



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

Estudio in vitro e inhibición de *Escherichia coli* asistida por nanopartículas de iones Ag, incorporados en cristales de CeO₂ como medio de soporte.

TESIS

Para obtener el grado de:

LICENCIADO EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

Presenta el alumno:

Iván Montero Rosales

Asesor de Tesis:

Dr. Roberto Guerra González

Co-asesor de Tesis:

Dr. J. Ricardo Rangel Segura

Octubre 2016

RESUMEN

Estudio in vitro e inhibición de *Escherichia coli* asistida por nanopartículas de iones Ag, incorporados en cristales de CeO₂ como medio de soporte.

El presente trabajo fue dirigido a realizar estudios de inhibición de *Escherichia coli*; empleando como medio nanopartículas de plata soportadas en óxido de cerio (Ag/CeO₂). Estos sistemas fueron preparados a través de síntesis sol-gel, asistido por microondas y síntesis hidrotérmico. Donde en una etapa final se sometieron a un proceso de reducción para asegurar que la plata se encontrara en estado metálico, dado que esta forma es la que presenta mayor actividad.

Inicialmente se probaron los catalizadores con una concentración de 0.5% de plata y posteriormente se aumentó la concentración a 1.5% de plata. Con el objetivo de efectuar un estudio comparativo acerca de su eficiencia. De acuerdo a los resultados de esta primera etapa se eligió la concentración más alta.

Posteriormente se evaluó su eficiencia como bactericidas de microorganismos de *Escherichia coli*.

Se realizaron pruebas microbiológicas para determinar las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y concentraciones mínimas bactericida (CMB) de los materiales biosidas en estudio para inhibir la *Escherichia Coli*. Los compuestos (Ag/CeO₂) se caracterizaron por. Microscopia electrónica de barrido (MEB), Difracción de rayos X (RDY) y Método de mapeo coloreado para cada uno de los elementos. La bacteria se incubó en caldo de soya tripticaseína, empleando agar selectivo para su detección y cuantificación, las cantidades de (CeO₂) impregnados en plata por síntesis hidrotérmico y síntesis sol-gel asistido por microondas son aproximadamente de 0.06 g/10 ml de cultivo. De acuerdo a nuestros resultados, ambos sistemas (Ag/CeO₂) fueron favorables en la inhibición de la mayoría de las colonias de *Escherichia coli*. Se destacan los cristales por síntesis hidrotérmico con un tiempo biosida para *Escherichia coli* de 60 minutos, en el caso de los cristales por síntesis sol gel asistido por microondas el tiempo biosida para *Escherichia coli* fue de 90 minutos. **Palabras clave: óxido de cerio, plata, *Escherichia coli*.**

Abstract

Silver nanoparticles supported on natural cerium oxide 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 and colored mapping method. Incubation of microorganisms was performed in trypticase 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 1.5% by weight of silver, the crystals stand hydrothermal synthesis with *Escherichia coli* biosida time to 60 minutes.

Keywords: cerium oxide; Silver; *Escherichia coli*.

DEDICATORIA

A DIOS

Por dirigir y forjar mí camino por el sendero correcto, a Dios, el que en todo momento está conmigo ayudándome aprender de mis errores y a no cometerlos otra vez. Eres quien guía el camino de mi vida.

Te lo agradezco, padre celestial.

A MIS PADRES

Raquel Rosales Mancera y Juan Manuel Montero Escobar

Por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad; muchos de mis logros se los debo a ustedes entre en los que se incluye este. Me formaron con reglas y con algunas libertades, pero al final de cuentas, me motivaron constantemente para alcanzar mis anhelos.

Gracias padre y madre.

A MIS HERMANOS

Richard Manuel, Everardo y Karen

Les agradezco no solo por estar presentes aportando buenas cosas a mi vida, si no por los grandes lotes de felicidad y de diversas emociones que siempre me han causado.

A MIS SOBRINAS Y SOBRINO

Naomy, Julieta, Ever y Violeta

Por su cariño, amor y sus grandes manifestaciones de afecto, son una gran bendición de Dios, que da muestra de las cosas buenas que un sobrino tiene para ofrecer.

