



# UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO



FACULTAD DE QUIMICO FARMACOBIOLOGIA

TESIS

“ANÁLISIS COMPARATIVO IN VITRO DEL GRADO DE INHIBICIÓN  
DE *ESCHERICHIA COLI* REALIZADO CON NANOPARTICULAS DE  
PLATA COLOIDAL Y NANOPARTÍCULAS DE PLATA METÁLICAS”.

QUE PRESENTA

DANTE AGUSTIN TAPIA HERNÁNDEZ

PARA LA OBTENCIÓN DEL TITULO DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

ASESOR

DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS ROBERTO GUERRA GONZÁLEZ

COASESOR

DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS JOSÉ LUIS RIVERA ROJAS

Morelia, Michoacán, Julio del 2015

## AGRADECIMIENTOS

A mis viejos, el Agus y la Yolis por todos los desvelos, y soportar mis malos y buenos ratos. Por siempre apoyarme en cada uno de mis sueños y metas que me eh propuesto en esta vida sin importar aciertos o errores.

A mis hermanas Karla y Citlalli por su apoyo incondicional, y por cada uno de los corajes que a diario me hacen pasar.

A mi asesor el doctor Roberto Guerra por todo el apoyo y la amistad que me a brindado.

A mi co-asesor doctor José Luis Rivera por haber formado parte de este proyecto.

A Tadeo y Vicky por alegrarme la vida cada día.

A mis revisores por tomarse el tiempo para revisar este trabajo y siempre darme los mejores consejos.

A toda la banderola por siempre estar ahí para apoyarme en todo momento en especial a Emma, el char, pollo y zayra.

Agradecer a la Facultad de Ingeniería Química por todo su apoyo en la realización de este trabajo.

Al Laboratorio Estatal por brindarnos su apoyo.

Por ultimo agradezco a todas esas personas que voluntaria e involuntariamente fueron parte esencial de este trabajo.

# Resumen

Se soportaron nanopartículas de plata en zeolitas clinoptilolitas naturales y se evaluaron como bactericidas de microorganismos de *Escherichia coli*. Las variables fueron la cantidad de plata soportada en las zeolitas y la temperatura de reducción. Los materiales se caracterizaron por Difracción de rayos X (DRX) y microscopía electrónica de transmisión (TEM). Los microorganismos se incubaron en caldo 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 tan pequeñas como 0.06 g, con una concentración de 4% en peso de plata, eliminaron todas las colonias de *Escherichia coli* presentes en 18 ml de caldo cultivo a tiempos tan cortos como 30 minutos.

Palabras claves: Zeolita clinoptilolita; plata; *Escherichia coli*.

# Abstract

Silver nanoparticles supported on natural clinoptilolite zeolites were tested as bactericides of microorganisms of *Escherichia coli*. The content of silver and the reduction temperature was varied. The materials were characterized by X-ray diffraction (XRD) and transmission electron microscopy (TEM) techniques. Incubation of microorganisms was performed in tripticaseina soya broth, using selective agar for detection and quantification. The number of colony forming units (CFU) was determined by the technique of counting colonies and measurement of area. A minor amount of Ag zeolite (0.06 g) which contained 4% wt of silver, eliminated completely the colonies of *Escherichia coli* present in 18 mL of broth for times as short as 30 minutes.

Keywords: Zeolite clinoptilolite; Silver; *Escherichia coli*.

## Índice general

<b>1. Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Antecedentes</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1 <i>Escherichia coli</i></b> .....	<b>5</b>
<b>2.2 Desinfección microbiológica del agua</b> .....	<b>6</b>
2.2.1 Desinfección por cloración.....	6
2.2.2 Purificación por ozono.....	6
2.2.3 Desinfección por rayos ultravioleta.....	6
2.2.4 Desinfección con nanopartículas de plata.....	7
<b>2.3 Plata iónica como bactericida</b> .....	<b>7</b>
<b>2.4 Plata como antibiótico</b> .....	<b>10</b>
<b>2.5 Mecanismos de la plata como bactericida</b> .....	<b>10</b>
<b>2.6 Interacción bacteria-metal</b> .....	<b>11</b>
<b>2.7 Partículas de Ag soportadas como bactericidas</b> .....	<b>14</b>
<b>2.8 Zeolitas</b> .....	<b>14</b>
2.8.1 Zeolita clinoptilolita.....	15
<b>3. Justificación</b> .....	<b>17</b>
<b>4. Objetivos</b> .....	<b>19</b>
4.1 Objetivo general.....	19
4.2 Objetivos particulares.....	19
<b>5. Hipótesis</b> .....	<b>19</b>
<b>6. Metodología</b> .....	<b>20</b>
<b>6.1 Materiales</b> .....	<b>20</b>
6.1.1 Síntesis de plata coloidal.....	20
6.1.2 Preparación de la clinoptilolita como Soportes.....	20
6.1.3 Soportes-Ag.....	20
<b>6.2 Materiales biológicos</b> .....	<b>21</b>
6.2.1 Preparación de caldos nutritivos.....	21
6.2.2 Preparación de placas con agar.....	21
6.2.3 Cepas bacterianas.....	22
6.2.4 Turbidez estándar para la preparación del inóculo.....	22
6.2.5 Preparación de los inóculos.....	22
<b>6.3 CMI y CMB de los materiales como bactericidas</b> .....	<b>22</b>
<b>6.4 Crecimiento bacteriano en presencia de los materiales</b> .....	<b>24</b>
<b>6.5 Caracterización de los materiales</b> .....	<b>25</b>
6.5.1 Difracción de rayos-X.....	25
6.5.2 Microscopía electrónica de transmisión.....	26

## INDICE

<b>7. Resultados y discusiones</b> .....	<b>27</b>
7.1 Difractograma de rayos X de los materiales Ag/CliX-Y .....	27
7.2 Tamaño de partículas de plata en los materiales Ag/CliX-Y .....	28
7.3 CMLs y CMBs de las NPAg y los materiales Ag/CliX-Y .....	29
7.4 Pruebas microbiológicas para evaluar la inhibición .....	31
<b>8. Conclusiones</b> .....	<b>37</b>
<b>9. Perspectivas</b> .....	<b>38</b>
<b>10. Bibliografía</b> .....	<b>39</b>

## Índice de tablas

Tabla 6.1. Contenido de Ag en los materiales soporte-Ag .....	<b>21</b>
Tabla 7.1. CMLs de las NPAg y los materiales Ag/CliX-Y para eliminar <i>E. coli</i> .....	<b>30</b>
Tabla 7.2. Número de colonias de <i>E. coli</i> que sobrevivieron frente a NPAg .....	<b>34</b>
Tabla 7.3. Número de colonias de <i>E. coli</i> que sobrevivieron frente a los materiales evaluados como biocidas .....	<b>34</b>

## Índice de figuras

Figura 2.1 (a) Estructura de la zeolita clinoptilolita, (b) anillos de 8 y 10 tetraedros que forman las ventanas de los canales .....	<b>16</b>
Figura 6.1 Esquema para la determinación de la CMI y CMB. ....	<b>25</b>
Figura 7.1. Patrones de difracción de rayos X de las muestras Ag/CliX-Y .....	<b>28</b>
Figura 7.2 Histogramas de distribución de tamaño de partícula de Ag/CliX-Y: a) Ag/Cli400-2.8 b) Ag/Cli400-4.5 c) Ag/Cli500-2.8 y d) Ag/Cli500-4.5. ....	<b>29</b>
Figura 7.3. Antibiograma en medio líquido de <i>E. coli</i> frente a Ag/CliA500-4.5 a CMLs de: a) $2.2 \times 10^{-3}$ , b) $3.3 \times 10^{-3}$ , c) $4.4 \times 10^{-3}$ , d) $5.5 \times 10^{-3}$ y e) $6.6 \times 10^{-3}$ .....	<b>31</b>
Figura 7.4 Antibiograma en medio sólido de <i>E. coli</i> frente a Ag/Cli500-2.8, CMBs de: a) $2.2 \times 10^{-3}$ , b) $3.3 \times 10^{-3}$ , c) $4.4 \times 10^{-3}$ y d) $5.5 \times 10^{-3}$ .....	<b>32</b>
Figura 7.5 Efecto inhibitorio de la <i>E. coli</i> con los materiales Ag/CliX-Y .....	<b>33</b>
Figura 7.6 Efecto inhibitorio de las NPAg sobre el crecimiento de <i>E. coli</i> .....	<b>35</b>
Figura 7.7 Efecto inhibitorio de los materiales Ag/CliX-Y sobre el crecimiento de <i>E. coli</i> .....	<b>35</b>

# 1. Introducción

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

La actividad antimicrobiana de especies de plata, los iones en particular, está bien documentada y se ha utilizado durante mucho tiempo para el tratamiento de heridas (Hugo W., 1995; Demling R., 2001). Por ejemplo, las soluciones de  $\text{AgNO}_3$  se han utilizado con frecuencia para el tratamiento de quemaduras.

El área superficial de las partículas metálicas en contacto con las bacterias, está directamente relacionada con su eficiencia como bactericida. Por lo tanto, el área superficial de las partículas de Ag será primordial. Por ejemplo, la alta superficie específica y alta proporción de átomos de la superficie de las partículas de plata da lugar a una gran actividad bactericida, si se compara con el metal de plata a granel (Chmielewska D., 2006). Además, la plata cuando se usan en cantidades razonables, no tiene efectos negativos en el cuerpo humano. En el ámbito de la catálisis, a fin de maximizar la superficie activa los catalizadores están frecuentemente compuestos por un metal (fase activa) soportado en una estructura inorgánica. Por tanto, esta estrategia podría utilizarse para preparar

## Introducción

partículas de plata soportadas, capaz de inhibir el crecimiento de patógenos, ya sea añadiéndolos directamente en agua o incorporándolos en varios materiales.

