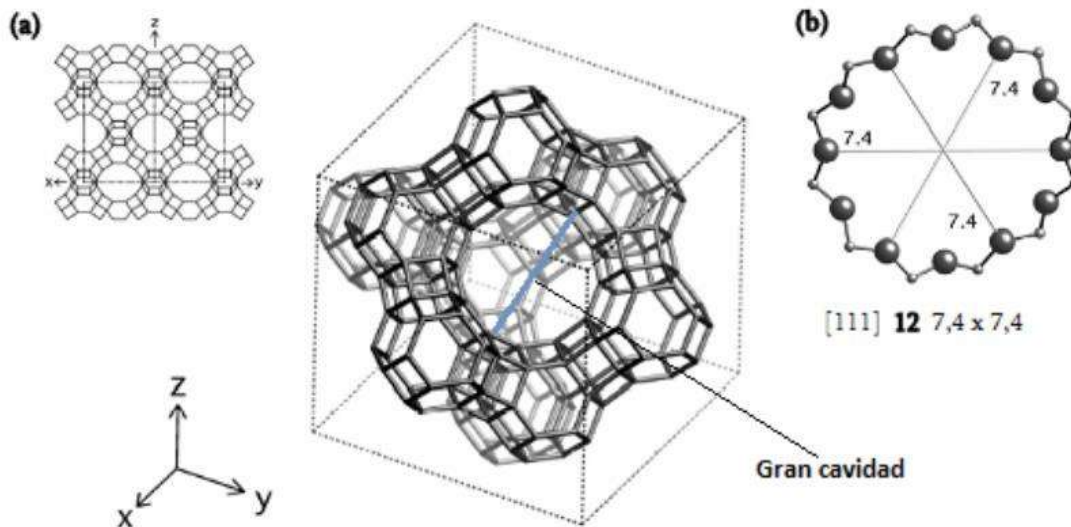


Figura 1. (a) Estructura de la zeolita faujasita (FAU), (b) anillos de 12 tetraedros que forman las ventanas de los canales.

2.4.2 Zeolita mordenita (MOR).

La mordenita es una zeolita presente en la naturaleza que posee un sistema de canales de 12 miembros de dimensiones 6.5 x 7.0 Å (figura 2a) que se encuentran interconectados entre ellos por medio de otro sistema de canales de menor tamaño (5.7 x 2.6 Å), figura 2b.

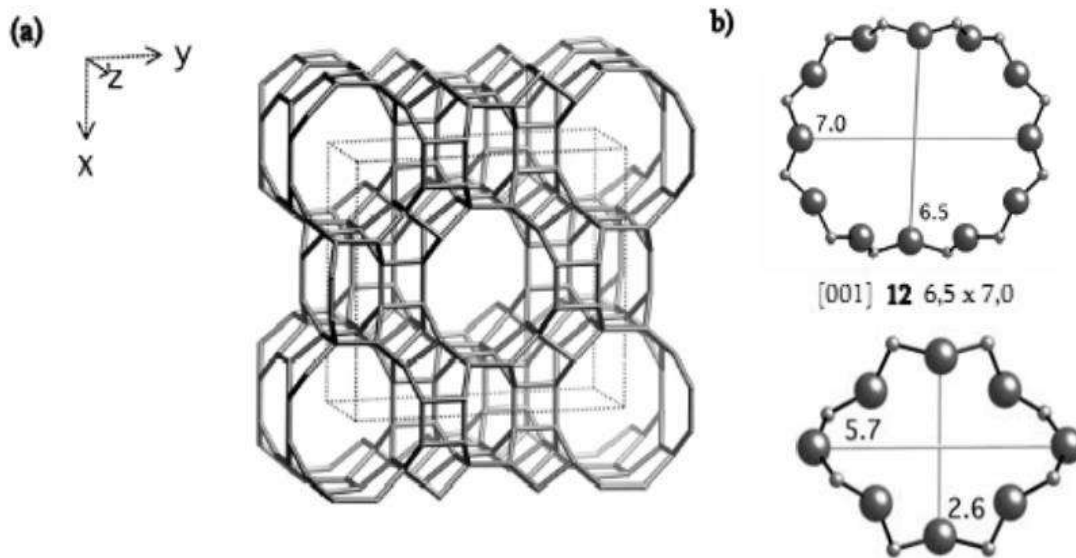


Figura 2. (a) Estructura de la zeolita mordenita (MOR), (b) anillos de 12 tetraedros que forman las ventanas de los canales.

2.5 Plata y oro soportados en zeolitas

Las zeolitas son excelentes candidatas como soportes de Ag y Au porque además de su alta área superficial son versátiles en cuanto a la forma de poros.

La plata y el oro pueden incorporarse a los soportes, ya sea como complejos orgánicos, partículas metálicas o bien como cationes Ag^+ y Au^{n+} . Esta última forma es la que más se ha estudiado debido a la facilidad de incorporar los cationes de Ag^+ a la zeolita por intercambio iónico (Im K., 1996). La actividad antimicrobiana de la zeolita modificada con plata debería en principio depender de la interacción del metal con el soporte, que a su vez la determina el tipo de zeolita, la concentración de plata, etc. (Rosabal B. Et al, 2005).

Capítulo 3. Objetivos e hipótesis

3.1 Objetivo general

Preparar materiales Faujasita-metal y Mordenita-metal para evaluar las propiedades bactericidas de nanopartículas de plata y oro soportadas en materiales mesoporosos zeolíticos sintéticos, frente a las bacterias *E. Coli* y *S. Typhi*.

3.1.1 Objetivos específicos

Evaluar el efecto que tiene el soporte (zeolita) en las propiedades bactericidas de las partículas metálicas (Au y Ag).

Determinar las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y concentraciones mínimas bactericidas (CMB) de los materiales biocidas en estudio para inhibir la *E. Coli* y *S. Typhi*.

3.2 Hipótesis

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

Capítulo 4. Parte experimental

4.1 Preparación de Soportes

4.1.1 Faujasita Y

La zeolita de tipo faujasita con una relación molar de Si/Al de 5.1 y un área específica de 925 m²/g, se adquirió en zeolyst International (USA). La zeolita en su forma amoniacal NH₄⁺-Y se calentó a 400 °C por 6 h para obtener la forma protonada, HY.

4.1.2 Mordenita

La zeolita NH₄⁺-mordenita con una relación molar Si/Al de 20 se adquirió en zeolyst internacional (USA). La H⁺-mordenita (HM) se preparó por calentamiento de NH₄⁺-mordenita a 400 °C por 6 h.

4.2 Materiales

Se prepararon una serie de materiales de zeolita faujasita Y y mordenita con 2.1 y 1.1 % en peso de plata, utilizando AgNO₃. Para favorecer la reducción de la plata y la incorporación del metal, los materiales se sometieron a tratamientos térmicos en flujo de H₂ a 500 °C. Los materiales soporte-Ag preparados se pusieron en contacto con las bacterias para explorar el efecto de la concentración del metal, la temperatura de reducción y el tiempo de contacto en las propiedades biocidas del material. Así se definieron los parámetros de % en peso del metal y de temperatura de reducción para utilizarlos en los otros soportes.

4.3 Soportes-Ag

4.3.1 Faujasita Y-Ag

La zeolita HY (2.5 g) se suspendió en 50 ml de solución 0.05 M de AgNO_3 . Después de 3 h el sólido se separó por centrifugación, se lavó tres veces con agua destilada, se secó a 80 °C y se redujo a 500 °C en un flujo de H_2 (10 ml/min) por 4 h. La cantidad de plata en el sólido fue de 2.1% en peso. La muestra de Ag preparada se nombró como faujaAg-500-2.1 (Tabla 4.1).

4.3.2 Modernita-Ag

Un gramo de Mordenita se suspendió en 50 ml de una solución 0.03 M de AgNO_3 . Después de 48 h, el sólido se separó por centrifugación, se lavó tres veces con agua destilada, se secó a 80 °C y se redujo a 500 °C en un flujo de H_2 (10 ml/min) por 4 h. La muestra así preparada se nombró como mordeAg-500-1.1 (Tabla 4.1).

Tabla 1. Contenido de Ag en los materiales soporte-Ag.

Muestra	Temperatura de reducción (°C)	Contenido Ag* (% peso)
FaujaAg-500-2.1	500	2.1
MordeAg-500-1.1	500	1.1

*Determinado por espectroscopia de absorción atómica.

4.4 Soportes-Au

4.4.1 Faujasita Y-Au

La zeolita HY se suspendió en una solución coloidal de oro (5 nm). Después de 30 min, el sólido se separó por centrifugación, se lavó tres veces con agua destilada, se secó a 80 °C y se redujo a 500 °C en un flujo de H_2 (10 ml/min) por 4 h. La cantidad de oro en el catalizador fue de 2.1% en peso. La muestra de Au preparada se nombró como faujaAu-500-2.1 (tabla 4.2).

4.4.2 Mordenita-Au

La zeolita HM se mezcló con una solución acuosa conteniendo $\text{Au}(\text{NH}_3)_4(\text{NO}_3)_3$. El $\text{Au}(\text{NH}_3)_4(\text{NO}_3)_3$ se disolvió en una solución acuosa sobre saturada de NH_4NO_3 , a esta solución se añadió gota a gota una solución de NH_4OH hasta alcanzar un pH de 7, seguido de una agitación por 24 h. Las muestras se filtraron y se lavaron con agua desionizada, en seguida se redujeron a 500 °C en flujo de H_2 (20 ml/min) por 2.5 h. Las muestras preparadas a diferentes concentraciones de Au se llamaron mordeAu-500-1.7 y mordeAu-500-2.9. La tabla 4.2 resume las muestras soporte-Au en estudio.

Tabla 2. Contenido de Au en los materiales soporte-Au.

Muestra	Temperatura de reducción (°C)	Contenido Au (% peso)
FaujaAu-500-2.1	500	2.1
MordeAu-500-1.7	500	1.7
MordeAu-500-2.9	500	2.9

*Determinado por espectroscopia de absorción atómica.

4.5 Materiales biológicos

4.5.1 Preparación de caldos nutritivos

El caldo soya tripticaseína se preparó según las indicaciones del fabricante. Después de esterilizarse en autoclave, se dejó enfriar a temperatura ambiente (en forma estéril bajo campana de flujo laminar). Se agregaron 18 ml de caldo en tubos de ensaye con tapa rosca, en condiciones asépticas.

El caldo de Müller-Hinton se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante y suplementado con Ca^{2+} y Mg^{2+} , ajustando a una concentración final de 25 mg de Ca^{2+}/L y 12.5 mg de Mg^{2+}/L de caldo.

4.5.2 Preparación de placas de agar

Los agares soya tripticaseína, Müller-Hinton, macconkey y verde brillante, se prepararon según las indicaciones del fabricante. Después de esterilizarse introduciéndolos en autoclave, se dejaron enfriar en un baño de agua a 45-50 °C (en forma estéril bajo campana de flujo laminar). Se vertieron 30 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.

4.5.3 Cepas bacterianas

Se utilizaron cepas de *E. Coli* y *S. Typhi*, obtenidas de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (ENCB-IPN), las cuales se hicieron crecer en cuñas de agar soya tripticaseína a 35.5 °C por 48 h.

4.5.4 Preparación de los inóculos

Para la preparación de los inóculos se tomaron 3 colonias aisladas del mismo tipo de morfología de las cepas mantenidas en cuñas de agar soya tripticaseína, y se hicieron crecer en tubos con 10 mL de caldo de soya tripticaseína a las condiciones óptimas de temperatura para los microorganismos (35.5 °C). Los inóculos se resembraron cada 24 h por 3 días para mantener la fase exponencial de crecimiento.

4.6 Caracterización de los materiales

4.6.1 Difracción de rayos-X

Los patrones de difracción de rayos X (por sus siglas en inglés XRD) de las muestras se obtuvieron en un difractómetro Siemens D500 que usa un tubo de cobre de rayos-X. La radiación $K\alpha$ (longitud de onda de 0.70930 Å) se seleccionó

con un monocromador de haz difractado.