A MI FAMILIA EN GENERAL

A todos y cada uno de ustedes Abuelos, Tíos, Primos, todos y cada uno de ustedes –mi familia- que han destinado tiempo para enseñarme nuevas cosas, por brindarme aportes invaluable que me servirán para toda la vida

ÍNDICE GENERAL

	Página
Resumen	I
Dedicatorias	II
Lista de figuras	VI
Lista de tablas	VII
Agradecimientos	VIII
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes	4
1.1.1 Escherichia coli (E. coli)	5
1.1.2 Moléculas biológicamente activas, Bactericidas y bacteriostáticos	6
1.1.3 Nanopartículas de plata y su acción bactericida	7
1.1.4 Agentes bactericidas	8
1.1.5 Efectos sobre la salud y medio ambiente de las nanopartículas de plata	9
1.1.6 Antibiograma disco placa	10
1.1.7 Dilución en caldo	11
1.1.8 Preparación de nanopartículas de plata	12
1.2 Justificación	12
1.3 Hipótesis	14
1.4 Objetivo general	14
1.4.1 Objetivos particulares	14

CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO	15
2.1 Óxido de cerio (CeO ₂)	15
2.2 Plata (Ag)	16
2.3 Nanopartículas	17
2.4 Síntesis sol gel	18
2.5 Síntesis hidrotermico	20
2.6 Síntesis por microondas	20
CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA	24
3.1 Materiales	25
3.2 Síntesis sol-gel de CeO ₂ asistido por microondas	27
3.3 Síntesis hidrotermico de CeO ₂	29
3.4 Método de impregnación húmeda incipiente	31
3.5 Método de reducción con hidrógeno	32
3.6 Caracterización de los materiales	33
3.6.1 Microscopia electrónica de barrido (MEB)	33
3.6.2 Difracción de rayos X (XRD)	34
3.7 Actividad antibacterial	35
3.7.1 Preparación de Cepas bacterianas	35
3.7.2 Preparación de caldos nutritivos	35
3.7.3 Preparación de placas con agar	35
3.7.4 Preparación de los inóculos	36
3.7.5 Valoración de concentración mínima inhibitoria (CMI) y Concentración mínima bactericida (CMB) de los sistemas	36
3.7.6 Crecimiento bacteriano en presencia de los sistemas	38

CAPÍTULO 4. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
4.1 Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)	39
4.2 Óxido de cerio impregnado con plata al 1.5% reducido por síntesis sol-gel asistido por microondas (Ag/ CeO ₂ -1.5%)	39
4.2.1 Mapeo a color de Óxido de cerio impregnado con plata al 1.5% reducido por síntesis sol-gel asistido por microondas (Ag/CeO ₂ - 1.5%)	40
4.3 Óxido de cerio impregnado con plata al 1.5% por síntesis sol-gel asistido por microondas recuperado después de las pruebas microbiológicas (Ag/CeO ₂ - 1.5%)	42
4.3.1 Mapeo a color de óxido de cerio impregnado con plata al 1.5% por síntesis sol-gel asistido por microondas recuperado después de las pruebas microbiológicas de (Ag/CeO ₂ - 1.5%)	43
4.4 Óxido de cerio impregnado con plata a 1.5% por síntesis hidrotermico (Ag/CeO ₂ - 1.5%)	44
4.4.1 Mapeo a color de óxido de cerio impregnado con plata al 1.5% por síntesis hidrotermico recuperado después de las pruebas microbiológicas (Ag/CeO ₂ - 1.5%)	46
4.5 Difractogramas de rayos x (XRD) de (Ag/CeO ₂ - 1.5%)	47
4.6 Antibiograma en medio solido	50
4.7 Evaluación antibacterial del (Ag/CeO ₂ - 1.5%) contra Escherichia coli	50
4.8 Pruebas microbiológicas para evaluar la inhibición	52
4.9 Curvas de conteo de colonias que corresponden a las pruebas realizadas a cada uno de los sistemas	54
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES	57
Bibliografía	58
Apéndice A	63
Apéndice B	67

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1.1 Nanopartículas de plata y su acción bactericida	8
Figura 1.2 Clasificación de las nanopartículas con actividad antibacterial según su composición.	9
Figura 1.3 Método de preparación de nanopartículas de plata	12
Figura 2.1 Fase Cristalina de CeO ₂ , cerianita	16
Figura 2.2 Síntesis Sol-Gel	19
Figura 2.3 Interacción dipolar	21
Figura 2.4 Conducción Iónica	22
Figura 3.1 Microondas marca Anton Paar modelo Synthos 300	26
Figura 3.2 Equipo para método hidrotérmico y horno marca Felisa	26
Figura 3.3 Esquema general de síntesis sol-gel asistido por microondas de CeO ₂	28
Figura 3.4 Esquema general de síntesis hidrotérmico de CeO ₂	30
Figura 3.5 Esquema general de impregnación húmeda incipiente	31
Figura 3.6 Esquema general de método de reducción con hidrogeno.	32
Figura 3.7 Equipo para reducción de cristales mediante hidrogeno marca LINDBERG/BLUE	32
Figura 3.8 Microscopio electrónico de barrido MEB modelo JSM-7600 JEOL Noran Instruments	33
Figura 3.9 Difracción de rayos X (XRD), SIEMENS D5000 X-Ray diffractometer.	34
Figura 3.10 Valoración de concentración, mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) de los sistemas	37
Figura 4.1 (Ag/CeO ₂ - 1.5%) por síntesis sol-gel asistido por microondas y reducido con hidrogeno (a) 1000x;(b) 1000x.	39
Figura 4.2 (a), (b), (c), (d) y (e) corresponde a el mapeo de Ag, O y Ce por color de cada uno de los elementos de (Ag/CeO ₂ - 1.5%) ya reducido por síntesis sol-gel asistido por microondas con aumento de 1000x.	41