Teniendo en cuenta estas aplicaciones, se inició este trabajo con el objetivo de estudiar la eficiencia de la plata soportada en zeolitas como sistemas para evitar el desarrollo bacteriano. Se ha seleccionado la clinoptilolita como soporte ya que puede variar fácilmente sus propiedades físico-químicas. La plata iónica con y sin soporte se probaron como bactericidas de *Escherichia coli* (*E. coli*) y así poder obtener cualitativamente la capacidad bactericida con la que cuenta.



## 2. Antecedentes

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

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

La contaminación puede proceder de dos orígenes, de fuentes naturales y la que se debe a la actividad humana.

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

El uso de aguas residuales en la agricultura presenta beneficios asociados al mejoramiento de la fertilidad de los suelos agrícolas por el aporte de materia orgánica, macronutrientes (N y P) y oligoelementos, como Na y K, permitiendo reducir, y en algunos casos eliminar, la necesidad del uso de fertilizantes químicos y trayendo beneficios económicos al sector (van der Hoek, Feenstra y Konradsen 2002).

## Antecedentes

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

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

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

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

Se debe de tener en cuenta que 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 para

## Antecedentes

el 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).

### **2.1 *Escherichia coli*.**

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

Es una de las especies bacterianas más minuciosamente estudiadas, y no solamente por sus capacidades patogénicas, sino también como sustrato y modelo de investigaciones metabólicas, genéticas, poblacionales y de diversa índole (Neidhardt 1999).

Se trata de bacterias de rápido crecimiento y amplia distribución en el suelo, el agua, vegetales y gran variedad de animales.

Son bacilos gram negativos poco exigentes en sus necesidades nutritivas y relativamente resistentes a los agentes externos, fermenta la lactosa y la glucosa, con producción de gas y ácidos diversos, presenta diferentes factores de virulencia (por ejemplo, adhesinas, invasinas, y toxinas) que son responsables de una amplia gama de enfermedades diarreicas (Nataro J., 1998).

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

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

## **2.2 Desinfección microbiológica del agua.**

La desinfección es la destrucción de los microorganismos patógenos del agua ya que su presencia en el líquido es perjudicial para la salud. Existen diferentes desinfectantes, que pueden eliminar o desactivar los microorganismos patógenos. Entre estos están el cloro o sustancias que contienen cloro, ozono y rayos UV y plata entre otros.

### **2.2.1 Desinfección por cloración.**

Este proceso de higienización, es el más utilizado en la actualidad debido a su bajo costo, emplea como agente desinfectante cloro o compuestos clorados que causan alteraciones físicas, químicas y bioquímicas en la pared celular, de esta forma se destruye la barrera protectora de la célula dejándola indefensa y disminuyendo sus funciones vitales hasta llevarla a la muerte. Una de las principales desventajas del uso de cloro y derivados es que reacciona con mucha materia orgánica y da lugar a compuestos trihalometanos (THMs) muchos de los cuales se ha demostrado son tóxicos o carcinogénicos. Otro inconveniente es la formación de cloro fenoles en aguas que contienen fenoles, lo que daría lugar a malos olores.

### **2.2.2 Purificación por ozono.**

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

### **2.2.3 Desinfección por rayos ultravioleta.**

En este método se utilizan ondas cortas de radiación ultravioleta que inciden sobre el material genético (ADN) de los microorganismos y los virus, destruyéndolos en

## Antecedentes

corto tiempo, sin producir cambios físicos o químicos notables en el agua tratada, sin embargo tiene como desventaja que la luz ultravioleta no proporciona residuales. Esto quiere decir que después de la desinfección por este sistema hay que aplicar un compuesto químico para garantizar la seguridad microbiológica.

### **2.2.4 Desinfección con nanopartículas de plata.**

La plata ha sido conocida desde tiempos inmemoriales como un efectivo agente antimicrobial, los compuestos que la contienen se han usado para prevenir el ataque de microorganismos en catéteres, tejidos humanos, entre otros. Las diferentes propiedades que presentan las nanopartículas de plata son bactericidas, coloración, reactividad y relación área/volumen, las cuales dependen de su forma y tamaño.

Los Bio-nanocompositos representan un grupo de nanoestructuras que son formados por la combinación de polímeros naturales y de sólidos inorgánicos.

La síntesis in situ de nanopartículas de metales nobles (Ag, Au, Pt, Pb), se lleva a cabo bajo condiciones ambientales; usando los poros de los soportes como nano reactores. Este método consiste básicamente en la deposición de iones metálicos sobre la matriz, que en este caso corresponde a la zeolita, seguido por la reducción de estos iones metálicos, generando las nanopartículas que iniciarán a depositarse sobre los nanoporos del soporte.

### **2.3 Plata iónica como bactericida.**

La plata se usa actualmente en filtros de carbón activado para purificar el agua o evitar su contaminación. Las sales de plata poseen efectos bactericidas y fungicidas, además son efectivas como agente antiviral. Tienen afinidad por los grupos sulfhidrilos de los sistemas enzimáticos de la pared celular bacteriana, a través de la cual interfieren en la transferencia de energía transmembrana y en el transporte de electrones (Murray R., 2010). Las sales de plata, como el nitrato, se usan como antiséptico y astringente dermatológico; el sulfato de plata, por su parte, se usa en el tratamiento de quemaduras y heridas abiertas (Landeem K., 1989). La plata iónica ha demostrado una actividad antimicrobiana muy alta frente a bacterias Gram negativas y moderada frente a bacterias Gram positivas. La

## Antecedentes

sulfadiazina de plata, un compuesto polimérico insoluble que libera plata lentamente, actúa como bactericida a la mayoría de las bacterias Gram positivas, Gram negativas y levaduras, por lo que se aplica en forma de crema como fungicida y antimicrobiano en quemaduras severas (Sadler P., 1991).

De manera general, las sales de plata tienen como sitio de acción los constituyentes citoplasmáticos y la interacción con grupos sulfhidrilo y amino, mediante mecanismos de coagulación general, ataque a los ácidos nucleicos, y a los ribosomas (Maillard J., 2002).

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

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

Los iones de plata eliminan a la mayoría de las bacterias, hongos, virus y protozoos, aunque son menos activos frente a las esporas (Russell A., 2003),

## Antecedentes

tienen afinidad por el ADN tanto bacteriano como eucariótico, donde interactúan preferentemente con las bases nitrogenadas más que con los grupos fosfato (McDonnell G., 1999).

En altas concentraciones, los iones  $\text{Ag}^+$  reaccionan con los grupos donadores de electrones, e inhiben la mayoría de las reacciones enzimáticas. El intercambio de sodio ( $\text{Na}^+$ ) en la enzima ubiquinona oxidoreductasa o complejo I (complejo multienzimático que cataliza la transferencia de electrones en la cadena respiratoria) ha sido reconocido como uno de los primeros blancos de los iones de plata. La adición de concentraciones micromolares de  $\text{Ag}^+$  fuera de la membrana induce un colapso total de una amplia variedad de bacterias (Dibrov P., 2002).

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

La forma soluble de la plata es la más tóxica para las bacterias. Sin embargo, tanto el medio ambiente como los medios de cultivo pueden inducir la formación de complejos con  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  o  $\text{Cl}^-$ , disminuyendo así la forma activa que inhibe el crecimiento bacteriano. La plata iónica mata células bacterianas sensibles por efectos en la superficie de la membrana celular, inhibiendo la respiración celular y desacoplando la síntesis de ATP (Belliveau B., 1987).

Se ha reportado que la eficiencia del material bactericida depende del tipo de microorganismo. En estudios con coliformes totales (Gram negativa) y *Staphylococcus aureus* (Gram positiva), se reportó que la elevada eficiencia bactericida de las partículas de plata para coliformes totales se debe a la diferencia de las estructuras de la pared de la célula en microorganismo Gram

## Antecedentes

negativo y Gram positivo (Sondi I., 2004). Sin embargo, no hay suficiente evidencia para soportar dichas conclusiones debido a que la mayoría de las investigaciones sobre el efecto bactericida de nanopartículas sólo se ha hecho en un número muy limitado de cepas (Sondi I., 2004; Cho K., 2005).

### **2.4 Plata como antibiótico.**

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

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

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

### **2.5 Mecanismos de la plata como bactericida.**

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



## Antecedentes

provocando que la membrana pierda permeabilidad; la bacteria no es capaz, entonces, de efectuar procesos de respiración y muere (Feng Q., 2000).

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

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

### **2.6 Interacción bacteria-metal.**

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

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

## Antecedentes

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

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

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

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

## Antecedentes

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

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

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

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

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

## Antecedentes

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

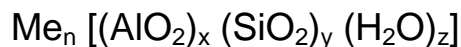
### **2.7 Partículas de Ag soportadas como bactericidas.**

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

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

### **2.8 Zeolitas.**

Las zeolitas y los materiales zeolíticos son sólidos cristalinos microporosos que contienen cavidades y canales de dimensiones moleculares (de 3 a 20 Å), 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):



## Antecedentes

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

Las zeolitas se utilizan a nivel industrial en procesos de adsorción, de separación de gases, de catálisis e intercambio iónico (Bekum H., 1991). La estructura de las zeolitas se basa en tetraedros covalentes  $TO_4$  en los que el átomo T suele ser Si, Al o Ti. Los tetraedros se unen por los átomos de oxígeno formando una red tridimensional con canales y cavidades lo suficientemente grandes como para albergar cationes y algunas moléculas pequeñas tales como agua o algunos hidrocarburos. La sustitución isomórfica de átomos de silicio por átomos de aluminio genera un exceso de carga negativa que se neutraliza por cationes. Estos cationes ocupan posiciones poco estables y esto le confiere a la zeolita su capacidad de intercambio catiónico. La regla de Löwenstein establece que en una estructura zeolítica no pueden haber uniones Al-O-Al, es decir dos tetraedros  $[AlO_4]$  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.