4.6.2 Resonancia magnética nuclear

Los experimentos de resonancia magnética nuclear (RMN), de ^{27}Al y ^{29}Si en estado sólido se realizaron en un espectrómetro Bruker Avance 400 a frecuencias de 104.2 y 79.4 MHz, respectivamente. Los espectros de RMN de ^{29}Si se adquirieron mediante el uso de las técnicas combinadas de giro en el ángulo y desacoplamiento dipolar del protón (HPDEC). Se emplearon pulsos sencillos de excitación (3 μs) con un tiempo de repetición entre pulsos de 40 s. Las muestras sólidas se empacaron en rotores de zirconio. Los rotores se giraron a una frecuencia de 5 kHz. Los desplazamientos químicos se expresan como ppm, con referencia al tetrametilsilano (TMS). Los espectros de RMN de ^{27}Al se adquirieron con pulsos cortos ($\pi/12$) y tiempos de repetición de 0.5 s.

Las muestras se giraron a 10 kHz, y los desplazamientos químicos se referenciaron a una solución acuosa 1 M AlCl_3 .

4.6.3 Microscopia electrónica de transmisión

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

4.7 Evaluación de los materiales como bactericidas

4.7.1 Bactericida en medio líquido

Para valorar la capacidad bactericida de los materiales se empleó la técnica de ensayo de dilución en caldo Müller-Hinton, la cual proporcionó información preliminar acerca de la actividad antimicrobiana. En los ensayos de dilución en caldo, en 6 tubos de ensayo con la misma cantidad de caldo soya tripticaseína (18

mL), se agregó una cantidad de material bactericida, para obtener diluciones dobles y progresivas de agente microbiano. Los tubos fueron inoculados con una cantidad calibrada de los microorganismos de prueba (para garantizar una misma cantidad de bacterias en cada tubo), e incubados por 24 h a una temperatura de 35.5 °C. Uno de los tubos no contenía agente bactericida y se tomó como testigo o control. En aquellos tubos donde la bacteria se desarrolló, se observó una turbidez. Cuando el material biocida inhibió el crecimiento el medio de cultivo no presentó turbidez, determinando la concentración mínima inhibitoria (CMI), que es un punto de ruptura en el desarrollo bacteriano. Después de la incubación, los tubos en donde no hubo crecimiento fueron sembrados en agar Müller-Hinton, para determinar la concentración mínima de bactericida (CMB).

Las pruebas de turbidez se realizaron en un espectrofotómetro UV-Vis Varian Cary 4000. Se midió la absorbancia a 590 nm, manteniendo los cultivos a 35.5 °C, para determinar el crecimiento o inhibición de los microorganismos. Esta medición se realizó diariamente por 3 días.

Una vez que no se observó turbidez en las muestras, se sembraron en cajas Petri con agar nutritivo para observar si el efecto de los materiales era bactericida o bacteriostático.

4.7.2 Bactericida en medio sólido

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

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

El replicador se calibró para depositar alícuotas de 1-2 µL de cada inóculo sobre la

superficie del agar.

En cada ensayo se inoculó, como control, una placa sin material bactericida, al comienzo y al final, para determinar viabilidad (pureza) y detectar posibles contaminaciones durante el procedimiento. Las placas se mantuvieron a temperatura ambiente hasta secar el inóculo. Luego se incubaron invertidas a 35.5 °C por 24 h en atmósfera aeróbica. Se midieron los halos de inhibición de desarrollo, interpretándose los resultados como crecimiento (+) o ausencia de crecimiento (-).

4.8 Crecimiento bacteriano en presencia de los materiales biocidas

Se determinó el crecimiento de *S. typhi* y *E. coli* en presencia de los materiales biocidas. Para ello, se valoró la capacidad bactericida de los materiales en relación con el tiempo y con distintas concentraciones fijas de antimicrobiano. Se enfrentó un inóculo normalizado a concentraciones fijas de antimicrobiano en un caldo. Las concentraciones fueron la CMI de cada material biocida. Se inoculó 1 mL de muestra de los sistemas líquidos con bacterias (*S. typhi* o *E. coli*), en 18 mL de caldo de soya tripticaseína contenido en tubos de ensaye con tapa rosca. Se agregó una cantidad de material biocida (cantidad determinada como CMI) a cada tubo incubándose a 35.5 °C con agitación a 30 rpm. Se tomaron muestras a diferentes tiempos (0, 5, 30, 60, 90 y 120 min). La muestra tomada se sembró en cajas Petri con 30 mL de agar selectivo (MacConkey para *E. coli* y verde brillante para *S. typhi*) por la técnica de estriado en placa. Como control, una placa se inoculó con cultivo sin material bactericida, al comienzo y al final. Las placas se incubaron invertidas a 35.5 °C por 48 h en atmósfera aeróbica y se realizó el conteo de colonias.

Capítulo 5. Resultados y discusión

5.1 Materiales

5.1.1 Propiedades estructurales

5.1.2 Soportes-Ag

5.1.2.1 FaujaAg-500-2.1

El difractograma de rayos X de la muestra FaujaAg-500-2.1, figura 3, muestra los picos correspondientes a la zeolita faujacita-Y (tarjeta JCPDS45- 0112). Los picos son intensos y estrechos lo que demuestra la alta cristalinidad de este material. Además de los picos característicos de la zeolita, se observan dos picos a 38.1° y 44.3° que corresponden a la plata metálica. Este resultado sugiere que parte de la plata se estabilizó sobre la superficie externa de la zeolita como partículas de plata metálica.

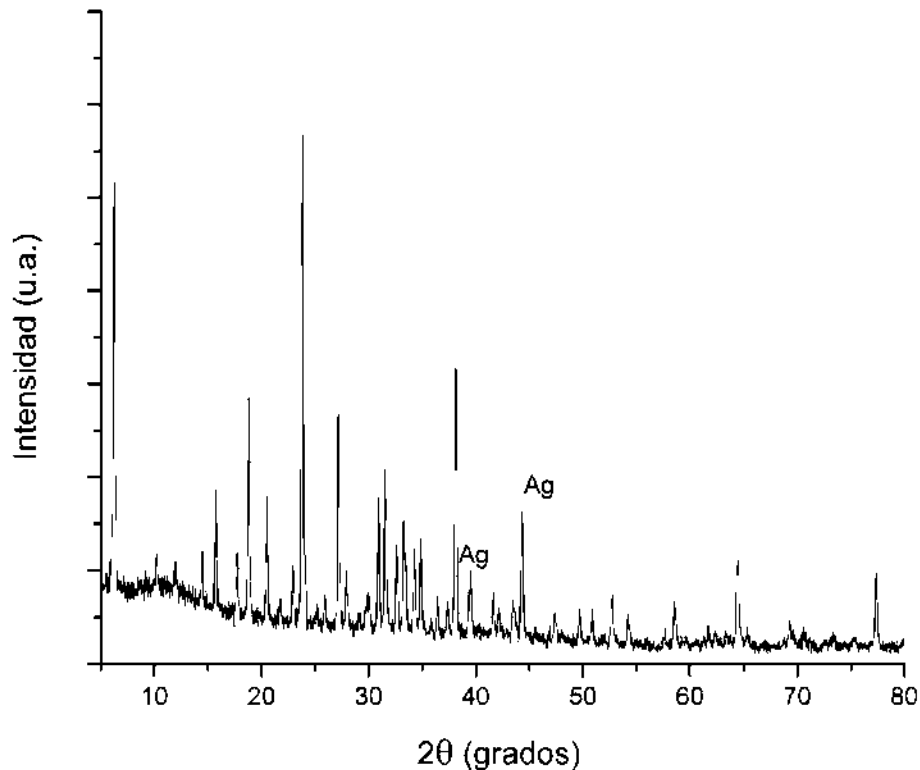


Figura 3. Patrones de difracción de rayos X de la muestra FaujaAg-500-2.1.

La figura 4 presenta el espectro ^{29}Si RMN de la muestra FaujaAg-500-2.1. Las señales más intensas son las de Si(2Al) y Si(1Al), sugiriendo que el aluminio se encuentra homogéneamente distribuido en la red de silicio y que no se presentan dominios enriquecidos en aluminio (Si(4Al)). No obstante, el espectro ^{27}Al RMN (figura 5) muestra que no todo el aluminio está incorporado a la red zeolítica. En el espectro de la zeolita sin plata, esta señal no se observó, por tanto debe concluirse que la zeolita se desaluminó durante el proceso de deposición de la plata o por el tratamiento térmico.

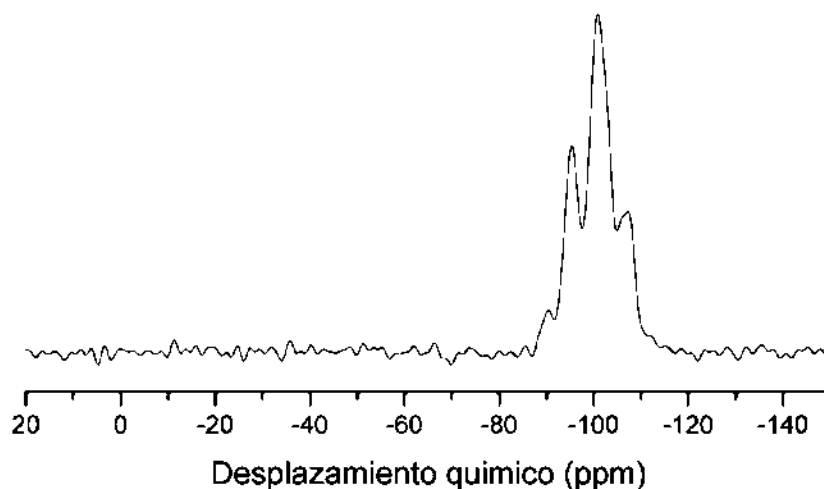


Figura 4. Espectro ^{29}Si RMN de la muestra FaujaAg-500-2.1.

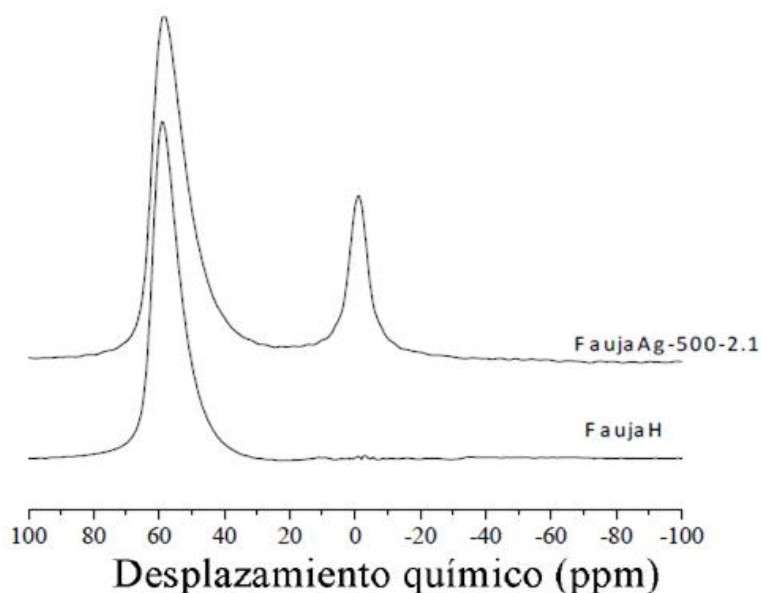


Figura 5. Espectro ^{27}Al RMN de las muestras Fauja H y FaujaAg-500-2.1.

5.1.2.2 MordeAg-500-1.1

El patrón de difracción de rayos X de la muestra mordeAg-500-1.1 (Figura 6) se indexa al de la mordenita. La muestra fue cristalina y no se detectó material amorfo. Adicionalmente, no se observaron los picos de la plata metálica, lo que se puede interpretar como una buena dispersión de las partículas de plata sobre la superficie de la mordenita, o bien que el bajo contenido de plata en la muestra está por debajo de la sensibilidad de la técnica DRX.