Figura 4.3 (Ag/CeO ₂ - 1.5%) recuperado de muestras microbiológicas por síntesis sol-gel asistido por microondas y reducido con hidrogeno (a) 1000x;(b) 2500x.	42
Figura 4.4 (a), (b), (c) y (d) corresponde a el mapeo de Ag, Ce por color de cada uno de los elementos de (Ag/CeO ₂ - 1.5%) recuperado y reducido por síntesis sol-gel asistido por microondas con aumento de 1000x, después de las pruebas microbiológicas.	44
Figura 4.5 (a), (b), (c) y (d) corresponde a (Ag/CeO ₂ 15%) ya reducido por síntesis hidrotérmico con aumento de 1000x; 2500x; 5000x; y 10000x respectivamente.	45
Figura 4.6 (a), (b) y (c) corresponde a los compuestos Ce), Ag del polvo (Ag/CeO ₂ - 1.5%) ya reducido por síntesis hidrotérmico después de las pruebas microbiológicas con aumento de 1000x respectivamente.	47
Figura 4.7 Difractograma de nanopartículas de (Ag/CeO ₂ - 1.5%) por síntesis hidrotérmico.	48
Figura 4.8 Difractograma de nanopartículas de (Ag/CeO ₂ - 1.5%) por síntesis hidrotérmico recuperado después de pruebas microbiológicas.	48
Figura 4.9 Difractograma de nanopartículas de (Ag/CeO ₂ - 1.5%) por síntesis sol-gel asistido por microondas.	49
Figura 4.10 Difractograma de nanopartículas de (Ag/CeO ₂ - 1.5%) por síntesis sol-gel asistido por microondas recuperado después de pruebas microbiológicas.	49
Figura 4.11 Antibiograma en medio solido de Escherichia coli en medio Müller-Hinton.	50
Figura 4.12 Efecto inhibitorio de las nanopartículas de Ag por síntesis sol-gel asistido por microondas sobre el crecimiento de Escherichia coli.	54
Figura 4.13 Efecto inhibitorio de las nanopartículas de Ag por síntesis Hidrotérmico sobre el crecimiento de Escherichia coli.	55
Figura 4.14 Comparación patrón de efecto inhibitorio de las nanopartículas de Ag sobre el crecimiento de Escherichia coli (E. coli).	55

LISTA DE TABLAS

Tabla 3.1 Compuestos involucrados en la síntesis de catalizadores	25
Tabla 4.1 Concentraciones mínimas de los materiales soporte-Ag para Escherichia Coli.	51
Tabla 4.2 Conteo de colonias de Escherichia coli contra nanopartículas de (Ag/CeO ₂ 15%) por síntesis sol-gel asistido por microondas, sol-gel asistido por microondas recuperado, hidrotermico, hidrotermico recuperado.	51
Tabla 4.3 Efecto inhibitorio de la Escherichia coli con los materiales (Ag/CeO ₂ 15%) por los diferentes sistemas.	52

AGRADECIMIENTOS

A LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO

Mediante la división de estudios de licenciatura

De la facultad de Químico Farmacología

Que ha sido la forjadora en el desarrollo de mi conocimiento

AL POSGRADO DE INGENIERÍA QUÍMICA

Por las facilidades brindadas y el apoyo de los equipos durante mi estancia de investigación.

A LA FACULTAD DE INGENIERIA QUIMICA

Por el apoyo para realizar dichos estudios y procesos dentro de sus laboratorios, por las facilidades brindadas y el apoyo en los equipos durante mi estancia de investigación.

AL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES METALURGICAS

Por las facilidades brindadas y el apoyo de los equipos

AL D.C. ROBERTO GUERRA GONZÁLEZ

Asesor de este proyecto, por su valiosa instrucción y aportación en mi formación profesional

AL D.C. J. RICARDO RANGEL SEGURA

Co-asesor de este proyecto, por su valiosa instrucción y aportación en este proyecto

A MIS AMIGOS

M.C. Verónica Janette Cedeño Garcidueñas, Q.F.B. Dante Agustín Tapia Hernández, Q.F.B. Lorena Mondragon, Q.F.B. Diana Reyes y Q.F.B. Eric Rojas.