### **2.8.1 Zeolita clinoptilolita.**

Desde el punto de vista mineral, la clinoptilolita y la heulandita pertenecen al grupo heulandita. Son cristales monoclinicos isoestructurales del grupo espacial  $C2/m$  a temperatura ambiente. Los parámetros de su celda unitaria son aproximadamente los siguientes:  $a = 17.67 \text{ \AA}$ ,  $b = 17.87 \text{ \AA}$ ,  $c = 7.41 \text{ \AA}$ , y  $\beta = 116.39^\circ$ . La clinoptilolita presenta tres tipos de canales limitados por el sistema de anillos tetraédricos. Los canales a y b con ventanas de anillos de 10 y 8 tetraedros respectivamente. Los canales a y b están interconectados por el canal c que está formado por sistemas

## Antecedentes

de anillos de 8 miembros y que corre paralelo a [100] y [102]. Las dimensiones de los canales de una zeolita tipo HEU 9 son: en la dirección [001] para el anillos de 10 tetraedros  $3.1 \times 7.5 \text{ \AA}$  (figura 2.1 a) y para el anillos de 8 tetraedros  $3.6 \times 4.6 \text{ \AA}$  (figura 2.1 b) y en la dirección [100] para el anillos de 8 tetraedros  $2.8 \times 4.7 \text{ \AA}$ .

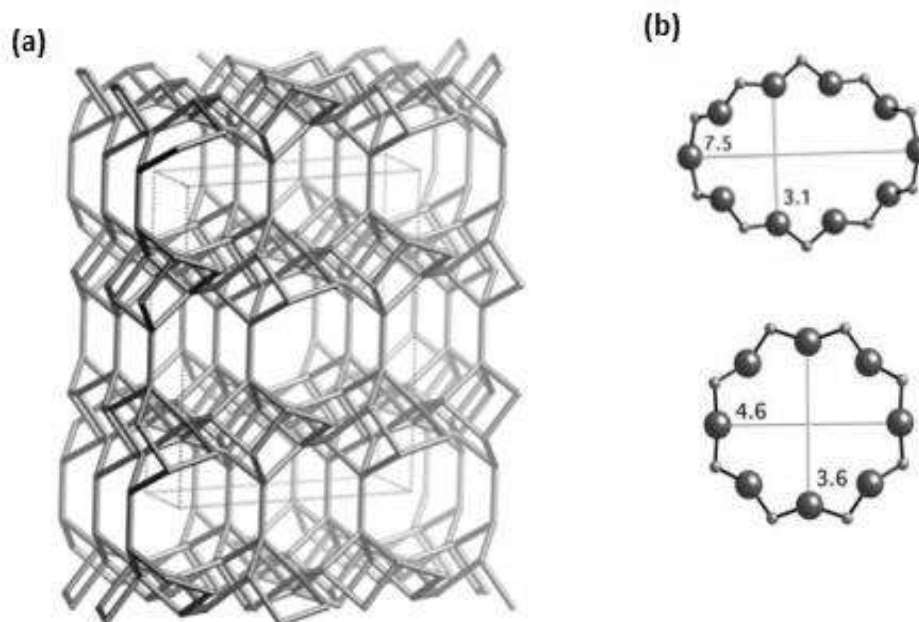


Figura 2.1 (a) Estructura de la zeolita clinoptilolita, (b) anillos de 8 y 10 tetraedros que forman las ventanas de los canales.

### 3. Justificación

La contaminación microbiológica de las aguas de consumo humano impacta negativamente a la salud de la población. Los riesgos epidemiológicos, relacionados con el consumo de agua contaminada por microorganismos virulentos son causales 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 investigaciones dirigidas a la búsqueda de otras alternativas para el tratamiento de las infecciones causadas por bacterias y virus resistentes se incrementan cada día. Dentro de la gama de compuestos cuya actividad bactericida se está investigando, las nanopartículas de plata surgen como un prometedor agente antibacteriano que podría ser utilizado para enfrentarnos a esta y otras bacterias resistentes a los antibióticos.

En diversos estudios se han observado las propiedades antimicrobianas de las nanopartículas de plata tanto en virus como en bacterias. Se ha determinado que las nanopartículas de plata tienen efecto en bacterias gram negativas como *Escherichia coli* y *Salmonella typhi* (R. Guerra et al., 2011) y, Gram positivas como

## Justificación

*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* (Shrivastava et al., 2007) y *Enterococcus faecalis* (Panacek et al., 2006).

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

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



## 4. Objetivos

### 4.1 Objetivo general.

- Comparar la eficiencia de las nanopartículas de plata soportadas en zeolita clinoptilolita respecto a la plata iónica comercial (NPAg) como inhibidoras del crecimiento de *E. coli*.

### 4.2 Objetivos particulares.

- Evaluar el poder bactericida de la plata iónica comercial vs plata soportada en clinoptilolita.
- Estudiar el efecto de la forma y tamaño de las nanopartículas plata en el soporte.

## 5. Hipótesis.

La plata metálica soportada en materiales porosos a diferencia de la plata coloidal, podrá ser reutilizada en los tratamientos de inhibición de bacterias. La clinoptilolita es una zeolita que puede variarse fácilmente sus propiedades físico-químicas. La plata soportada en zeolitas tipo *clinoptilolita* tiene propiedades bactericidas para *E. coli*.

## 6. Metodología

### 6.1 Materiales.

Se prepararon una serie de materiales de Clinoptilolita con diferentes concentraciones en peso de plata, utilizando como precursor nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ). Para favorecer la reducción de la plata y la incorporación del metal, los materiales se sometieron a tratamientos térmicos en flujo de  $\text{H}_2$  a 400 o 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. Los reactivos utilizados para la impregnación o síntesis fueron grado reactivo (Sigma Aldrich).

#### 6.1.1 Síntesis de plata coloidal.

5 mL de  $\text{AgNO}_3$  1.0 mM fueron agregados gota a gota (una gota por segundo) a 15 mL de  $\text{NaBH}_4$  2.0 mM colocados en un baño de hielo, bajo agitación vigorosa. La solución toma un color amarillo intenso al finalizar la adición de  $\text{AgNO}_3$ , después del cual la agitación es concluida. La reacción se realizó en medio acuoso (agua bidestilada).

#### 6.1.2 Preparación de la clinoptilolita como Soportes.

Se molió y tamizó (0.15 mm) una toba rica en clinoptilolita, procedente de Etlá, Oaxaca, en el sureste de México. Con el fin de homogeneizar su capacidad de intercambio catiónico, la zeolita se convirtió a la forma homoiónica de sodio: el material de zeolita se trató con una solución 5 M de  $\text{NaCl}$  por 8 días, se lavó con agua desionizada hasta que no hubo presencia de iones cloruro. La clinoptilolita tratada con  $\text{Na}^+$  se secó a 80°C por 12 h.

#### 6.1.3 Soportes-Ag.

5 g de zeolita clinoptilolita sódica se agitaron por 3 h en 100 mL de solución 0.1 M o 0.05 M de  $\text{AgNO}_3$ . Las muestras se separaron por centrifugación y se

## Metodología

secaron a 80°C. Posteriormente, nanopartículas de plata depositada en las muestras se redujeron en flujo de H<sub>2</sub> a 400 o 500°C (5 mL/min) por 4 h. La tabla 6.1 resume las muestras en estudio, la nomenclatura adoptada es Ag/CliX-Y, donde X es la temperatura de reducción y Y es la cantidad de plata (% en peso), según se determinó por espectroscopia de absorción atómica.

Tabla 6.1. Contenido de Ag en los materiales soporte-Ag.

Muestra	Temperatura de reducción (°C)	Contenido Ag* (% peso)
Ag/Cli400-2.8	400	2.8
Ag/Cli500-2.8	500	2.8
Ag/Cli400-4.5	400	4.5
Ag/Cli500-4.5	500	4.5

\*Determinado por espectroscopia de absorción atómica.

## 6.2 Materiales biológicos.

### 6.2.1 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 10 mL de caldo en tubos de ensaye con tapa rosca, en condiciones asépticas.

El caldo de Müeller-Hinton se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante y suplementado con Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>, ajustando a una concentración final de 25 mg de Ca<sup>2+</sup>/L y 12.5 mg de Mg<sup>2+</sup>/L de caldo.

### 6.2.2 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 (en forma estéril bajo campana de flujo laminar con luz ultravioleta). Se vertieron 20 ml de los preparados en cajas Petri de 100 mm de diámetro, para dar un espesor uniforme de aproximadamente 5 mm. Las placas se dejaron solidificar a temperatura ambiente, evitando la acumulación de gotas de condensación en la tapa. Las placas preparadas se envolvieron en plástico, para minimizar el secado de los agares, y se almacenaron en refrigerador a 4°C.

### **6.2.3 Cepas bacterianas.**

Se utilizaron cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*) con el número de Colección de Cepas Americana en inglés American Type Culture Collection (ATCC) 14028. Las cepas en estudio, fueron proporcionadas por el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Michoacán siguiendo los lineamientos aplicables, las cuales se hicieron crecer en tubos en plano inclinado de agar soya tripticaseína a 37°C por 24 h y se resembraron cada 12 h por 5 días para garantizar la fase exponencial de crecimiento. Estas cepas fueron conservadas a 4°C, con el fin de mantener la viabilidad. Se realizó coloración de Gram para verificar pureza de las cepas de *E. coli*, observando su morfología en microscopio óptico.