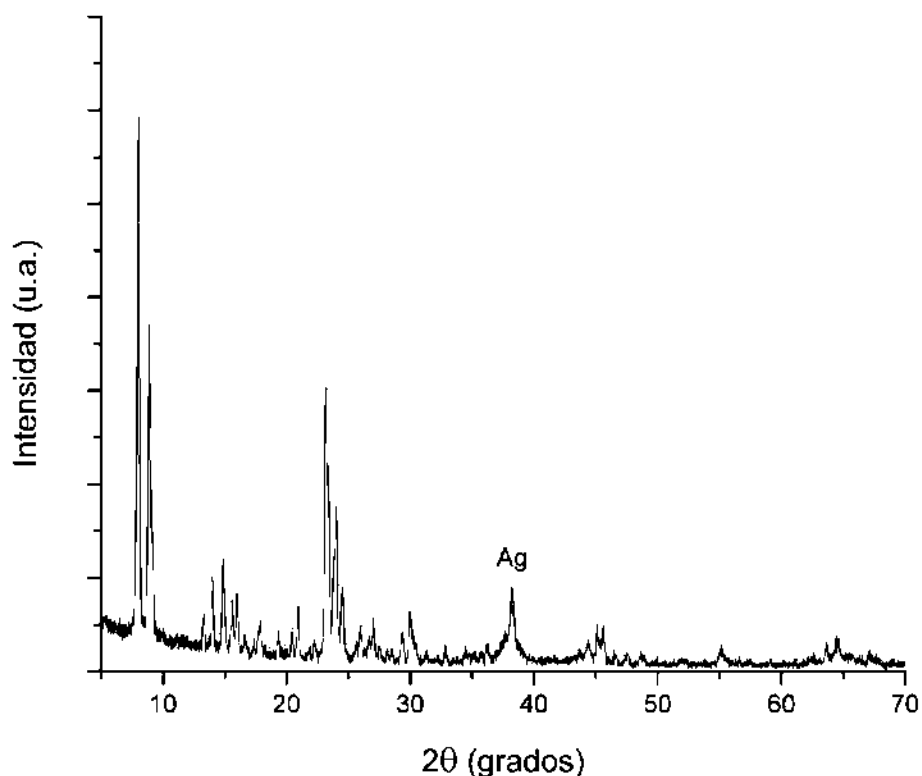


Figura 6. Patrón de difracción de rayos X de la muestra MordeAg-500-1.1.

El espectro ^{29}Si RMN de la muestra Morde (figura 7) se compone de dos señales a -115 y a -117.3 ppm, que revelan una estructura muy ordenada. Con la incorporación de plata, el espectro no cambia significativamente, a alto campo aparece aún como un hombro. La estructura silicea se mantiene.

Este resultado es relevante ya que puede interpretarse como que la incorporación de plata no modifica la superficie.

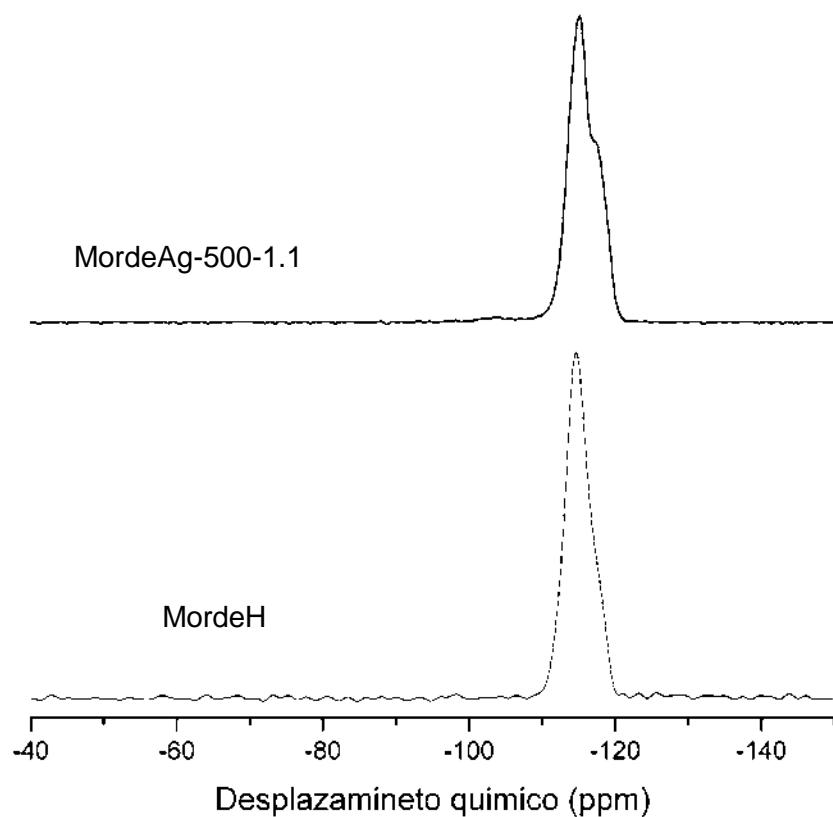


Figura 7. Espectro ^{29}Si RMN de las muestras Morde y MordeAg-500-1.1.

5.1.3 Soportes-Au

5.1.3.1 FaujaAu-500-2.1

El patrón de difracción de rayos X de FaujaAu-500-2.1 se incluye en la figura 8. El patrón se indexa completamente al de una zeolita faujasita. Los picos de oro a 38.1 y 44.5 no son perceptibles, sugiriendo una excelente dispersión de esta fase metálica sobre la superficie zeolítica. Si se compara este difractograma con el de la zeolita Y con plata, difieren notablemente en intensidades relativas de los picos. Debido al método de incorporación de los metales, es posible que una fracción de plata se haya incorporado como catión en posición de intercambio. En resumen, el

oro metálico está mejor dispersado que la plata metálica en la superficie externa del soporte de tipo faujasita.

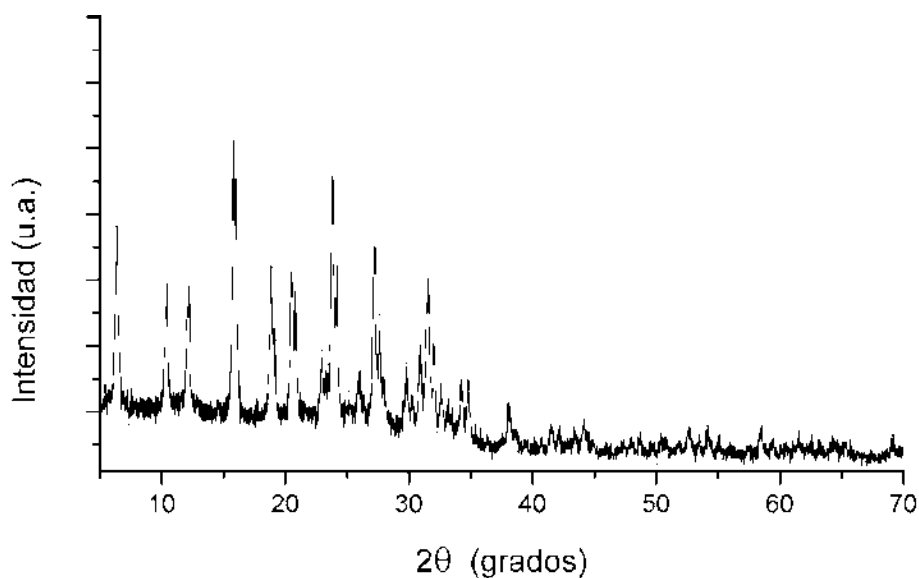


Figura 8. Patrón de difracción de rayos X de la muestra FaujaAu-500-2.1.

El espectro ^{29}Si RMN de la muestra FaujaAu-500-2.1 (figura 9) contiene tres picos atribuibles a unidades de silicio Si(3Al), Si(2Al) y Si(1Al). Las intensidades relativas de estas señales difieren de las observadas en el espectro correspondiente para la muestra FaujaAg-500-2.1, lo cual confirma no solo que la plata y el oro se dispersan diferentemente en este soporte sino que además las unidades estructurales de la zeolita se modifican. En este sentido, el proceso de impregnación sugiere una redistribución de los aluminios en la red zeolítica, mientras que en la muestra con plata existen mayoritariamente unidades Si(1Al), en la muestra con oro las unidades predominantes son Si(2Al). Este comportamiento debe estar condicionado por la cantidad de aluminio en la red zeolítica.

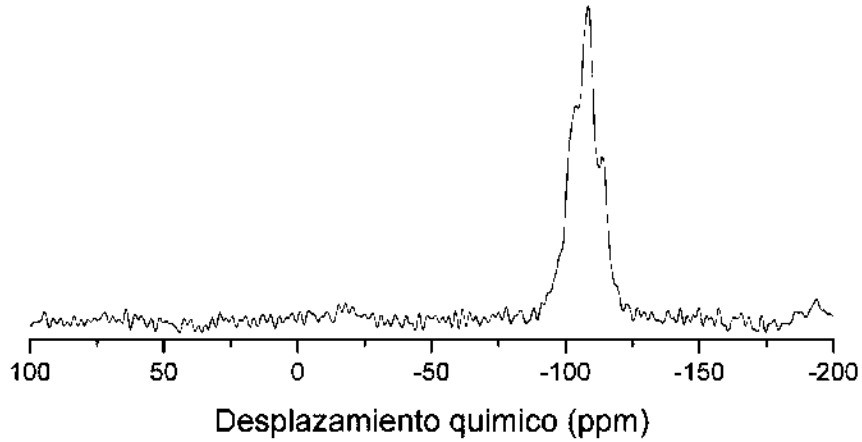
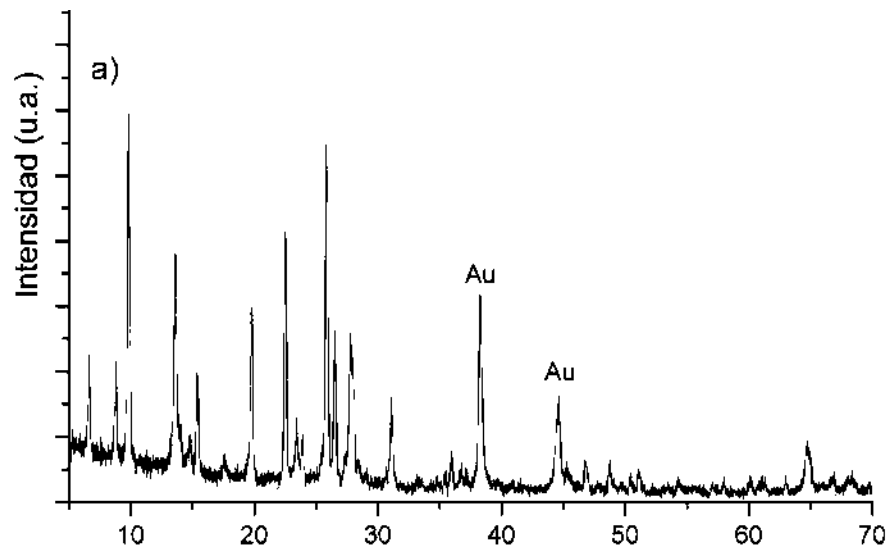


Figura 9. Espectro ^{29}Si RMN de la muestra FaujaAu-500-2.1.

5.1.3.2 MordeAu-500-1.7 y MordeAu-500-2.9

Los patrones DRX en la figura 10 muestran que, al aumentar la cantidad de oro, la cristalinidad de la muestra disminuye. Los picos DRX de oro metálico (38.4° y 44.5°) se observan en el patrón de las dos zeolitas MordeAu-500-1.7 y MordeAu-500-2.9. Se debe concluir que la incorporación de oro en la mordenita se acompaña de una destrucción parcial de la red zeolítica y de la estabilización de partículas metálicas de oro grandes en la superficie externa.



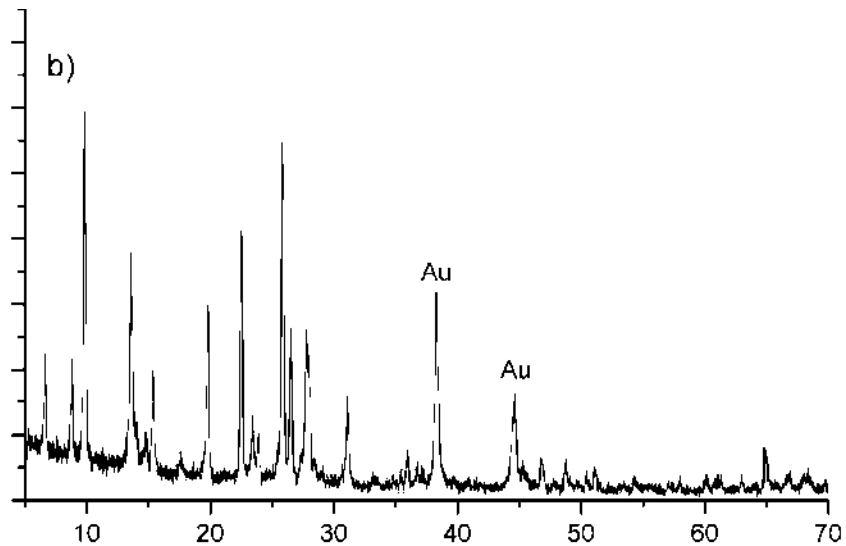


Figura 10. Patrón de difracción de rayos X de las muestras a) MordeAu-500-1.7 y b) MordeAu-500-2.9.