A Q.F.B. Mercedes, Q.F.B. Iliana, M.C. Antonio, Q.F.B. Gabriel.

A cada uno de ellos por su amistad y apoyo durante el periodo de formación. Gracias por formar parte de mi vida, acompañarme en este recorrido son muy importantes en mi vida y guardan un pequeño espacio cada uno de ustedes en mi corazón.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

Se sabe que el 80% de las enfermedades intestinales son transmitidas por el agua, unas de las principales enfermedades infecciosas que se transmiten a través del agua por un sin número de microorganismos patógenos. El número creciente de epidemias sin importar la susceptibilidad de la persona, pone de manifiesto la transmisión de patógenos por medio del agua potable. Solo bajo condiciones estrictas es posible minimizar la propagación de la contaminación y a veces este hecho es poco menos que imposible, ya que las medidas sanitarias son principalmente de prevención. Sin embargo, muchos de ellos son tóxicos lo que los limita para su aplicación en algunos medios como agua potable, alimentos y productos textiles.

En México, el Instituto Nacional de Salud Pública estima que se recetan antibióticos a 70% de los pacientes con infecciones diarreicas agudas, lo que solamente en un 15% de los casos se justifican. Steffen. Director de la campaña del Día Mundial de la Salud Digestiva, señaló que el 20% de las muertes infantiles se debe a diarrea y solo el 39% de los niños con diarrea reciben el tratamiento recomendado. Las cepas de *Escherichia coli* causantes de diarrea se han agrupado en seis tipos patógenos: *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), enterotoxigenica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), con adherencia difusa (DAEC) y enteroagregativa (EAEC). (Guadalupe Rodríguez, 2002.)

Cada uno de los grupos patógenos de *Escherichia coli* presenta características distintivas relacionadas con su epidemiología, patogénesis, manifestaciones clínicas y tratamiento. (Arenas-Hernández et al., 2012)

La diarrea afecta a todos los grupos de edad. El periodo pediátrico de mayor vulnerabilidad incluye a los menores de 5 años la Organización Mundial de la Salud estima que cada año se presentan 500 millones de casos de diarrea. (OMS, 1979; Rohde, Jon Eliot y Northrup, Robert S, 1976; Barker, William H 1975 y Gwatkin, Davison 1980).

Por ello, los agentes antimicrobianos son necesarios para inhibir la reproducción de patógenos. Donde estos procesos dependen de la capacidad microbiana para utilizar los compuestos del agua, ya que es un ecosistema muy diverso. 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 hace no aptos. En este sentido, la plata es un bactericida no tóxico para el ser humano, que puede reducir significativamente muchas infecciones bacterianas (Yin H., 1999).

Ante la creciente ineficiencia de los antibióticos actuales se han enfocado al desarrollo de productos que utilizan plata como agente microbicida.

La actividad antimicrobiana de especies de plata son de amplio espectro, los iones en particular, está bien documentado que han sido utilizados por mucho tiempo como germicida, tanto como prevención oftálmica como para tratamientos curativos de úlceras, tratamientos para quemados graves y en servicios de cuidados intensivos con fin de reducir infecciones oportunistas.

La plata coloidal es un desinfectante no tóxico, elimina una amplia gama de organismos patógenos lo que lo hace única, para añadirla a alimentos, incluso como potabilizador de agua que puede reducir significativamente muchas infecciones bacterianas. Además de sus excelentes propiedades antimicrobianas no se descompone en un intervalo amplio de temperaturas. 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, Lukaszewicz A., Waliś L. 2006).

Algo que cabe destacar es que esta es inofensiva para el cuerpo humano, no hay efectos secundarios negativos utilizando concentraciones bajas. Lo que hace la plata coloidal; es inactivar las enzimas que las bacterias usan para su metabolismo del oxígeno. Es decir, consigue inutilizar el pulmón químico de dichos parásitos y de sus formas pleoformicas o mutantes. Es por este motivo que el microorganismo no

puede desarrollar mecanismos de resistencia de ningún tipo de mutación que le permita escapar de la acción germicida de la plata. Por tanto funciona como un catalizador.

La plata ataca el interior como en el exterior de la célula. Atacando a la membrana celular decreciendo por un lado el uso de oxígeno y por otro incrementando la fermentación después de producirse el daño respiratorio debido a la privación de oxígeno (Guyton AC,2007).