### **6.2.4 Turbidez estándar para la preparación del inóculo.**

Para estandarizar la densidad del inóculo se usó una suspensión de sulfato de bario como estándar de turbidez (0.5 de la escala de Mc Farland). Las pruebas de turbidez se realizaron en un espectrofotómetro UV-Vis Varian Cary 2000. Se midió la absorbancia a 625 nm, incubándose bajo las mismas condiciones hasta alcanzar un crecimiento en un rango entre 0.7-0.8 de densidad óptica. Los estándares se mantuvieron guardados a temperatura ambiente al abrigo de la luz.

### **6.2.5 Preparación de los inóculos.**

Para la preparación de los inóculos se tomaron 3 colonias aisladas del mismo tipo de morfología de las cepas mantenidas en cuñas de agar soya tripticaseína, y se hicieron crecer en tubos con 5 mL de caldo de soya tripticaseína a 37°C hasta alcanzar la turbidez estándar. Esta suspensión contendrá aproximadamente  $1 \times 10^8$  UFC/mL de *E. coli*. Los inóculos se resembraron cada 12 h por 5 días para confirmar la fase exponencial de crecimiento. Estas cepas fueron conservadas a 4°C, con el fin de mantener la viabilidad.

## **6.3 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) de los materiales como bactericidas.**

Para valorar la capacidad bactericida de los materiales se empleó la técnica de ensayo de dilución en caldo Müller-Hinton (MH), la cual proporcionó información

## Metodología

preliminar acerca de la actividad antimicrobiana. Las pruebas de dilución en agar, se llevaron a cabo de acuerdo con el manual de procedimientos para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos en bacterias aisladas del CLSI de 2006. La relación inicial para los ensayos de la inhibición fue de 10mg/mL.

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

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

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

#### **6.4 Crecimiento bacteriano en presencia de los materiales.**

Se determinó el crecimiento de las bacterias en presencia de los materiales propuestos como biocidas. Para ello, se valoró la capacidad bactericida de los materiales en relación con el tiempo y la CMB promedio. Se enfrentó un inóculo normalizado a concentraciones fijas de antimicrobiano en un caldo. Se inoculó 0.5 mL de muestra de los sistemas líquidos con bacterias (*E. coli*), en 10 mL de caldo de soya tripticaseína contenido en tubos de ensaye con tapa rosca. Se agregó una cantidad de material biocida (cantidad determinada como CMB promedio) a cada tubo incubándose a 37°C con agitación a 30 rpm. Se tomaron muestras a diferentes tiempos (0, 5, 15, 30, 60, 90 y 120 min). La muestra tomada se sembró en cajas Petri con 20 mL de agar MacConkey por la técnica de estriado en placa. Como control, una placa se inoculó con cultivo sin material bactericida, al comienzo y al final. Las placas se incubaron invertidas a 37°C por 24 h en atmósfera aeróbica y se realizó el conteo de colonias.

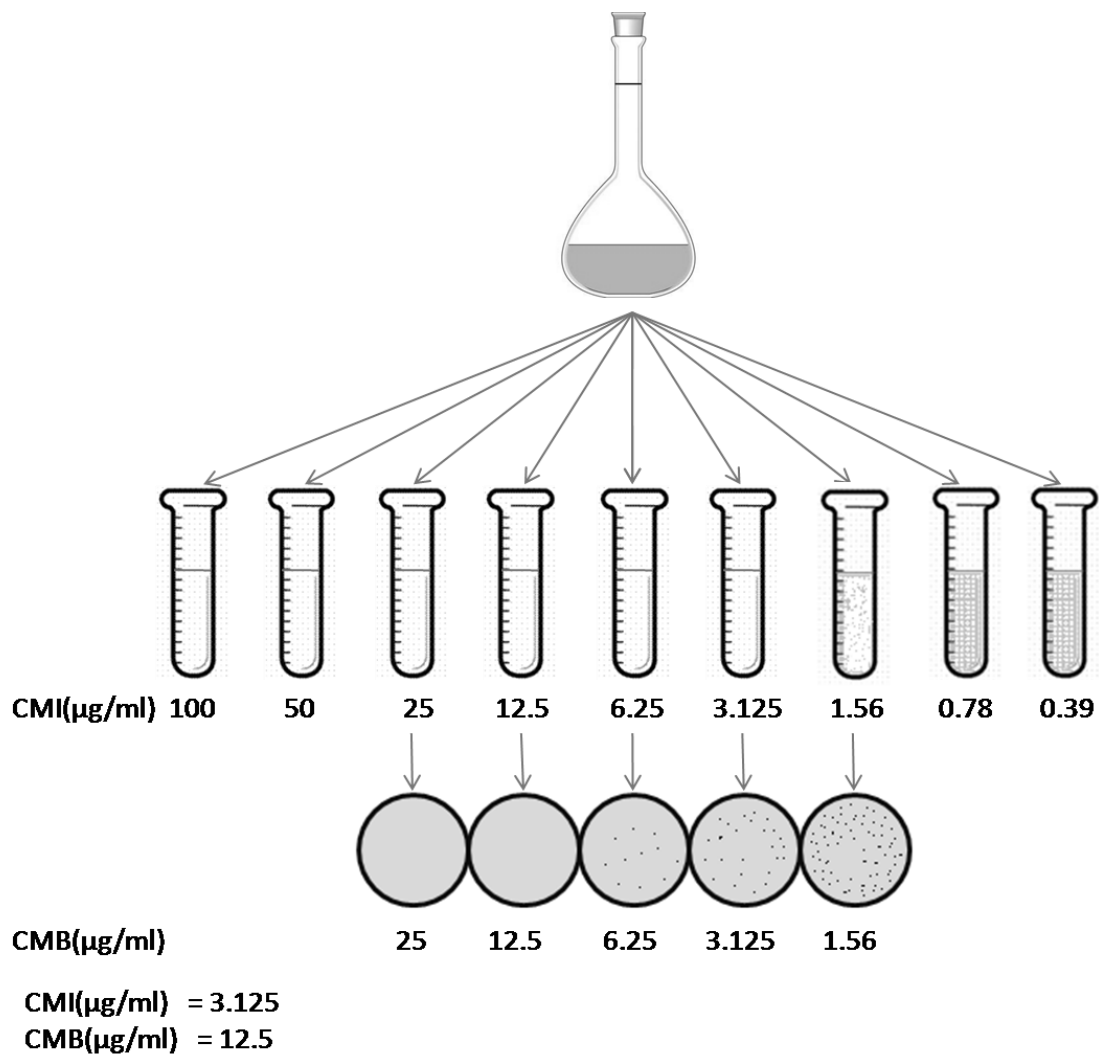


Figura 6.1 Esquema para la determinación de la CMI y CMB.

## 6.5 Caracterización de los materiales

### 6.5.1 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  $0.70930 \text{ \AA}$ ) se seleccionó con un monocromador de haz difractado.

### **6.5.2 Microscopía electrónica de transmisión.**

Los materiales se enviaron para su caracterización por microscopía electrónica de transmisión (TEM) al Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM, donde observaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOLJEM-3000F equipado con un procesador de imágenes (TEM). El voltaje de operación fue de 300kV, y la resolución fue de 0.20nm. 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).



## 7. Resultados y discusiones

### 7.1 Difractograma de rayos X de los materiales Ag/CliX-Y.

La figura 7.1 muestra los patrones de difracción de rayos X (DRX) de cuatro muestras Ag/CliX-Y. Todos los difractogramas exhiben los picos asociados a la zeolita clinoptilolita. Los picos etiquetados como Pt corresponden a los planos característicos del platino, debido al porta muestras. Las muestras con plata presentan picos estrechos bien definidos, atribuibles a plata metálica, etiquetados con Ag. A mayor cantidad de plata, más intenso fue el pico DRX de Ag. No se observaron diferencias significativas, entre las muestras con el mismo contenido de plata reducida a una temperatura diferente. Estos resultados indican claramente que la estructura de la zeolita se conservó después de la deposición de plata. Con el aumento de la cantidad de plata, las partículas pequeñas se aglomeran para formar otras más grandes, que se localizan principalmente en la superficie de la zeolita.

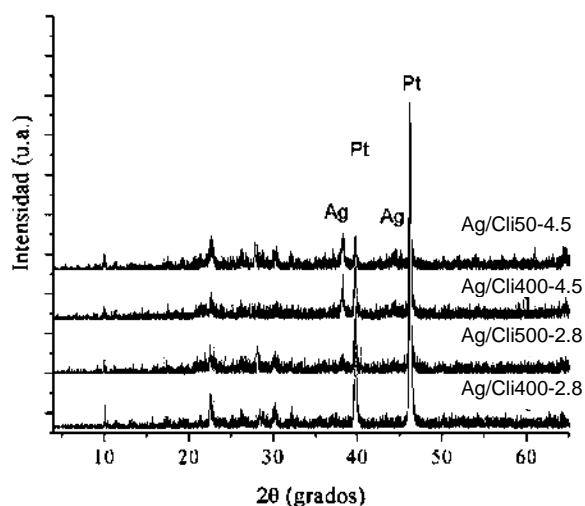


Figura 7.1. Patrones de difracción de rayos X de las muestras Ag/CliX-Y.

## 7.2 Tamaño de partículas de plata en los materiales Ag/ClIX-Y.

La distribución de tamaño de las partículas se calculó por microscopía electrónica de transmisión (MET). En la figura 7.2 se muestran los histogramas de las muestras de clinoptilolita preparadas con diferentes cantidades de Ag y a diferentes temperaturas de reducción. En la muestra reducida a 400°C con la menor cantidad de plata se obtuvo una distribución multimodal observándose partículas de 3 hasta 15 nm, con la mayor parte de las partículas de 12 nm de diámetro. Cuando la temperatura de reducción fue 500°C se observaron partículas de 3 hasta 20 nm, predominando partículas de 7, 10 y 15 nm (diámetro). De los histogramas de distribución de tamaño se percibe que el tamaño de las partículas es dependiente del contenido de Ag y la temperatura de reducción. Un aumento en la concentración de metal genera partículas más grandes. En las muestras reducidas a 400°C el diámetro de partícula predominante aumenta de 12.5 a 17.5 nm aumentando el contenido de Ag de 2.8 a 4.5 %.