Los espectros ^{29}Si y ^{27}Al RMN de la muestra MordeAu-500-1.7, figuras 11 y 12, respectivamente, muestran que la zeolita mordenita, en efecto presenta cambios estructurales como lo sugirió la difracción de rayos X. Por un lado, el espectro ^{29}Si RMN se compone de dos señales con desplazamientos químicos, lo que sugiere una red deficiente en aluminio. Por otro lado, el espectro ^{27}Al RMN se compone de una sola señal de especies aluminio tetraédricas (a 54.8 ppm). No obstante, la señal es ancha y asimétrica, lo que sugiere que algunas partículas de oro, probablemente iones, están cerca de los aluminios estructurales, es decir dentro de los canales de la zeolita.

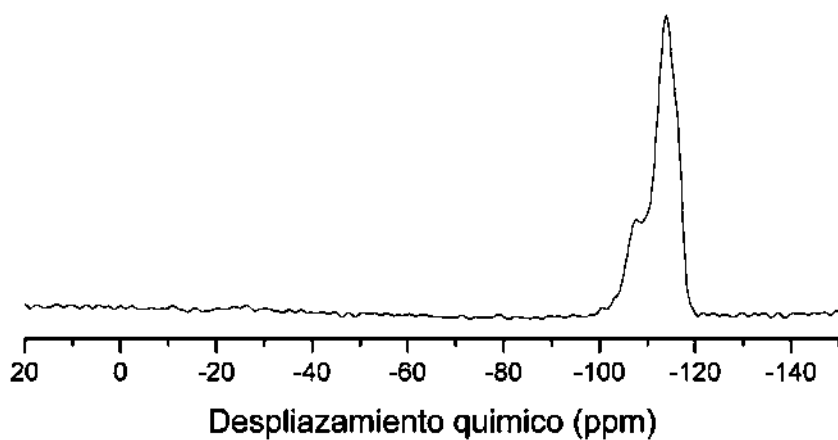


Figura 11. Espectro ^{29}Si RMN de la muestra MordeAu-500-1.7.

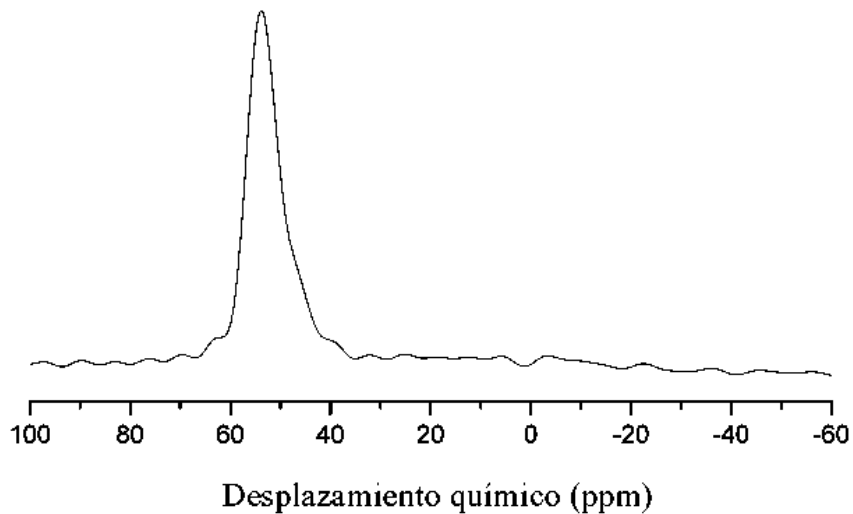


Figura 12. Espectro ^{27}Al RMN de la muestra MordeAu-500-1.7.

5.2 Propiedades texturales

5.2.1 Soportes-Ag-Au

En las figuras 13 y 14 se reportan los tamaños de partículas de plata y oro soportadas, en los materiales faujasita y mordenita respectivamente. En ambas muestras se obtuvo una distribución multimodal, observándose partículas de 3 hasta 27.5 nm, con la mayor parte de las partículas en el intervalo de 12.5 a 17.5

nm (diámetro) para la FaujaAg-500-2.1 y en el intervalo de 10 a 15 nm para la MordeAg-500-1.1. Comparando el tamaño de las partículas en ambos materiales, se observa que la MordeAg-500-1.1 presenta mayor cantidad de partículas de tamaño de 10 a 12.5 nm.

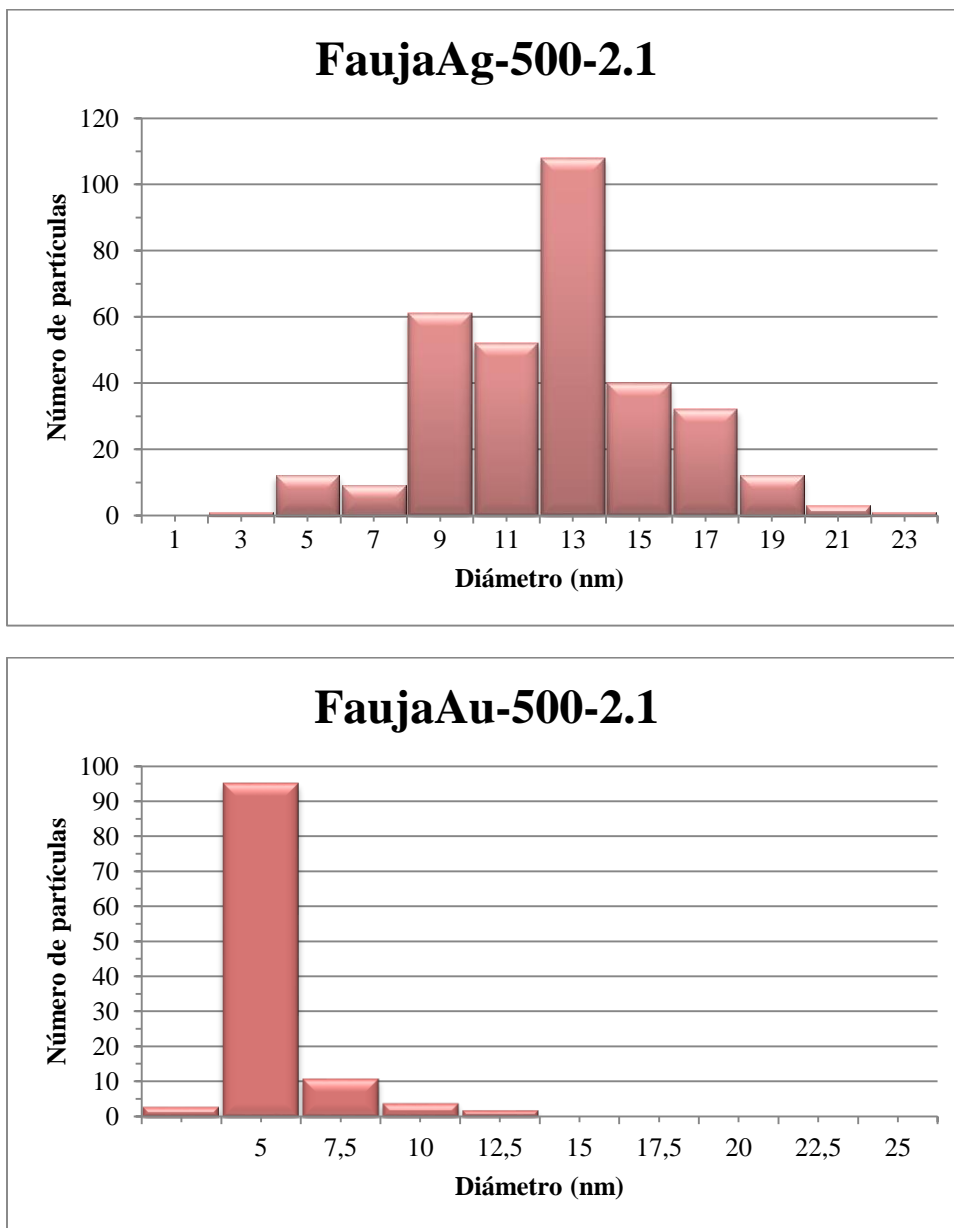


Figura 13. Histogramas de distribución de tamaño de partícula de FaujaAg-500-2.1 Y FaujaAu-500-2.1.

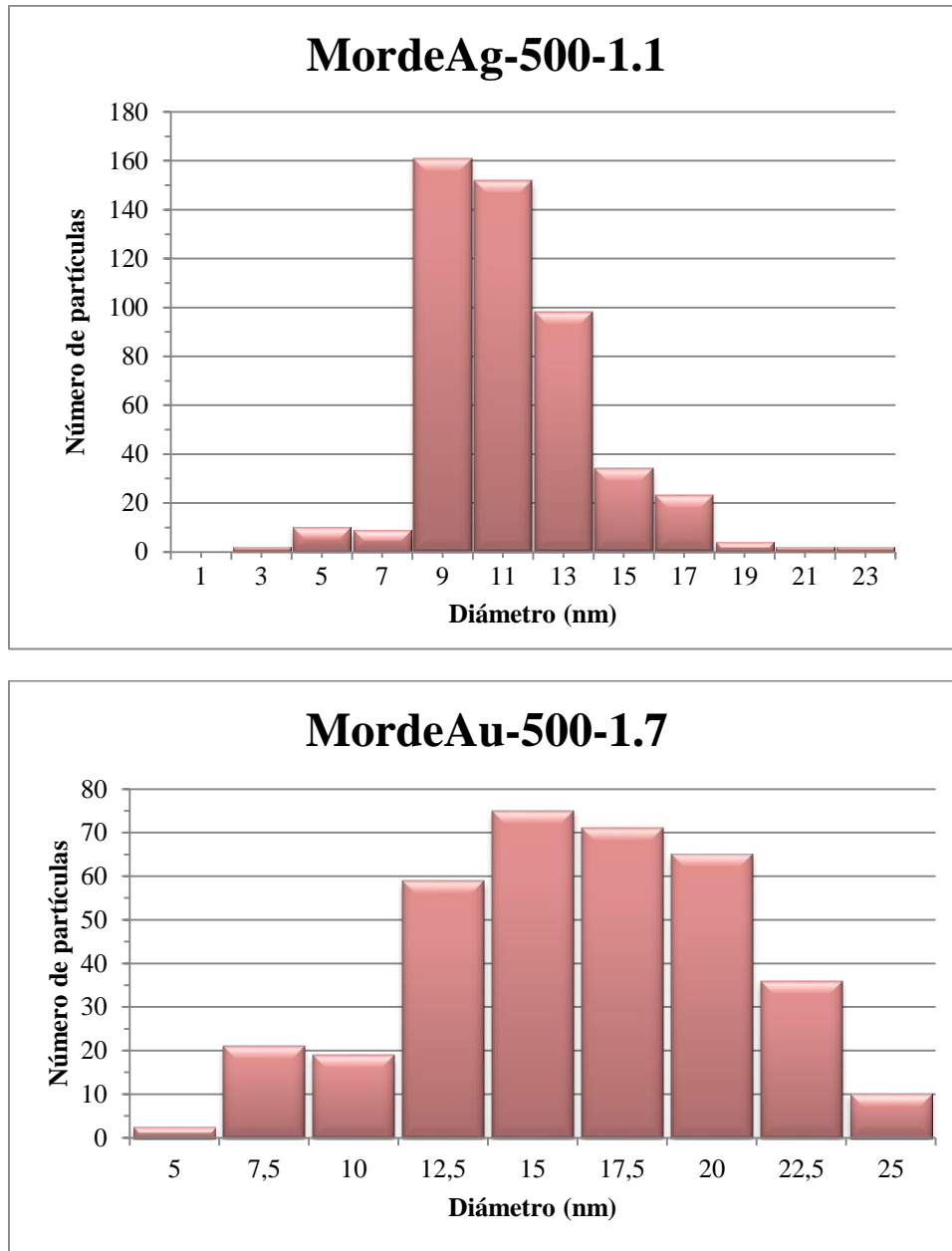


Figura 14. Histogramas de distribución de tamaño de partícula de MordeAg-500-1.1 y MordeAu-500-1.7.

Siguiendo con las propiedades texturales de las muestras soporte-Ag, sus valores de área específica se presentan en la tabla 3. Como se observa, los materiales con plata reducen su área específica cuando la plata se incorpora al soporte. Las áreas específicas dependen del contenido de plata, presentando el valor más alto de área específica el material MordeAg-500-1.1 (397 m²/g), el cual contiene la menor cantidad de Ag.