Los iones de plata rompen la estructura enzimática, y por lo tanto su función biológica, provoca la muerte celular en pocos minutos, lo que impide desarrollar mecanismos de resistencia como ocurre con los antibióticos u otros compuestos orgánicos. Sin olvidar que en el cuerpo humano la plata coloidal no forma compuestos tóxicos ni reacciona con otra cosa que no sea la enzima metabolizadora de oxígeno. Puede reducir significativamente muchas infecciones bacterianas por tanto no pueden causar rechazos o alergias de ningún tipo (Yin H., 1999)

Se espera que la alta superficie específica y alta proporción de átomos de la superficie de los iones de plata dé lugar a una gran actividad bactericida. En este sentido, la biomasa empleada en el tratamiento se puede mantener en suspensión o adherida a un material de soporte (Lee. L.M 1996; Droste R.L, 1997).

1.1 ANTECEDENTES

Para el hombre como para los demás seres vivos el agua es una sustancia con múltiples funciones vitales, ahí ya hace la importancia de este tanpreciado y vital líquido.

Es una sustancia abundante regularmente con las condiciones tanto físicas como químicas más convenientes para su consumo ya sea para alimentación, higiene y las diversas actividades que el ser humano realiza, como la agricultura y la industria principalmente.

La constante necesidad del hombre por el uso de este recurso natural ha traído como consecuencias que grandes masas de agua se contaminen día a día, disminuyendo tanto la calidad como la cantidad de agua disponible para el consumo humano; Este problema traerá consigo un sin fin de consecuencias de dimensiones inimaginables para la humanidad y para los ecosistemas existentes, por la excesiva contaminación del agua. (Ramalho R. 1993).

Las Aguas Residuales, son aquellas que desecha el hombre una vez que éstas han sufrido un cambio en su composición, por la incorporación de materias extrañas como microorganismos, productos químicos, residuos industriales y muchos otros.

En la actualidad la mayor parte de las masas contaminadas de aguas residuales no tienen ningún tipo de tratamiento, simplemente se descargan en el lago, rio o mar más cercano; sin embargo la degradación de los desechos de forma natural ya no es suficiente para que el agua recobre las características necesarias para satisfacer nuestras necesidades; debido a que nuestros desechos son cada vez mayores y su composición química es más compleja.

Todo organismo debe encontrar en su medio ambiente las unidades estructurales y fuentes de energía necesarias para formar y mantener su estructura y organización. Los filtros biológicos de las aguas residuales, sin embargo, no se han estudiado a detalle el problema que genera este tipo de aguas sobre el cultivo, los suelos o en la población.

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

Existe un grupo de enfermedades conocidas como enfermedades hídricas, pues su vía de transmisión se debe a la ingestión de agua contaminada.

La trasmisión a través del agua de organismos patógenos ha sido la fuente más grave de algunas enfermedades. Muchas de las bacterias del agua provienen del contacto con el aire, suelo, animales, fuentes minerales, o materia fecal. (Romero, E. 1999).

Los coliformes totales y coliformes fecales cuyo número está relacionado con el grado de contaminación se encuentran presentes cuando existen bacterias patógenas de origen fecal. El indicador tradicional de la calidad microbiológica son las bacterias del grupo de las coliformes fecales, especialmente *Escherichia coli*. (Jiménez Cisneros Blanca, 2001).

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 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).

1.1.1 *Escherichia coli* (*E.coli*)

La bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) es de gran importancia para el humano, debido a que forma parte de flora normal del intestino, Se 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 F.C 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. Kaper J, 1998).

1.1.2 Moléculas biológicamente activas, bactericidas y bacteriostáticos

Existen ciertas sustancias químicas que influyen negativamente sobre las bacterias, pudiendo ejercer dos tipos de efectos diferentes: bacteriostático y bactericida. El primero es cuando la molécula biológicamente activa impide el crecimiento bacteriano; y el segundo es cuando destruyen (matan) las bacterias.

Actualmente el centro de atención de los investigadores es el desarrollo de agentes bactericidas cuyo tamaño sea de orden manométrico. Así, la actividad antibacteriana de las nanopartículas se evalúa normalmente frente a microorganismos patógenos representativos tales como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, y *Streptococcus mutans*. Estas bacterias son responsables de diversas infecciones en los seres humanos de inmunidad reducida y representan una gran amenaza para la salud pública en los procesos de diferentes industrias y disciplinas como en el envasado de alimentos, los textiles sintéticos, los productos sanitarios, la odontología, el agua potable y el tratamiento de aguas residuales.

Se ha demostrado que el efecto bactericida de las nanopartículas depende de su tamaño, forma, distribución de tamaño, morfología, la funcionalización de la superficie, y su estabilidad.