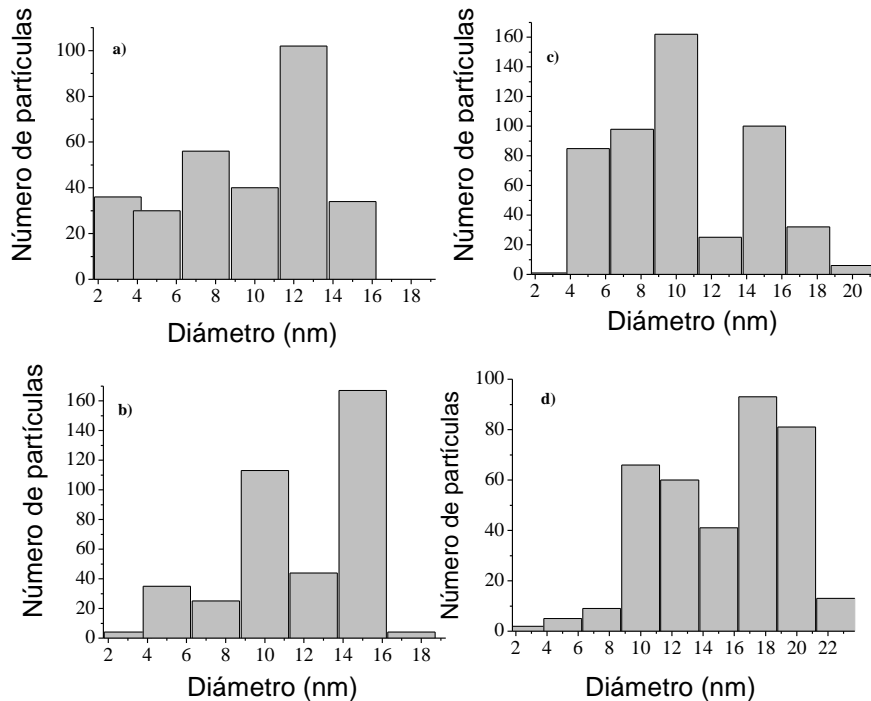


Figura 7.2 Histogramas de distribución de tamaño de partícula de Ag/ClIX-Y:  
a) Ag/Cl400-2.8 b) Ag/Cl400-4.5 c) Ag/Cl500-2.8 y d) Ag/Cl500-4.5.

## Resultados

### 7.3 CMI y CMBs de las NPAg y los materiales Ag/ClX-Y.

En la tabla 7.1, se muestran los valores de las CMI y CMBs de los materiales como inhibidores de la *E. coli*, utilizando el método de diluciones y siembra en agar. La reproducibilidad se hizo por triplicado para cada cepa bacteriana. Los valores reportados son el promedio de las CMI y CMBs para cada prueba, en caldo y agar MH respectivamente. La turbidez en los tubos inoculados, permitió determinar la CMI después de las 24 horas de exposición de las bacterias frente a los diferentes materiales. La cuantificación de colonias bacterianas que crecieron en placas con agar MH, se realizó después de 18 y 24 horas de incubación a 37°C.

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

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

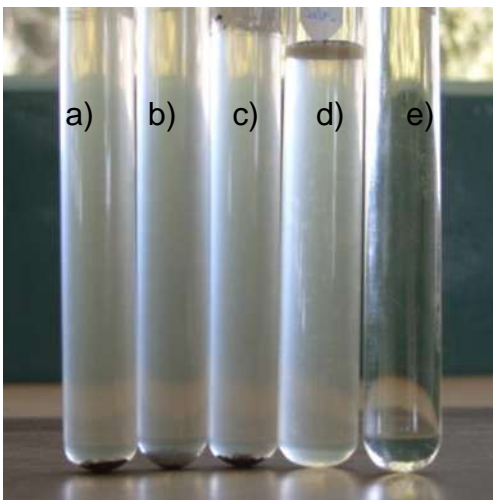
Tabla 7.1. Determinación de CMI de las NPAg y los materiales Ag/ClX-Y para eliminar *E. coli*.

Cepa/ Material	Control 1	2.2 x 10 <sup>-3</sup> g/mL	3.3 x 10 <sup>-3</sup> g/mL	4.4 x 10 <sup>-3</sup> g/mL	5.5 x 10 <sup>-3</sup> g/mL	Control 2
Ag/Cl500-2.8	+	+	+	+	-	+
Ag/Cl500-4.5	+	+	-	-	-	+
Ag/Cl400-2.8	+	+	+	+	-	+
Ag/Cl400-4.5	+	+	-	-	-	+
NPAg	+	+	-	-	-	+

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

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

## Resultados



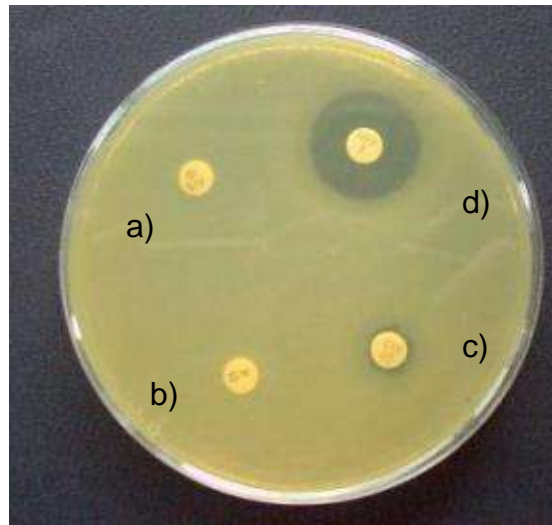
**Figura 7.3. Antibiograma en medio líquido de E. coli frente a Ag/Cl/A500-4.5 a CMI de: a)  $2.2 \times 10^{-3}$ , b)  $3.3 \times 10^{-3}$ , c)  $4.4 \times 10^{-3}$ , d)  $5.5 \times 10^{-3}$  y e)  $6.6 \times 10^{-3}$  (g/mL)**

Las muestras expuestas a la Ag que no presentaron turbidez fueron sembradas en cajas petri con agar Müller-Hinton (Figura 7.4), observándose que el crecimiento de las bacterias fue nulo. Esto demuestra que los materiales tienen efecto bactericida para E. coli. Cabe señalar que se consideraron sistemas en donde no hubo crecimiento, aquellos tubos traslúcidos cuya turbidez era muy baja (menos de 50 unidades nefelométricas de turbidez (NTU por sus siglas en ingles) ) o cercana a cero. Aquellos tubos con turbidez aparente y valores mayores a 50 NTU se consideraron sistemas con crecimiento microbiano.

Con este método descriptivo de ensayo turbidimétrico se pueden obtener algunas respuestas sobre el comportamiento de las bacterias, en presencia de los agentes bactericidas, tales como supresión en el nivel de crecimiento en la fase estacionaria, disminución de la velocidad de crecimiento y la letalidad (Davidson and Parish, 1989).

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

## Resultados



**Figura 7.4** Antibiograma en medio sólido de *E. coli* frente a Ag/Cli500-2.8, CMBs de: a)  $2.2 \times 10^{-3}$ , b)  $3.3 \times 10^{-3}$ , c)  $4.4 \times 10^{-3}$  y d)  $5.5 \times 10^{-3}$  g.

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

### 7.4 Pruebas microbiológicas para evaluar la inhibición.

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*, empleados en la evaluación bactericida, cumplieron con los criterios de aceptación al obtenerse valores de viabilidad del orden de  $1 \times 10^8$ , de modo que los resultados de pureza para ambos microorganismos cumplen con la condición de cultivos libres de contaminación microbiana.

En las tablas 7.2 y 7.3, se reportan los valores promedio de colonias de *E. coli* obtenidos de los tres ensayos, para cada uno de los tiempos de exposición a los diferentes materiales con plata evaluados como biocidas. Como una muestra

## Resultados

de referencia, los materiales sin el agente bactericida también fueron evaluados. En la figura 7.5 se observa el efecto inhibitorio en placa microbiana de las bacterias en estudio expuestas a los materiales.