Tabla 3. Áreas específicas de los materiales soporte-Ag.

Muestra	Área específica (m ² /g)	Muestra	Área específica (m ² /g)
Fauja	925	Morde	439
FaujaAg-500-2.1	166	MordeAg-500-1.1	397

5.3 Evaluación de materiales como bactericidas

5.3.1 Ensayo de concentraciones mínimas inhibitorias para materiales soporte-Ag como biocida de *E. Coli* y *S. typhi*

Se realizó un primer sondeo para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los materiales soporte-Ag como biocida de *E. coli*. En el ensayo se incluyeron 4 aislados de *E. coli*, los que fueron expuestos a los materiales soporte-Ag para obtener suspensiones con concentraciones (gramos de material por mililitro de caldo de cultivo) de 2.2×10^{-3} g/mL, 3.3×10^{-3} g/mL y 4.4×10^{-3} g/mL; después de la incubación por 72 h se determinó el poder inhibitorio de los materiales soporte-Ag. Finalizado el tiempo de incubación, se obtuvieron los resultados de las pruebas que se presentan en la tabla 4.

Tabla 4. Concentraciones mínimas inhibitorias de los materiales soporte-Ag para *E. coli*.

Cepa/Material biocida	Control 1	2.2×10^{-3} g/mL	3.3×10^{-3} g/mL	4.4×10^{-3} g/mL	5.5×10^{-3} g/mL	6.6×10^{-3} g/mL	7.7×10^{-3} g/mL	Control 2
FaujaAg-500-2.1	+	+	-	-	-	-	-	+
MordeAg-500-1.1	+	+	+	-	-	-	-	+

+: Crecimiento bacteriano, -: Ausencia de crecimiento bacteriano

Para la *S. typhi* se requirió un segundo barrido donde se utilizaron concentraciones de 5.5×10^{-3} g/mL, 6.6×10^{-3} g/mL, y 7.7×10^{-3} g/mL; después de la incubación se determinó la inhibición de la *S. typhi* frente a las concentraciones de los materiales soporte-Ag. A una concentración de 5.5×10^{-3} g/mL se dejó de notar crecimiento bacteriano, por lo que se prosiguió con el cultivo de una muestra de ese tubo y de los demás que siguieron presentando ausencia de turbidez. Los resultados de los antibiogramas se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Concentraciones mínimas inhibitorias de los materiales soporte-Ag para *S. typhi*.

Cepa/Material biocida	Control 1	2.2x10 ⁻³ g/mL	3.3x10 ⁻³ g/mL	4.4x10 ⁻³ g/mL	5.5x10 ⁻³ g/mL	6.6x10 ⁻³ g/mL	7.7x10 ⁻³ g/mL	Control 2
FaujaAg-500-2.1	+	+	+	+	-	-	-	+
MordeAg-500-1.1	+	+	+	+	-	-	-	+

+: Crecimiento bacteriano, -: Ausencia de crecimiento bacteriano

5.3.2 Ensayo de concentraciones mínimas inhibitorias para materiales soporte-Au como biocida de *E. Coli* y *S. typhi*

Siguiendo con el procedimiento para determinar la CMI, 4 aislados de *E. coli* fueron expuestos a los materiales soporte-Au, se utilizó un intervalo de concentraciones de 2.2 x 10⁻³ g/mL hasta 4.4 x 10⁻³ g/mL. En el primer sondeo después de incubación por 72 h, la *E. coli* presentó crecimiento frente a los materiales soporte-Au, a este intervalo se presentó tolerancia para todos los materiales, se planteó un segundo sondeo a concentraciones de 5.5 x 10⁻³ g/mL, 6.6 x 10⁻³ g/mL, y 7.7 x 10⁻³ g/mL.

En la Tabla 6 se reporta la concentración mínima inhibitoria de los materiales soporte-Au para *E. coli*.

Tabla 6. Concentraciones mínimas inhibitorias de los materiales soporte-Au para *E. coli*.

Cepa/Material biocida	Control 1	2.2x10 ⁻³ g/mL	3.3x10 ⁻³ g/mL	4.4x10 ⁻³ g/mL	5.5x10 ⁻³ g/mL	6.6x10 ⁻³ g/mL	7.7x10 ⁻³ g/mL	Control 2
FaujaAu-500-2.1	+	+	+	+	+	-	-	+
MordeAu-500-1.7	+	+	+	+	+	-	-	+
MordeAu-500-2.9	+	+	+	+	+	-	-	+

+: Crecimiento bacteriano, -: Ausencia de crecimiento bacteriano

El efecto sobre la inhibición del crecimiento de *S. typhi* debido a la presencia de los materiales soporte-Au se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Concentraciones mínimas inhibitorias de los materiales soporte-Au para *S. typhi*.

Cepa/Material biocida	Control 1	2.2x10 ⁻³ g/mL	3.3x10 ⁻³ g/mL	4.4x10 ⁻³ g/mL	5.5x10 ⁻³ g/mL	6.6x10 ⁻³ g/mL	7.7x10 ⁻³ g/mL	Control 2
FaujaAu-500-2.1	+	+	+	+	-	-	-	+
MordeAu-500-1.7	+	+	+	+	-	-	-	+
MordeAu-500-2.9	+	+	+	+	-	-	-	+

+: Crecimiento bacteriano, -: Ausencia de crecimiento bacteriano

5.4 Materiales como inhibidores del crecimiento bacteriano

Debido a que la técnica turbidimétrica depende del tamaño de las células bacterianas, así como de la presencia de células dañadas (Skandamis P. et al., 2001), se realizaron pruebas microbiológicas para obtener curvas de crecimiento de los microorganismos en estudio (*E. coli* y *S. typhi*) en presencia de los materiales soporte-Ag y soporte-Au como agentes antimicrobianos, debido a que algunos materiales tienden a quedar suspendidos en soluciones acuosas y por tanto afectan las mediciones de turbidez. En la figura 15 se observa el efecto inhibitorio en placa microbiana de las bacterias en estudio expuestas a los soportes zeolita y a los soportes-Ag (figura 16), respectivamente.

Antes de evaluar el carácter bactericida de los materiales se realizaron los controles de calidad a las cepas de trabajo por microdiluciones. Los resultados de los controles de calidad (viabilidad y pureza) de *E. coli* y *S. typhi*, empleados en la evaluación bactericida, cumplieron con los criterios de aceptación al obtenerse valores de viabilidad del orden de 10⁸, de modo que los resultados de pureza para ambos microorganismos cumplen con la condición de cultivos libres de contaminación microbiana.

El crecimiento microbiano y el conteo de colonias de las cepas de *E. coli* y *S. typhi*, en presencia de los diferentes materiales conteniendo plata u oro, se calcularon teniendo en cuenta el número de colonias crecidas en la suspensión de microorganismos inoculados (No) y las colonias crecidas (N), Ecuación 1.

$$\text{Log (No)} - \text{Log (N)} = \text{Reducción logarítmica.} \quad \text{Ecuación 1}$$

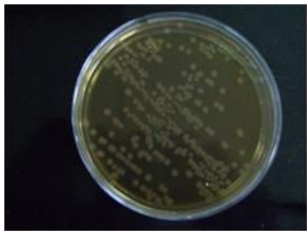
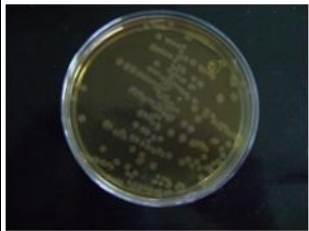
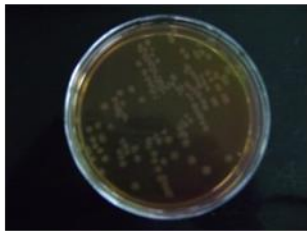
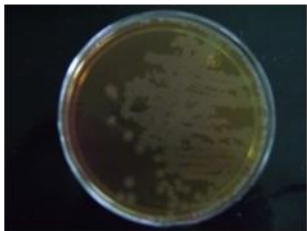
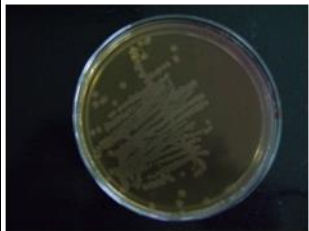
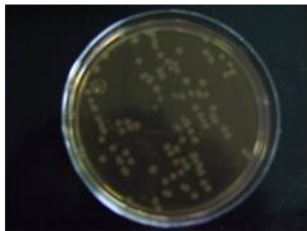
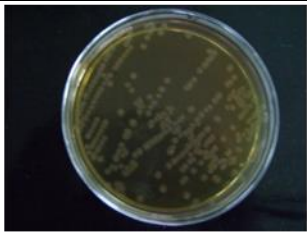
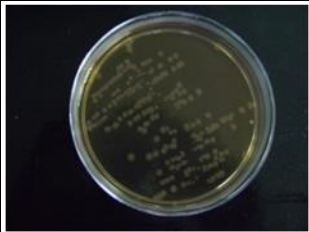
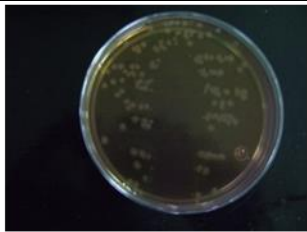



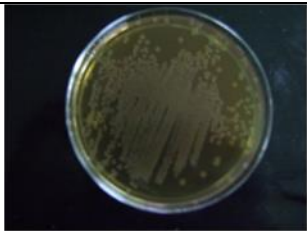
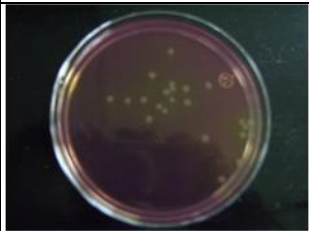

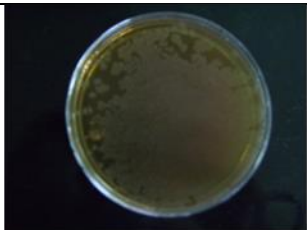
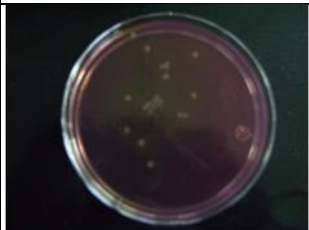
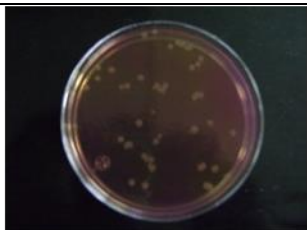
Tiempo (min)	Patrón	Faujasita	Mordenita
5			
15			
30			
60			
90			
120			

Figura 15. Crecimiento de colonias de *E. coli* expuestas a los soportes sin material biocida.



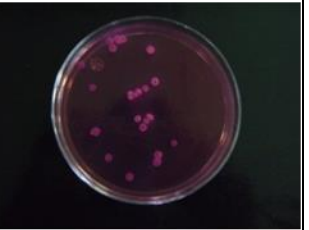
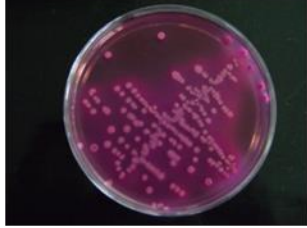
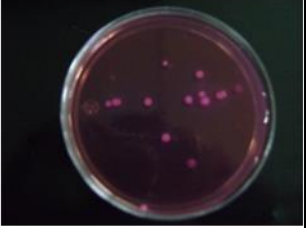


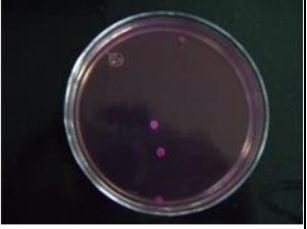
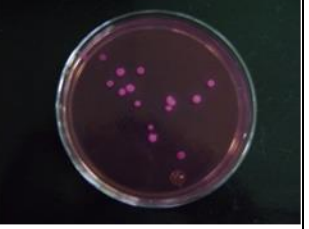

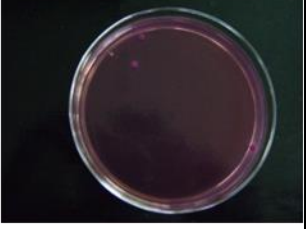


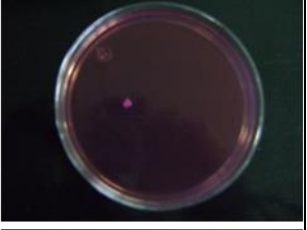
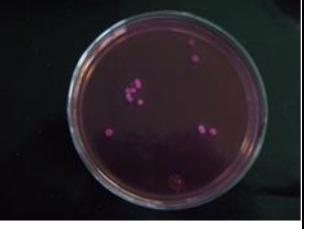

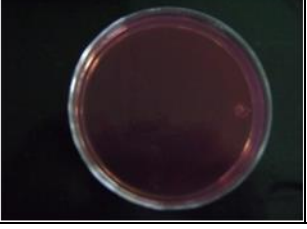
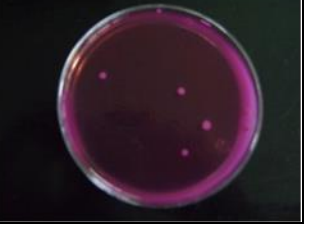
Tiempo (min)	Patrón	Fauja-Ag	Morde-Ag
5			
15			
30			
60			
90			
120			

Figura 16. Crecimiento de colonias de *E. coli* expuestas a 0.06 g/18 ml de los materiales con Plata.