1.1.3 Nanopartículas de plata y su acción bactericida

El efecto bactericida de las Nps-Ag puede ser un sinergismo de los siguientes mecanismos: 1) El material estabilizante y las Nps-Ag desestabilizan la membrana bacteriana, y con esto, alteran su permeabilidad, provocando un daño irreversible. 2) Las Nps-Ag se internalizan en la bacteria con facilidad debido a su tamaño diminuto. 3) Las Nps-Ag en su trayecto van liberando iones de plata que funcionan como un reservorio del agente bactericida alterando el citoplasma. 4) Los iones de plata se enlazan con grupos sulfhidrilos de biomoléculas y con compuestos fosforosulfurados como el ADN inactivando a la bacteria. (Veerapandian M, Lim SK, Nam HM, Kuppannan G, Yun KS, 2010)

De manera general, estableciendo una comparación entre la actividad antibacteriana de las Nps-Ag y los iones de plata, se ha comprobado que los primeros presentan esa actividad en niveles nanomolares; mientras que los últimos lo exhiben en niveles macromolares, evidenciando su efectividad por el diseño de formulación. Se ha observado un aspecto sinérgico cuando las Nps-Ag son oxidadas por el medio, y un fenómeno de desorción provoca la liberación de iones de plata, de tal manera que cuando es comparada la misma formulación con o sin la presencia de oxígeno, se observa un mayor efecto antibacteriano en la presencia de este oxidante. Los estudios actuales en el tema de Nps-Ag se centran en nuevas plataformas de síntesis a nano escala, empleo de biorreactores para su obtención, nuevas aplicaciones, amplios estudios de citotoxicidad y evaluación del grado de efecto bactericida en distintas cepas bacterianas. Las investigaciones actuales se perfilan para que en un futuro se pueda disponer de formulaciones bactericidas de Nps-Ag de mayor seguridad y de una eficacia más prolongada.