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

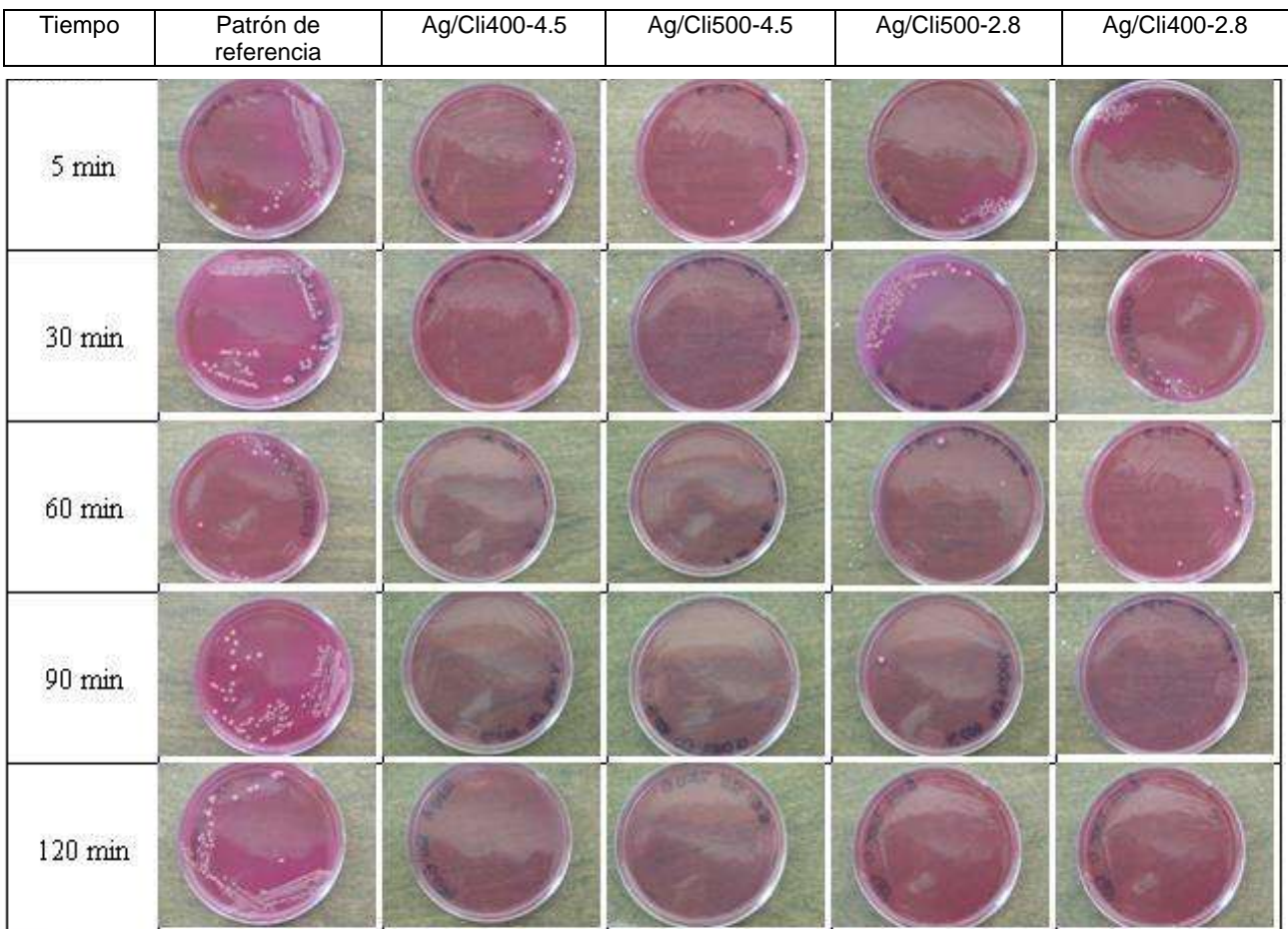


Figura 7.5 Efecto inhibitorio de la *E. coli* con los materiales Ag/CliX-Y.

## Resultados

La valoración del efecto bactericida de los materiales se realizó al medir la viabilidad celular a los 0, 5, 30, 60, 90 y 120 minutos después de la exposición e incubación de las bacterias con los distintos materiales. Las pruebas se realizaron por triplicado en placas con agar McConkey. Estas pruebas permitieron definir el momento en el que el agente biocida actúa sobre el ciclo de replicación bacteriano, de tal forma que cada material presenta una grafica diferente que va de acuerdo a su mecanismo de acción.

Los resultados de las curvas corresponden a la media de los tres experimentos. La pauta de administración de los materiales bactericidas está en función a la CMB promedio determinada para cada bacteria.

Tabla 7.2. Número de colonias de *E. coli* que sobrevivieron frente a NPAg.

Tiempo (min)	Patrón de referencia	NPAg
0	200	200
5	235	60
30	268	51
60	324	32
90	372	18
120	410	15
180	567	14
210	710	16

Tabla 7.3. Número de colonias de *E. coli* que sobrevivieron frente a los materiales evaluados como biocidas.

Tiempo (min)	Patrón de referencia	Ag/cli400-2.8	Ag/cli400-4.5	Ag/cli500-2.8	Ag/cli500-4.5
0	200	200	200	200	200
5	235	52	8	62	10
30	268	28	5	32	6
60	324	9	0	8	0
90	372	0	0	0	0
120	410	0	0	0	0

En las figuras 7.6 y 7.7, se presentan las curvas de viabilidad de las bacterias *E. coli* expuestas a la plata iónica comercial y a los materiales respectivamente. Como una muestra de referencia, los materiales sin plata también fueron

## Resultados

evaluados. La actividad de la plata iónica comercial y los materiales Ag/ClX-Y presentan un efecto bactericida en todo momento para bacterias.

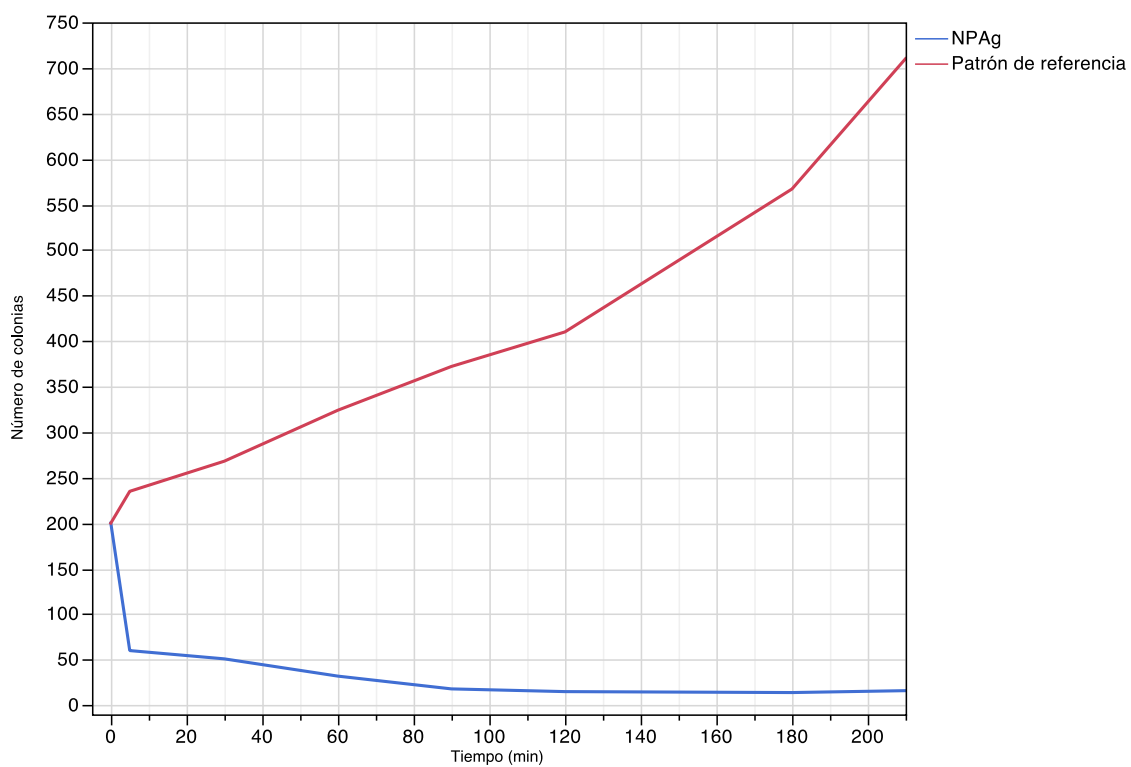


Figura 7.6 Efecto inhibitorio de las NPAg sobre el crecimiento de *E. coli*.



## Resultados

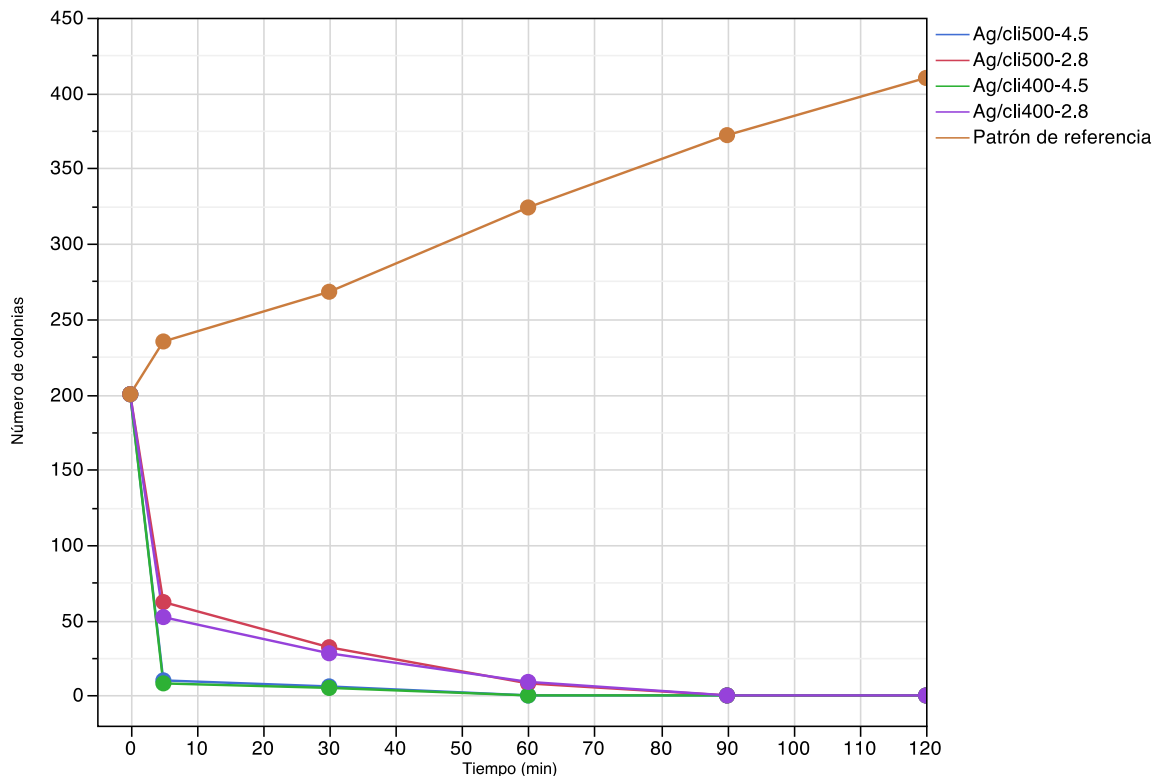


Figura 7.7 Efecto inhibitorio de los materiales Ag/CliX-Y sobre el crecimiento de *E. coli*.