5.4.1 Soporte-Ag como biocidas de *E. Coli*

En la figura 17 se grafica el número de colonias de *E. coli* en función del tiempo, en presencia de los materiales Fauja y FaujaAg-500-2.1. Los resultados de las evaluaciones de crecimiento bacteriano indican que la *E. coli* fue capaz de tolerar la presencia del material Fauja. Por otra parte, el material FaujaAg-500-2.1 inhibió por completo el crecimiento de *E. coli*. De acuerdo con la figura 17, a los 5 min de exposición, a una CMI de 3.3×10^{-3} g/mL se presentó toxicidad, eliminando el 95% del número de colonias iniciales y el 100% después de 30 min. Este resultado evidencia que las partículas de plata en el soporte son accesibles para las bacterias.

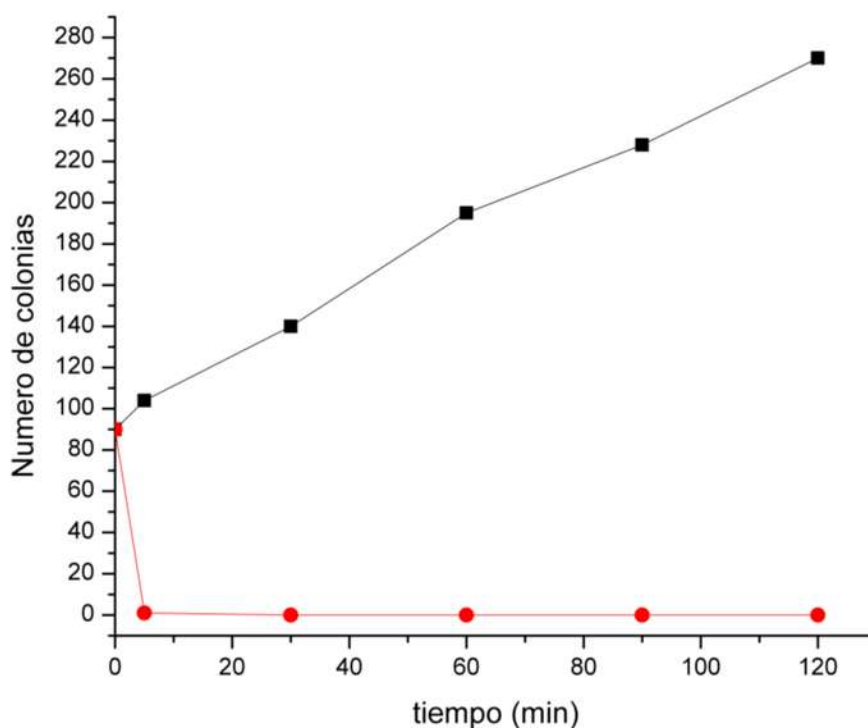


Figura 17. Efecto inhibitorio de (—■—) Fauja y (—●—) FaujaAg-500-2.1 a CMI de 3.3×10^{-3} g/mL sobre el crecimiento de *E. coli*.

En las pruebas con material MordeAg-500-1.1, a una CMI de 4.4×10^{-3} g/mL, se observa un efecto bactericida sobre *E. coli*. El efecto es notable desde el primer momento en que se pone en contacto a la bacteria con el material biocida. Esta inhibición inmediata se debe al tamaño de partículas que predominan en el

material (10-15 nm) las cuales son accesibles a la bacteria. El área específica del soporte también tiene un papel importante en la acción bactericida. Esto lo confirma la acción bactericida de los materiales con mayor área específica, casos de MordeAg-500-1.1 y FaujaAg-500-2.1, que eliminaron más rápidamente las bacterias, lo que también es una consecuencia de la alta dispersión de las partículas en la alta área superficial de estos materiales (R. Guerra et al, 2012). En relación a los resultados previamente comentados, el material MordeAg-500-1.1 con una CMI mayor al material FaujaAg-500-2.1 elimina totalmente las colonias después de 30 min. Sin embargo, el contenido de plata del material MordeAg-500-1.1 representa apenas el 5.24% respecto al contenido de plata en el material FaujaAg-500-2.1. La figura 18 presenta la curva del número de colonias que sobrevivieron al paso del tiempo en los medios de cultivo y en presencia de la muestra de MordeAg-500-1.1.

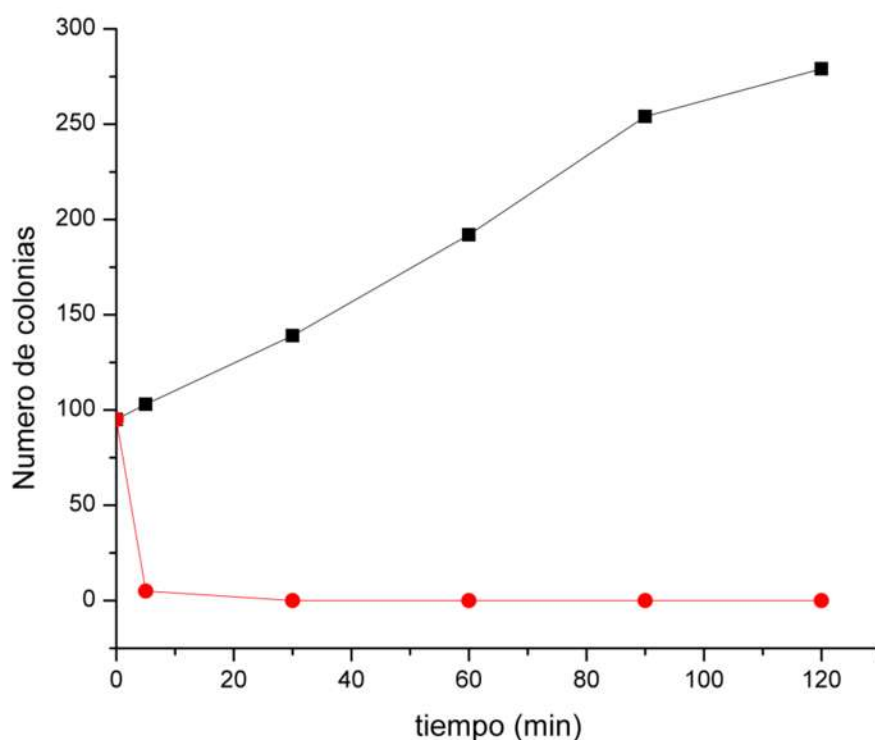


Figura 18. Efecto inhibitorio de (—■—) Morde y (—●—) MordeAg-500-1.1 a CMI de 4.4×10^{-3} g/mL sobre el crecimiento de E. coli.

Hasta ahora se ha demostrado que la plata soportada en diferentes zeolitas tiene

propiedades bactericidas para *E. coli*. Otros autores (Shahverdi A., 2007; Lara H., 2010), ya habían reportado a la plata iónica como elemento bactericida. No obstante, la plata iónica reacciona con los elementos del medio disminuyendo así su probabilidad de contacto con la bacteria, por lo que se requiere de una alta concentración de plata iónica. Así, los resultados que se acaban de exponer prueban que la plata parcialmente cargada, soportada en diferentes zeolitas, es igualmente eficiente como bactericida y se requiere una menor cantidad para inhibir el crecimiento bacteriano, además de que el material soporte-Ag puede reutilizarse.

5.4.2 Soporte-Ag como biocidas de *S. typhi*

En la figura 19 se aprecia que el material Fauja no inhibió el crecimiento de la *S. typhi*. En cambio, el crecimiento de *S. typhi* en presencia de FaujaAg-500- 2.1, con una CMI de 5.5×10^{-3} g/mL, se redujo hasta en un 75% en los primeros 5 min, y a los 30 min ya se había inhibido un 85%. Al cabo de 120 min de exposición de eliminó el 100% de las colonias.

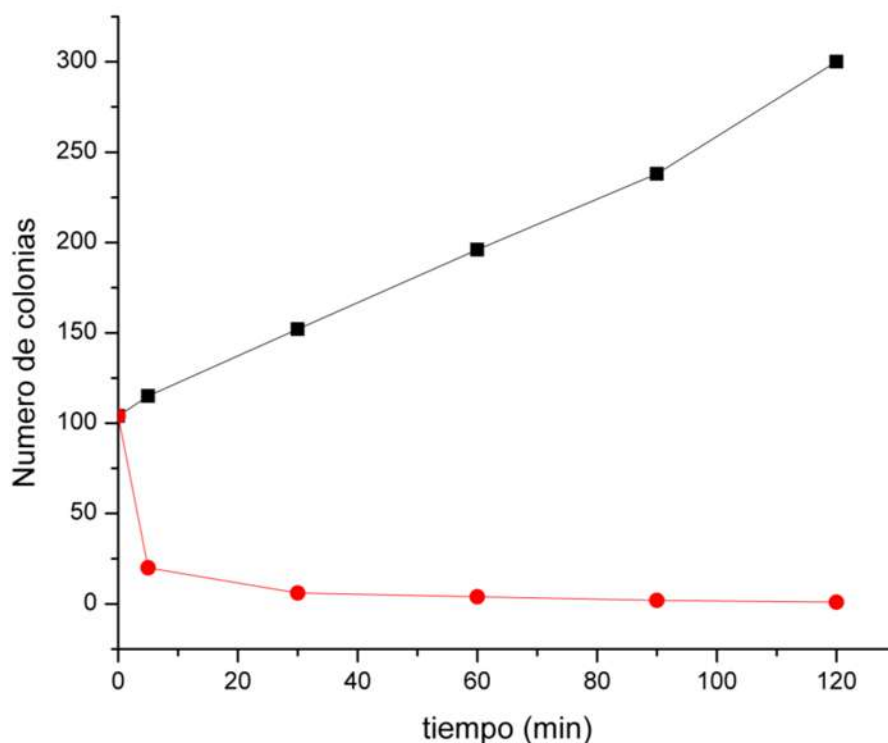


Figura 19. Efecto inhibitorio de (—■—) Fauja y (—●—) FaujaAg-500-2.1 a CMI de 5.5×10^{-3} g/mL sobre el crecimiento de *S. typhi*.

Las curvas de crecimiento de la *S. typhi* en presencia de Morde y MordeAg-500-1.1 se muestran en la figura 20. Nuevamente, se observa que la curva correspondiente a las bacterias que interactúan con el material sin plata (Morde) no tiene efecto bactericida para *S. typhi*. La curva obtenida del crecimiento de la *S. typhi*, expuesta a MordeAg-500-1.1 a una CMI de 5.5×10^{-3} g/mL, está muy por debajo de la correspondiente al control, mostrando que este material inhibe el crecimiento en un 65% en los primeros 5 min, 92% a los 60min y el 100% a los 120 min. El material MordeAg-500-1.1 mostró en todo momento un efecto bactericida.