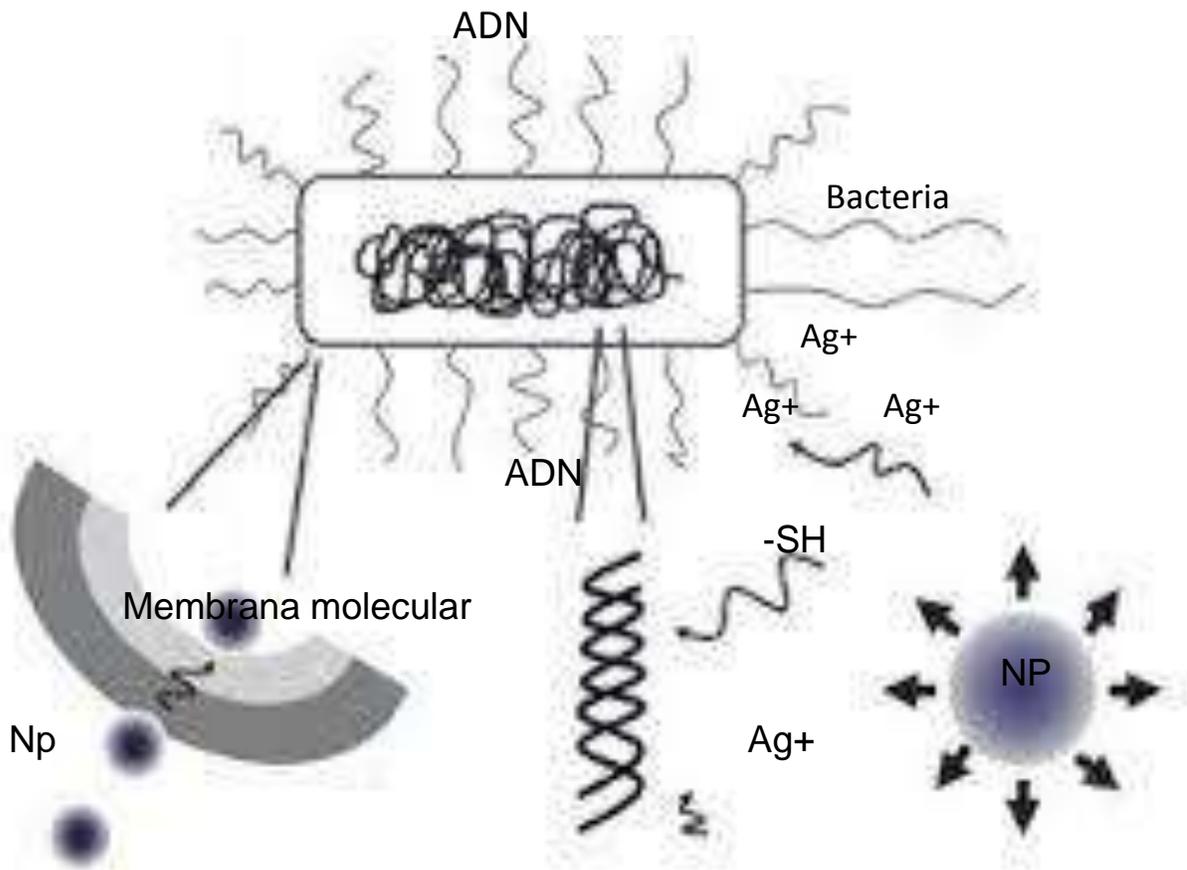


Figura 1.1 Nanopartículas de Ag y su acción bactericida

1.1.4 Agentes bactericidas

Enfocándose en una clasificación de los agentes antibacteriales de tamaño nanométrico se puede hacer un resumen en la figura.

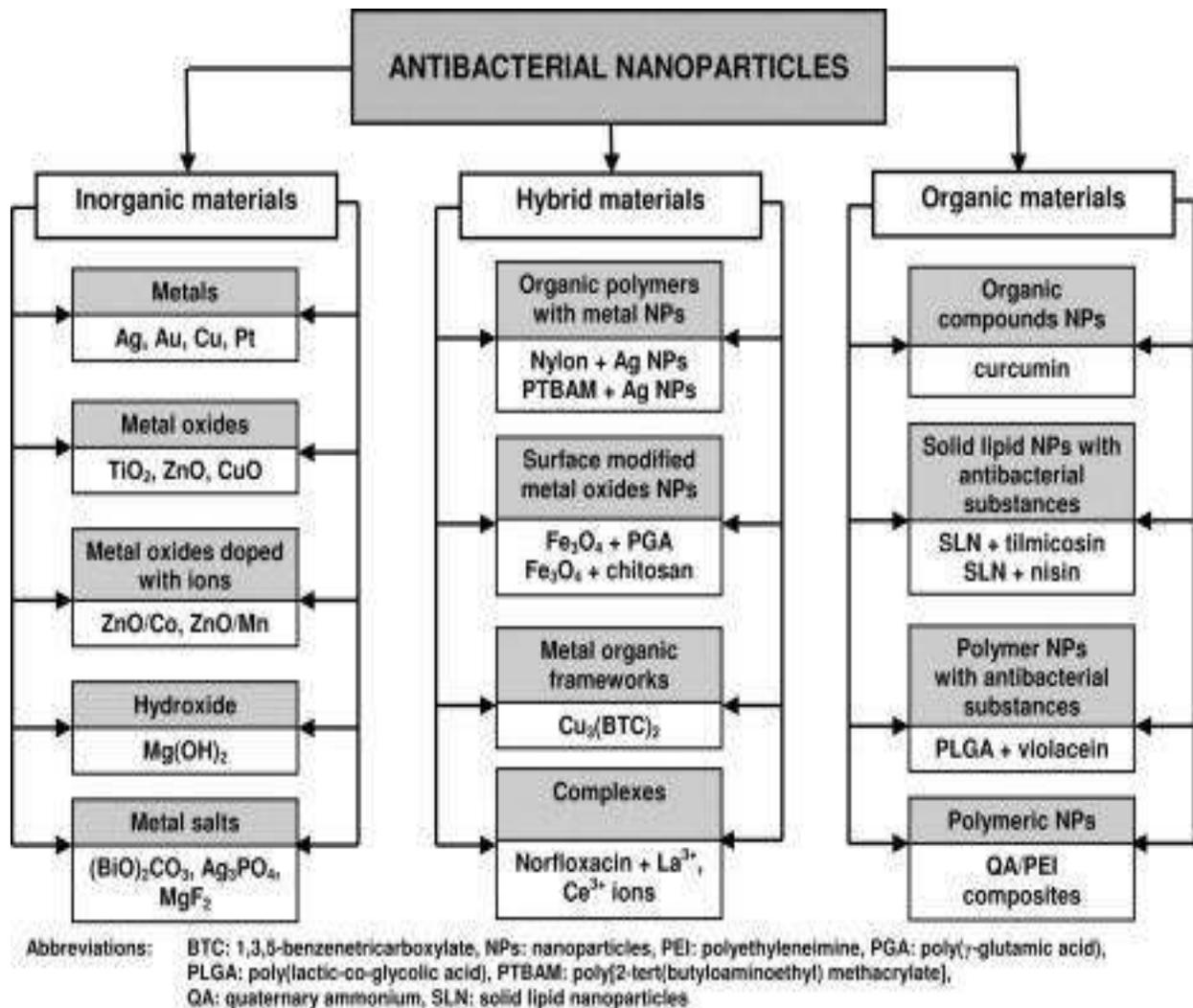


Figura 1.2 Clasificación de las nanopartículas con actividad antibacteriana según su composición.