Los resultados de los estudios microbiológicos “in vitro” han mostrado que las partículas nanométricas de plata soportadas en la clinoptilolita natural poseen mayor actividad bactericida comparable con la de los iones de  $\text{Ag}^+$ . Lo anterior puede deberse que a diferencia de las nanopartículas de plata coloidal, las partículas metálicas no reaccionaron con los iones del medio.

En la figura 7.6, se observa un comportamiento bacteriostático después de los 90 minutos de exposición de la bacteria frente a las NPAg, eliminando el 92% del inóculo inicial en este tiempo.

A diferencia de las NPAg, los materiales Ag/CliX-Y presentaron un comportamiento bactericida en todo momento. Los materiales con plata soportada eliminaron más del 90% de las colonias de *E. coli* en un tiempo de 30 minutos. En los siguientes 60 minutos, el efecto supresor de los materiales fue aún más claro, eliminando el 100% de colonias con las diferentes concentraciones utilizadas.

## Resultados

En los cultivos de *E. coli* en presencia de los materiales con plata, independientemente de la concentración en el soporte, siempre se observó un efecto bactericida. De toda la serie de materiales evaluados, el material Ag/Cl500-4.5 tuvo el mayor efecto bactericida una CMB de 3.5 mg/mL, eliminando el 100% del inoculó inicial en un tiempo de 60 min.

Las pruebas con los materiales con 4.5% de plata soportada y con NPAg frente a *E. coli* se observó similitud en la velocidad y porcentaje de eliminación de colonias. Esto puede atribuirse al tamaño de las nanopartículas de plata en la solución de plata iónica y en los materiales, el cual tiene mayor interacción con la célula bacteriana al penetrar en las bacterias.

El hecho de que las tendencias de las curvas para los materiales con plata después de los 60 minutos sean similares sin importar la concentración de plata en el soporte, se debe en parte a que los métodos turbidimétricos son poco sensibles para detectar concentraciones celulares menores a  $10^7$  (Dalgaard P.*et al.*, 1994). También, es importante mencionar que la técnica turbidimétrica empleada no distingue entre células viables y no viables, por lo que a pesar de que en las curvas de crecimiento se observa una disminución en la población bacteriana, la tendencia en los valores de turbidez es a permanecer constante.

## 8. Conclusiones

- Los materiales de plata soportada en clinoptilolita son agentes antibacterianos para *E. coli*. Su eficacia, reflejada por un radio CMB/CMI menor a 1.2, indica que los materiales son bactericidas y no bacteriostáticos.
- La CMI de los materiales varía en función de la cantidad de plata 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.
- Las nanopartículas de plata comercial, eliminaron más rápido las bacterias, sin embargo estas no pueden recuperarse para volver a reutilizarse, lo que las pone en desventaja con respecto a la plata soportada.
- Los estudios microbiológicos “in vitro” han mostrado que las partículas nanométricas soportadas en la Ag-clinoptilolita natural poseen una alta actividad bactericida comparable con la de los iones de  $Ag^+$ .

## 9. Perspectivas

El tratamiento de aguas industriales, urbanas y de potabilización son algunas de las aplicaciones en las que pueden aplicarse los soportes-Ag 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 Ag/CliX-Y 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 es su baja toxicidad y mínimos efectos secundarios.

## 10. Bibliografía

- Agencia de Protección Ambiental de las Naciones Unidas EPA. In-depth Studies on Health and Environmental Impacts of Selected Water Pollutants. 1978, Contract 68-01-4646.
- 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.
- American Society of Engineers American Water Works Association, Water Treatment Plant Design, 2nd Edition, 1990, 501-507.
- Bekkum H., Flanigen E., Studies in Surface Science and Catalysis; Elsevier Science B., 1991, 58-59.
- Belliveau B., Starodub M., Cotter C., Trevors, J., Metal resistance and accumulation in bacteria. Department of Environmental Biology, University of Guelph. 1987, 5, 27-101.
- Bosch P., Schifter I., La zeolita una piedra que hierve. Fondo de Cultura Económica, México, D.F., 1997.
- Brock T., Madigan M., Biology of Microorganisms. Ed. Prentice Hall, 5th edition. 1988, 835-842.
- Cervantes C., Bacterias que expulsan metales pesados. Información Científica y Tecnológica, 1992, 14,13-17.
- Cervantes C., Minerales que expulsan metales pesados. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. SPECTRA, 1992.
- Cervantes C., Vargas E., Álvarez A., Sistemas bacterianos de expulsión de metales tóxicos, Revista Latinoamericana de Microbiología, 1998, 40-53.
- Charles J., Nanosilver as a biocide in building materials. 2006. US 0272542, 4-5.

## Bibliografia

- Chmielewska D., Łukasiewicz A., Waliś L., Water soluble silica biocides containing quaternary ammonium salts. In: INCT Annual Report, 2006, 141-153.
- Cho K., Park J., Osaka T., Park S., The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. *Electrochimica Acta*, 2005, 51, 956-960.
- Clement J., Jarrett P. S., Antimicrobial silver. *Metal based Drugs*, 1994, 1, 467-482.
- Cooper R., A review of the evidence for the use of topical antimicrobial agents in wound care, *World Wide Wounds*, 2004.
- Csicsery S., *Zeolite Chemistry and Catalysis*, ACS Monograph, J. A. Rabo Edition, 1985, 171, 680-713.
- 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.
- Damm C., Münstedt H., Rösch A., The antimicrobial efficacy of polyamide 6/silver-nano and microcomposites. *Materials Chemistry and Physics*, 2008, 108, 61-66.
- Davis M., Zeolites and molecular sieves: not just ordinary catalysts. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 1991, 30, 1675.
- Day R., Furst D., Van Riel P., Bresnihan B., Progress in inflammation research, *Antirheumatic Therapy: Actions and Outcomes*, Michael J. Parnham Series Editor, 2005, 49-68.
- Demling R., De Santi L. Wounds. Scar management strategies in wound care. *Rehabilitation Management*, 2001, 14, 26-30.
- Derouane E., *Zeolites Science and Technology*, NATO ASI Series, F.R. Ribeiro et al. Eds., 1984, 80, 347-348.
- Dibrov P., Dzioba J., Khoosheh K., Gosink, Häse C., Chemiosmotic Mechanism of Antimicrobial Activity of Ag<sup>+</sup> in *Vibrio cholerae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, American Society for Microbiology, 2002, 46, 2268-2670.

## Bibliografía

- Dwyer J., Zeolite structure, composition and catalysis, *Chemistry & Industry*, 1984, 7, 258.
- Dyer A., *An introduction to zeolite molecular sieves*. John Wiley and Sons Inc., 2008, 82-99.
- Edelman R., Levine M., Summary of an international workshop on typhoid fever. *Journal of Infectious Diseases*, 1986, 8, 49-329.
- Esteban A., Evidence-based management of patients with respiratory failure, update in intensive care medicine, Jean-Louis Vincent Edition, 2005, 81-162.
- Feng Q., Wu J., Chen G., Cui F., Kim T., and Kim J., A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, *Journal of Biomedical Materials Research*, 2000, 52, 662-668.
- Fricker S., Medicinal chemistry and pharmacology of gold compounds, *Transition Metal Chemistry*, 1996, 21, 377-383.
- *FSIS, Food Safety and Inspection Service, United States Department of Agriculture, New performance standards for salmonella and campylobacter in chilled carcasses at young chicken and turkey slaughter establishments, 2011.*
- *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.
- Geobaldo F., Bordiga S., Zecchina A., Giamello E., Leofanti G., Petrini G., DRX UV-VIS and EPR spectroscopy of hydroperoxo and superoxo complexes in titanium silicalite, *Catalysis letters*, 1992, 16, 109-115.
- Goodman A., Gilman S., *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Editorial Panamericana, 6ta. Edición. 1982, 57-68.

## Bibliografia

- Gottardi G., Mineralogy and Crystal Chemistry of Zeolites: in natural zeolites, L.B. Sand and F.A., Mumpton Eds., 1978, 31-44.
- Harrison A., Fractals in Chemistry. Oxford University Press Inc., 1995.
- Herikstad H., Hayes P., Mokhtar M., Fracaro M., Threlfall E., Angulo F., Emerging quinolone-resistant Salmonella in the United States. Emerging Infectious Diseases, 1997, 3, 371-372.
- Hugo W., Russell A., Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilisation. 3<sup>rd</sup> 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.
- Kawahara K., Tsuruda K., Morishita M., Uchida M., Antibacterial effect of silver-zeolite on oral bacteria under anaerobic conditions. Dental Materials, 2000, 16, 452-455.
- Kesraoui-Ouki S., Cheeseman C., Perry R., Natural zeolite utilization in pollution control: a review of applications to metals' effluents. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 1994, 59, 121-126.
- Klein D., Lansing M., Harley J., Microbiology. WCB/McGraw-Hill. 1999, 294-301.
- Landeen K., Yahya M., Gerba C., Efficacy of copper and silver ions and reduced levels of free chlorine in inactivation of legionella pneumophila. American Society for Microbiology, Applied and Environmental Microbiology, 1989, 55, 3045-3050.
- Langella A., Pansini M., Cappelletti P., de Gennaro B., de Gennaro M., Colella C.,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  exchange for  $\text{Na}^+$  in a sedimentary clinoptilolite, North Sardinia, Italy, Microporous and Mesoporous Materials, 2000, 37, 337-343.
- 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.