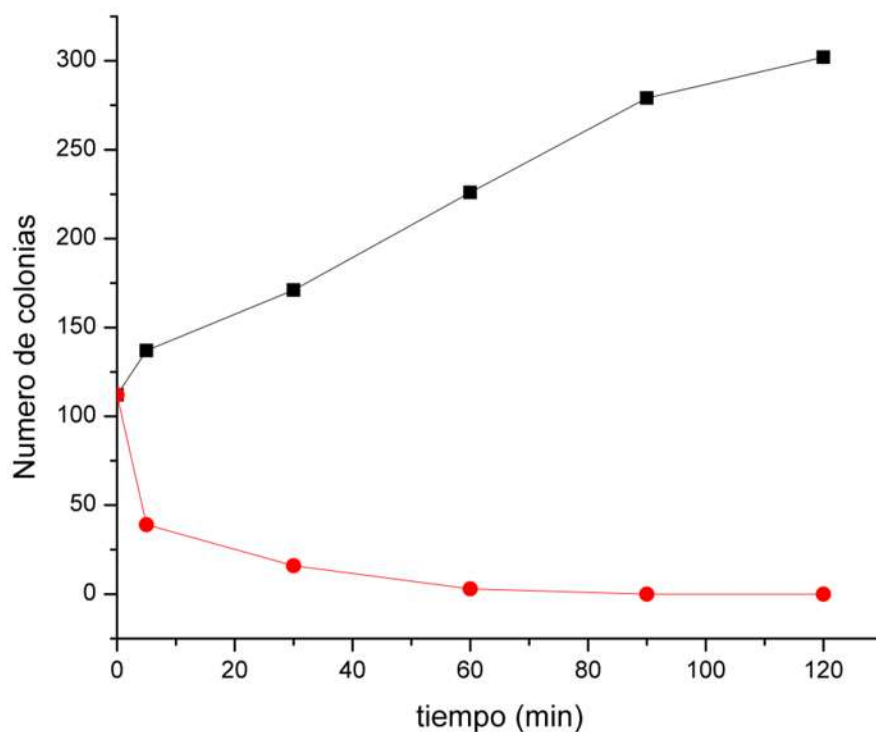


Figura 20. Efecto inhibitorio de (—■—) Morde y (—●—) MordeAg-500-1.1 a CMI de 5.5×10^{-3} g/mL sobre el crecimiento de *S. typhi*.

Para determinar las curvas de crecimiento bacteriano se realizaron un total de tres experimentos por material. Los resultados de las curvas corresponden a la media de los tres experimentos. Sólo se incluyen los experimentos en los que la viabilidad inicial fue superior al 85%. La pauta de administración de los materiales bactericidas está en función a la CMI determinada.

Los resultados indican que la exposición de la *S. typhi*, frente a los materiales soporte-Ag durante un periodo de 5 min, reduce significativamente el número de bacterias. Estos resultados sugieren que se puede eliminar totalmente las bacterias presentes al prolongar el tiempo de exposición o al incrementar la CMI.

Los soportes sin plata permitieron el desarrollo de las bacterias de *E. coli* y *S. typhi*. De entre todos los soportes evaluados, la Morde presentó mayor crecimiento de bacterias en el periodo de los 120 min de exposición. Este resultado por supuesto debe atribuirse a la mayor área superficial de la mordenita. De los resultados de inhibición del crecimiento bacteriano con los materiales soporte-Ag, se observó que en los materiales FuajaAg-500-2.1 y MordeAg-500-1.1 con mayor área específica 166 m²/g y 397 m²/g, respectivamente, eliminan más rápidamente a las bacterias. Comparando el tamaño de partícula en estos dos materiales, en el MordeAg-500-1.1, donde predomina el tamaño de 10-12.5 nm, la eliminación de las colonias bacterianas fue más rápida.

5.4.3 Soporte-Au como biocidas de *E. Coli*

En la figura 21 se grafica el número de colonias de *E. coli* que sobrevivieron en función del tiempo en presencia de los materiales Morde, MordeAu-500-1.7 y MordeAu-500-2.9. El material Morde no presentó ningún efecto bactericida sobre el crecimiento de *E. coli*. Por el contrario, los materiales MordeAu-500-1.7 y MordeAu-500-2.9 tienen propiedades bactericidas, con una inhibición significativa de 56% y 62%, respectivamente, a los 5 min de exposición. A diferencia del material MordeAu-500-2.9, el material MordeAu-500-1.7 presentó un comportamiento bacteriostático en el intervalo de 5 a 60 min, seguido de una moderada inhibición bactericida. El material MordeAu-500-2.9 presentó una inhibición bacteriana moderada en el intervalo de 5 a 90 min debido a que las bacterias no entran en contacto con todas las partículas porque los sedimentos de algunas bacterias muertas formaron una película en la superficie del material. Este resultado fue exclusivo de este material y la caracterización llevada a cabo no permite concluir sobre este comportamiento.

El mayor poder bactericida de MordeAu-500-2.9 puede atribuirse al tamaño de las partículas de oro, en su mayoría de 20 nm. Parece ser las bacterias tienen acceso directo a estas partículas, reduciendo el número de las colonias bacterianas en los primeros 5 min.

La concentración de Au en ambos materiales no fue suficiente para inhibir totalmente al microorganismo en un tiempo de 120 min, sin embargo, ambos materiales inocularon más del 70% del inóculo inicial. El material MordeAu-500-2.9 demostró un mayor poder bactericida, alcanzando una inhibición del 82% de las colonias iniciales, en contraste con el material MordeAu-500-1.7, el cual logró una inhibición del 72% de las colonias del inóculo inicial. El mayor poder bactericida de MordeAu-500-2.9 puede atribuirse a la mayor concentración de Au en el material y al tamaño de las partículas de Au.

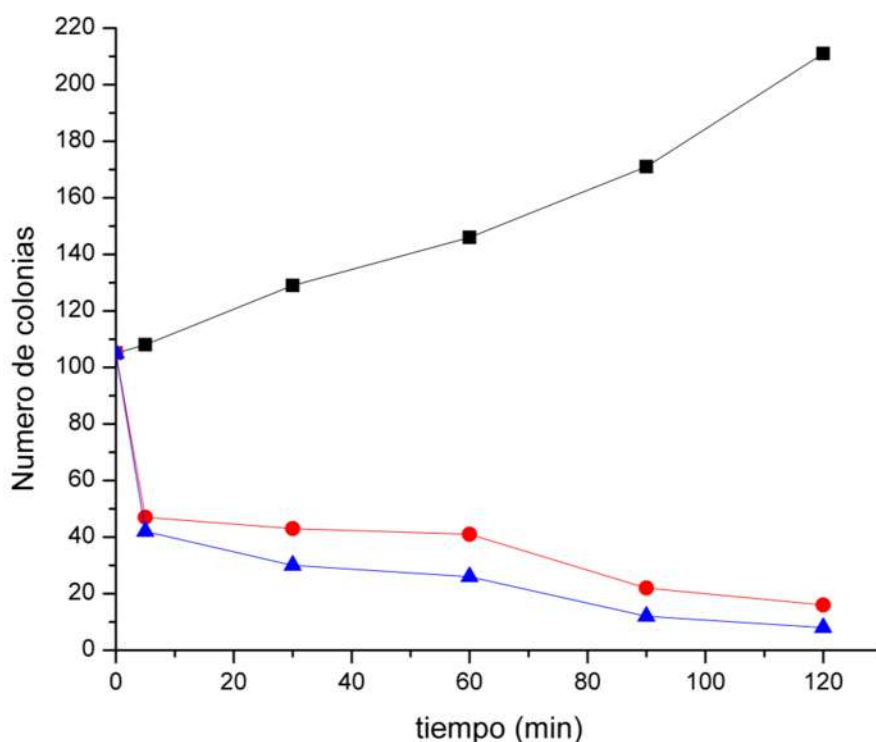


Figura 21. Efecto inhibitorio de (—■—) Morde, (—●—) MordeAu-500-1.7 y (—▲—) MordeAu-500-2.9 a CMI₅₀ de 6.6×10^{-3} g/mL sobre el crecimiento de *E. coli*.

En la figura 22 se presentan las curvas del número de colonias de *E. coli* en función del tiempo en presencia de los materiales Fauja y FaujaAu-500-2.1. Los resultados de las evaluaciones de crecimiento bacteriano indican que la *E. coli* fue capaz de tolerar la presencia del material Fauja, por otra parte el material FaujaAu-500-2.1 inhibió por completo el crecimiento *E. coli* en un corto tiempo. De acuerdo con la figura 22, el material FaujaAu-500-2.1, a una CMI de 6.6×10^{-3} g/mL presentó toxicidad, y eliminó el 55% del número de colonias iniciales y el 92% después de 5 y 120min, respectivamente.

Al comparar el poder inhibitorio del crecimiento bacteriano de los materiales FaujaAu-500-2.1 y MordeAu-500-1.7, se observó que ambos tienen una inhibición porcentual similar a los 5 min, sin embargo, el material FaujaAu-500-2.1 presentó mayor inhibición después de este tiempo, esto sugiere que la mayor área específica del material FaujaAu-500-2.1 permite a la bacteria estar más fácilmente en contacto con el material y así se elimina más rápido.

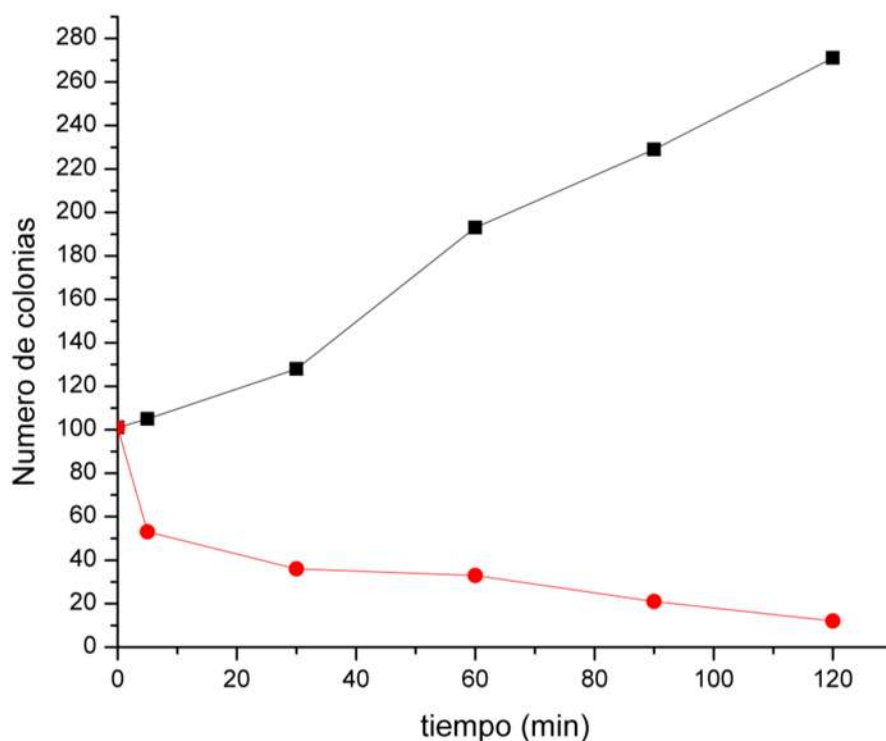


Figura 22. Efecto inhibitorio de (—■—) Fauja y (—●—) FaujaAu-500-2.1 a CMI de 6.6×10^{-3} g/mL sobre el crecimiento de *E. coli*.

Es importante señalar que, en todas las evaluaciones del sistema como bactericidas de *E. coli*, las colonias adquieren una coloración rosa, lo cual indica que el Au se incorporó a la bacteria, aunque haría falta un estudio que profundice en los mecanismos a través de los cuales tiene lugar este fenómeno. Además este resultado sugiere que el oro se libera del material, lo cual no es del todo satisfactorio para un buen material bactericida. Aún así el material podría utilizarse varias veces y después recargarse de oro.

5.4.4 Soporte-Au como biocidas de *S. typhi*

En la figura 23 se grafica el número de colonias de *S. typhi* que sobrevivieron frente a los materiales Morde, MordeAu-500-1.7 y MordeAu-500-2.9. El material Morde, como se esperaba, no tuvo efecto bactericida. La MordeAu-500-1.7 y la MordeAu-500-2.9 presentaron similitud en la inhibición a los 5 min, eliminando a la bacteria en 52% y 61% respectivamente, demostrando que con una CMI de 5.5×10^{-3} g/mL ambos materiales son bactericidas para *S. typhi*. A diferencia del material MordeAu-500-2.9, el material MordeAu-500-1.7 presentó un comportamiento bacteriostático de los 5 hasta los 60 min, seguida de una moderada inhibición bactericida. El material MordeAu-500-2.9 presentó una inhibición bacteriana moderada entre los 5 y los 90 min, continuando con un bajo poder bactericida. La MordeAu-500-2.9, con mayor concentración de oro, eliminó más rápido a la *S. typhi*. La concentración de Au en ambos materiales no fue suficiente para inhibir por completo el crecimiento de colonias bacterianas en los 120 min del ensayo, sin embargo, ambos materiales eliminaron más del 80% de las colonias del patógeno. La actividad bactericida de los materiales MordeAu-500-1.7 y la MordeAu-500-2.9 para la *S. typhi* fue muy similar en el periodo de evaluación, en ambos casos el número de colonias disminuyó muy rápido en los primeros 5 min y después, en un periodo de 60 min solo disminuye el 8 %.