## Bibliografía

- Lara H., Ayala-Nuñez N., Ixtepan-Turrent L., Rodríguez-Padilla C., Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, 26, 615-621.
- Leyva R., Aguilar A., González G., Guerrero C., Mendoza B., Ammonia exchange on clinoptilolite from mineral deposits located in Mexico, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2004, 79, 651-657.
- Macarulla J., Goñi F., *Bioquímica humana*, Editorial Reverté, S.A., Segunda Edición, 1994, 161-165.
- Maillard J., Bacterial target sites for biocide action. *Journal of applied Microbiology Symposium Supplement*, 2002, 92, 16-27.
- Martin A., *Colloids, Physical Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Ed. Sinko PJ 5<sup>th</sup> Edition., Lippincott Williams & Wilkins, 2006, 469-498.
- McDonell G., Russell A., Antiseptics and disinfectants. *Clinical Microbiology Reviews*, 1999, 12, 147-179.
- McKeage M., Maharaj L., Berners-Price S., Mechanisms of cytotoxicity and antitumor activity of gold(I) phosphine complexes: the possible role of mitochondria, *Coordination Chemistry Reviews*, 2002, 232, 127-135.
- Meier W., Olson D., Baerlocher C., *Atlas of Zeolite framework types*, Elsevier, 2007, 17, 1-229.
- Meier W., Olson D., Baerlocher Ch., *Atlas of Zeolite Structure Type*, 4<sup>th</sup> Revised Edition, 1996.
- Muñoz R., Collazo P., Alvarado F., Efecto bactericida de la cal hidratada en solución acuosa. *Oficina Sanitaria Panamá*, 1995, 118, 302-305.
- Murray R., *Bioquímica de Harper*. México, Editorial El Manual Moderno, 2010, 69-98.
- Nataro J., Enteraggative *Escherichia coli* pathogenesis. *Current Opinion in Gastroenterology*, 2005, 21, 4-8.
- Nataro J., Kaper J., Diarrheagenic *Escherichia coli*., *Clinical Microbiology Reviews*., 1998, 11, 142-201.

## Bibliografía

- Nataro J., Mai V., Johnson J., Diarrheagenic *Escherichia coli* infection in Baltimore, Maryland, and New Haven, Connecticut. *Clinical Infectious Diseases*, 2006, 43, 402–407.
- NMX-AA-42-SCFI-1987. Calidad del agua determinación del número más probable (NMP) de coliformes totales, coliformes fecales (termotolerantes) y *Escherichia coli* presuntiva. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial, Dirección General de Normas. 2000.
- 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 reusen en servicio al público, 1998.
- NOM-127-SSA1-1994, Norma Oficial Mexicana, Salud ambiental, agua para uso y consumo humano-Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización, 1995.
- Nomiya K., Yamamoto S., Noguchi R., Yokoyama H., Kasuga N., Ohyama K., Kato C., Ligand-exchangeability of 2-coordinate phosphinegold(I) complexes with AuSP and AuNP cores showing selective antimicrobial activities against Gram-positive bacteria. Crystal structures of [Au(2-Hmpa)(PPh(3))] and [Au(6-Hmna)(PPh(3))] (2-H(2)mpa=2-mercaptopropionic acid, 6-H(2)mna=6-mercaptonicotinic acid). *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2003, 95, 208-228.
- Novelli F., Recine M., Sparatore F., Juliano C., Triorganotin compounds as antimicrobial agent, *Il Farmaco*, 1999, 54, 237-241.
- Orha C., Manea F., Pop A., Burtica G., Todea I. F., Obtaining and characterization of zeolitic materials with antibacterial properties, *Revista de Chimie*, 2008, 59, 173-177.
- Panáček A., Kvítek L., Pucek R., Kolár M., Vecerová R., Pizúrová N. et al., Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their

## Bibliografía

- antibacterial activity. *Journal of Physical Chemistry B*, 2006, 110, 16248-16253.
- Perego G., Bellusi G., Corno C., Taramsso M., Buonomo F., Esposito A., Titanium-silicate: a novel derivative in the pentasil family, *Proceedings 7th Int. Zeolite conference Tokyo*, Kodansha Publishing., 1986, 129.
  - Pumarola A., *Microbiología y parasitología médica*, MASSON, S. A., 1987, 12-16.
  - Rai M., Yadav A., Gade A., Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials, *Biotechnology Advances*, 2009, 27, 76-83.
  - Ronald M., *Principles of Microbiology*. Editorial Mosby, 1995, 43-55.
  - Rosabal B., Rodríguez G., Bogdanchikova N., Bosch P., Lara V., Prakash A., Comparative study of natural and synthetic clinoptilolites containing silver in different states. *Microporous and Mesoporous Materials*, 2005, 86, 249-255.
  - Rowe B., Ward L., Threlfall E., Multidrug-resistant *Salmonella Typhi*: a worldwide epidemic. *Clinical Infectious Diseases*, 1997, 24, 106-117.
  - Russell A., Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2003, 52, 750-763.
  - Ruttler M., Renna N., Balbi L., Garcia B., Guidone L., Fernandez R., Puig O. & Ortiz, A., Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from children with acute diarrhea, in Mendoza, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 2002, 34, 167-170.
  - Sadler P., *Lectures in Bioorganic Chemistry*, Cortina International, 1991, 1-24.
  - 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.
  - Sigler J., Bluhm B., Duncan H., Sharp T., Ensing D., McCurry W., *Arthritis Rheumatism*, 1972, 15, 125.

## Bibliografía

- Silver S., Bacterial interactions with mineral cations and anions: good ions and bad, Eds. P. Westbroek & W. Jong, 1983, 439-457.
- Silver S., Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds, *FEMS Microbiology*, 2003, 27, 341-354.
- Silver S., Misra T., Laddaga R., ADN sequence analysis of bacterial toxic heavy metal resistances, *Biological Trace Element Research*, Humana Press Inc., 1989, 21, 145-163.
- Skandamis P., Koutsoumanis K., Fasseas K., Nychas G., Inhibition effect of oregano essential oil and EDTA on *Escherichia coli* O157-h7. *International Journal of Food Science and technology*, 2001, 13, 65-75.
- Sociedad Argentina de terapia intensiva, Infecciones por catéteres vasculares: En situaciones particulares. Ed. Médica Panamericana, 2003, 2, 97-101.
- Sondi I., Salopek-Sondi B., Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2004, 275, 177-182.
- Stobie N., Duffy B., McCormack D., Colreavy J., Hidalgo M., McHale P. et al., Prevention of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation using a low-temperature processed silver-doped phenyltriethoxysilane sol-gel coating. *Biomaterials*, 2008, 29, 963-972.
- Struther J., Westran P., *Bacteriología clínica*, Editorial Masson, S. A., 2005, 10-165.
- Taramasso M., Perego G., Notari B., "Preparation of porous crystalline synthetic material comprised of silicon and titanium oxides", Patente USA 4410501, 1983.
- Tenorio J., Espinosa D., Treatment of chromium plating process effluents with ion exchange resins, *Waste Management*, 2001, 21, 637-642.
- Thurman R., Gerba C., The molecular mechanisms of copper and silver ion disinfection of bacteria and viruses, *Critical Reviews of environmental control*, 1989, 18, 295-315.

## Bibliografía

- Torres M., Tratado de cuidados críticos y emergencias, Tomo II, Ediciones ARAN, 2002, 1343-1576.
- Tortora G., Berdell R. Funke, Christine L. Case, Introducción a la microbiología, 9a edición, Ed. Médica Panamericana, 2007, 69-89.
- Tuel A., Diab J., Gelin P., Dufaux M., Dutel J., EPR evidence for the isomorphous substitution of titanium in silicalite structure. Journal of molecular catalysis, 1990, 63, 95-96.
- O., Puhakka J., Hiltunen P., and Dolan K., Silver toxicity to ferrous iron and pyrite oxidation and its alleviation by yeast extract in cultures of thiobacillus ferrooxidans. Journal of Biotechnology Letters, 1985, 7, 389-94.
- Vaughan D., Properties and Application of Zeolites, R. P. Townsend Ed., Society of Chemical Industry, 1980, 294-295.
- Ward J., Williams H., Egger M., Reading J., et al., Comparison of auranofin, gold sodium thiomalate, and placebo in the treatment of rheumatoid arthritis. American College of Rheumatology, Arthritis and Rheumatism, 1983, 26, 1303-1315.
- Weber W., Control de la calidad del agua: procesos fisicoquímicos, Editorial Reverté, S. A., 2003, 301-305.
- Weidauer E., Yasuda Y., Biswal B., Cherny M., James M., Brömme D., Effects of disease-modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs) on the activities of rheumatoid arthritis-associated cathepsins K and S, Biological Chemistry, 2007, 388, 331-336.
- World Health Organization (WHO). The world health report 1996: Fighting disease, fostering development. Geneva, WHO, 1996, 143.
- Wright V., Oral gold for rheumatoid arthritis, British Medical Journal, 1984, 289, 858-859.
- Yan J., Cheng J., Antimicrobial yarn having nanosilver particles and methods for manufacturing the same. 2005, US 6979491.
- Yin H., Langford R., Burrell R., Comparative evaluation of the antimicrobial activity of Acticoat antimicrobial barrier dressing, Journal of Burn Care Rehabilitation, 1999, 20, 195-200.