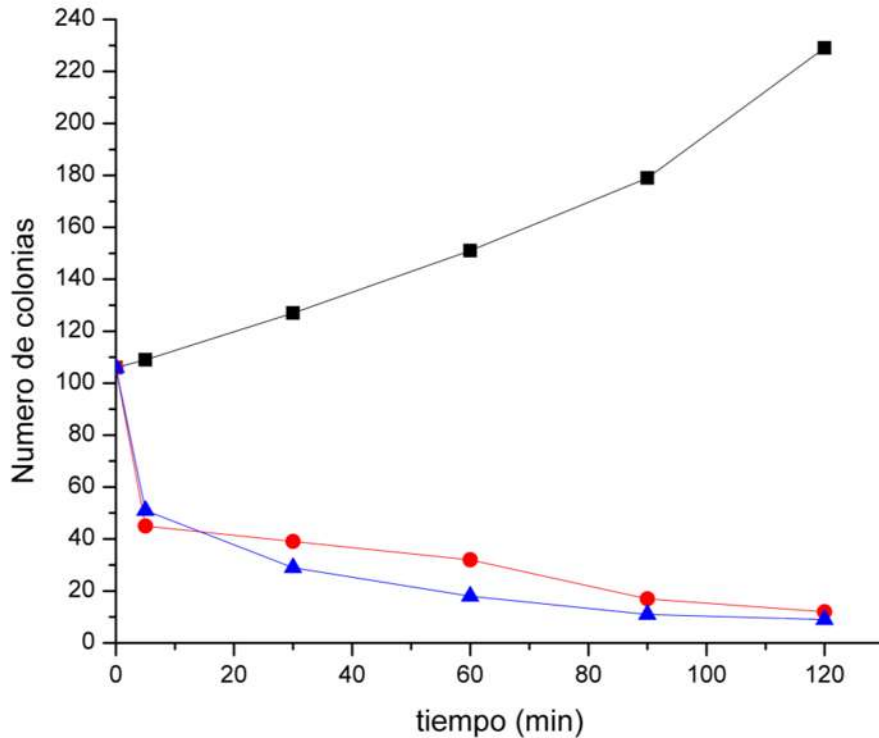


Figura 23. Efecto inhibitorio de (—■—) Morde, (—●—) MordeAu-500-1.7 y (—▲—) MordeAu-500-2.9 a CMI de 5.5×10^{-3} g/mL sobre el crecimiento de *S. typhi*.

En la figura 24 se aprecia que, el material Fauja no inhibió el crecimiento de la *S. typhi*. La curva control demostró que sin la presencia de Au en el soporte no existe inhibición bacteriana.

El crecimiento de *S. typhi* en presencia de FaujaAu-500-2.1, con una CMI de 5.5×10^{-3} g/mL se redujo hasta en un 65% en los primeros 5 min, y a los 30 min ya se había inhibido un 75%. Al cabo de 120 min de exposición se eliminó el 84% de las colonias.

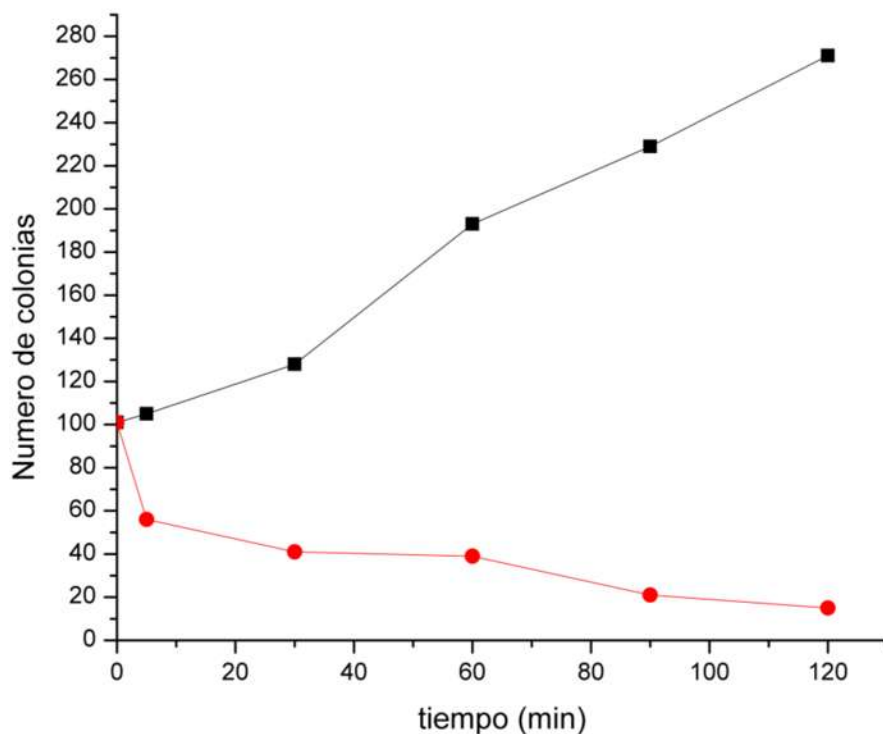


Figura 24. Efecto inhibitorio de (—■—) Fauja y (—●—) FaujaAu-500-2.1 a CMI de 5.5×10^{-3} g/mL sobre el crecimiento de *S. typhi*.

Las curvas de crecimiento bacteriano se repitieron tres veces por material soporte-Au. Los resultados de las curvas corresponden a la media de los tres experimentos. Sólo se incluyen los experimentos en los que la inhibición del inóculo inicial fue superior al 55%. La pauta de administración de los materiales bactericidas está en función de la CMI determinada.

Capítulo 6. Conclusiones y perspectivas

Conclusiones

Las nanopartículas de plata u oro soportadas en el soporte faujasita presentaron un mejor efecto bactericida frente a las bacterias, su mayor área específica permitió una mejor homogeneidad en dispersión y distribución de los tamaños de las nanopartículas como se muestra en las caracterizaciones por MET.

El soporte influencia la morfología de las partículas de plata y oro. Mientras que en los soportes se aglomeran fácilmente las partículas de plata, las del oro tienden a dispersarse, en general, mejor. Los materiales con mayor área específica resultan ser los mejores materiales para dispersar la fase activa metálica.

Los materiales soporte-Ag y soporte-Au son agentes antibacterianos para *E. coli* y *S. typhi*. Su eficacia, reflejada por un radio CMB/CMI menor a 1.2, indica que los materiales son bactericidas y no bacteriostáticos.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) de los materiales varía en función de los soportes, la cantidad de plata u oro soportada en el material y la distribución de ésta en la superficie. El tamaño de las partículas es un parámetro crucial en su eficiencia antibacteriana.

La plata soportada en una matriz zeolítica sintética, en particular en faujasita, fue el mejor biocida para la *E. coli* y *S. typhi*. El oro en el mismo soporte requiere de concentraciones mayores para eliminar totalmente a los microorganismos.

Perspectivas

El tratamiento de aguas industriales, urbanas y de potabilización son algunas de las aplicaciones en las que pueden aplicarse los soportes-Ag y soportes-Au para cumplir con las normas mexicanas NOM-002-SEMARNAT-1996 y NOM-033-SEMARNAT-1997, las cuales aplican en los índices de contaminación orgánica y biológica del agua y con la norma NOM-127-SSA1-1994 relacionada con el consumo de agua.

Los materiales soportes-Ag y soportes-Au presentan las siguientes ventajas como bactericidas:

- Eliminan las bacterias en un único proceso “in situ” a tiempos cortos.
- El proceso se desarrolla a temperatura ambiente.
- Pueden ser usados como tratamiento terciario, en combinación con cualquier otro tipo de tratamiento convencional, lo que permite su fácil integración en procesos de potabilización de agua.
- El efecto bactericida de los materiales en cepas de distintos tipos y con un variado perfil de resistencias, el tiempo mínimo de exposición necesario para alcanzar el efecto antibacteriano y la poca resistencia bacteriana que se desarrolla a los materiales, convierten a estos materiales en elementos con gran potencial para la elaboración de múltiples productos que podrían utilizarse para evitar la propagación de microorganismos resistentes en el ambiente hospitalario, como filtros, recubrimientos, máscaras, y gasas antimicrobianas para las quemaduras. En la industria de alimentos, los materiales servirían de apoyo en la aplicación de bioconservantes alimentarios en la industria láctea y cárnica siendo un punto de partida en la industria de bioconservantes de origen natural.
- Un buen complemento a las ventajas del uso de la plata y el oro es su baja toxicidad y mínimos efectos secundarios.

Bibliografía

- Alberti A., Vezzalini G., Crystal structures of heat-collapsed phases of barrerite. In Natural Zeolites, Occurrence, Properties Use. Sand, L.B. and Mumpton, Eds Pergamon Press, 1978, 85-98.
- Anales de la real academia nacional de medicina, Coloquio sobre contaminación ambiental, Real Academia Nacional de Medicina, España, 1975, 1, 171-178.
- Brock T., Madigan M., Biology of Microorganisms. Ed. Prentice Hall, 5th edition. 1988, 835-842.
- Cho K., Park J., Osaka T., Park S., The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. *Electrochimica Acta*, 2005, 51, 956-960.
- Dalgaard P., Ross T., Kamperman L., Neumeyer K., McMeekin T., Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable count data. *International Journal of Food Microbiology*, 1994, 23, 391-404.
- Dwyer J., Zeolite structure, composition and catalysis, *Chemistry & Industry*, 1984, 7, 258.
- Feng Q., Wu J., Chen G., Cui F., Kim T., and Kim J., A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, *Journal of Biomedical Materials Research*, 2000, 52, 662-668.
- García J., Rodríguez E., Ortiz C., Coutiño R., Efecto bactericida de los derivados de plata coloidal, cal y cloro en lechuga romana sin y con lavado, *Revista Higiene*, 2004, 1,150-161.
- Garry G., Graham G., Champion D., Ziegler J., The cellular metabolism and effects of gold complexes, *Metal Based Drugs* 1, 1994, 395-404.
- Gemmell C., Edwards D., Fraise A. et al., Guidelines for the prophylaxis (and treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections in the UK *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2006, 57, 589-608.
- Kesraoui-Ouki S., Cheeseman C., Perry R., Natural zeolite utilization in pollution control: a review of applications to metals' effluents. *Journal of Chemical*

- Technology and Biotechnology, 1994, 59, 121-126.
- Hugo W., Russell A., Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilisation. 3rd Ed., Blackwell Scientific Publications, 1995, 5-94.
 - Im K., Takasaki Y., Endo A., Kuriyama M., Antibacterial Activity of A Type Zeolite Supporting Silver Ions in Distilled Water. Journal of Antibacterial and Antifungal Agents, 1996, 24, 269-274.
 - Lapotko D., Lukianova E., Potapnev M., Aleinikova O., Oraevsky A., Method of laser activated nanothermolysis for elimination of tumor cells. Cancer Letters 239, 2006, 36-45.
 - Lara H., Ayala-Nuñez N., Ixtapan-Turrent L., Rodriguez-Padilla C., Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 26, 615-621.
 - Meier W., Olson D., Baerlocher Ch., Atlas of Zeolite Structure Type, 4th Revised Edition, 1996.
 - Nataro J., Enteroaggregative Escherichia coli pathogenesis. Current Opinion in Gastroenterology, 2005, 21, 4-8.
 - NMX-AA-42-SCFI-1987. Calidad del agua determinación del número más probable (NMP) de coliformes totales, coliformes fecales (termotolerantes) y Escherichia coli presuntiva. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial, Dirección General de Normas. 2000.
 - NOM-002-SEMARNAT-1996, Norma Oficial Mexicana que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las recargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal, 1998.
 - NOM-033-SEMARNAT-1997, Norma oficial Mexicana que establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reúsen en servicio al público, 1998.
 - Shahverdi A., Fakhimi A., Shahverdi H., Minaian S., Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against Staphylococcus aureus and Escherichia coli, Nanomedicine, 2007, 3, 168-171.