En esta clasificación se dan tres categorías: materiales orgánicos, materiales inorgánicos y materiales híbridos orgánico-inorgánicos, siendo esta última el objeto de este trabajo.

1.1.5 Efectos sobre la salud y el medio ambiente de las nanopartículas de plata

Exceptuando la enfermedad argiria (cambio de color de la piel por exposición continuada a la plata), la plata es relativamente no tóxica para las células de los mamíferos.

Las nanopartículas de plata poseen propiedades diferentes a la plata en estado masivo y por tanto, es necesario investigar sobre las implicaciones toxicológicas que conllevan su empleo, especialmente en el caso del desarrollo de aplicaciones de uso cotidiano de las nanopartículas. (Chen X, H. J. Schluesener, 2007).

Recientemente se ha llevado a cabo una revisión sobre los modos de interacción de las nanopartículas de plata con los tejidos humanos y las rutas principales de exposición (sistema respiratorio, piel, tracto intestinal y otros tejidos). En estos estudios se pone de manifiesto que las nanopartículas de plata pueden presentar citotoxicidad a través de la interacción de las nanopartículas con proteínas y enzimas a nivel intracelular.

Cuando se usan en cantidades razonables, no tienen efectos negativos en el cuerpo humano.

Otro aspecto de gran interés es el impacto que las nanopartículas en general y, las de plata en particular, podrán generar en el futuro sobre el medio ambiente. El empleo de nanopartículas de plata en aplicaciones cotidianas como, por ejemplo, en textiles o electrodomésticos, puede producir un efecto de aumento de concentración de nanopartículas en aguas residuales. Esta situación choca frontalmente con el empleo de bacterias nitrificantes en la depuración de aguas residuales ya que el aumento de la concentración de nanopartículas de plata produciría un efecto bactericida sobre estas nanopartículas beneficiosas disminuyendo su capacidad. (Choi E. 2008).

1.1.6 Antibiograma disco-placa

El antibiograma disco-placa es uno de los métodos que el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los agentes antimicrobianos. El antibiograma disco-placa consiste en depositar, en la superficie de agar de una placa de petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes cristales. Tan pronto el disco impregnado de cristales se pone en contacto

con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde hacia el agar radialmente formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición. La concentración de antibiótico en la interface formada entre las bacterias en crecimiento y las bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se aproxima a la concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenida por métodos de dilución. Sin embargo, los métodos disco-placa no permiten una lectura directa del valor de la CMI.

1.1.7 Dilución en caldo

En la dilución en caldo se colocan concentraciones decrecientes del agente antimicrobiano, generalmente diluciones 1:2 en tubos con un caldo de cultivo que sostenga el desarrollo del microorganismo. El NCCLS recomienda, para la mayoría de los microorganismos, utilizar caldo Mueller-Hinton, al que se añadirán los suplementos necesarios para asegurar el crecimiento de organismos exigentes. Se emplea por cada combinación microorganismo/antimicrobiano una batería de tubos. Regularmente se prepara la batería de tubos con 1ml de medio estéril sin antimicrobiano. Al primero de ellos se añade 1 ml de la solución inicial del tubo de antimicrobiano hasta conseguir la concentración más alta a estudiar (teniendo en cuenta que este primer paso supone la dilución a la mitad de la solución madre, y que una vez inoculados los tubos, con 1 ml de inóculo, se diluirá nuevamente la concentración del antimicrobiano a la mitad). Tras mezclar adecuadamente, se pasa 1 ml al siguiente tubo; el proceso se repite tantas veces como diluciones se quieran estudiar, eliminando del último tubo de la serie 1 ml de medio con agente antimicrobiano con objeto de mantener el volumen final igual a 1 ml. Para cada paso de dilución se debe emplear una pipeta diferente. La serie de tubos se completa con uno de control sin agente antimicrobiano que solamente tiene 1 ml de caldo. (Método de dilución 2012)

1.1.8 Preparación de nanopartículas de plata

De manera general, los métodos de preparación de Nps se clasifican como top-down (utilizan métodos físicos, procesos de molienda) y como bottom-up (métodos químicos en solución coloidal, procesos de formación de partículas a partir de una solución). Los métodos top-down son aquellos que reducen el tamaño de agregación del material hasta llegar a un tamaño nanométrico con un consumo considerable de energía, mientras que los métodos bottom-up involucran la obtención de un estado de agregación nanométrico partiendo de una dispersión molecular, es decir, es una vía contraria a la primera.

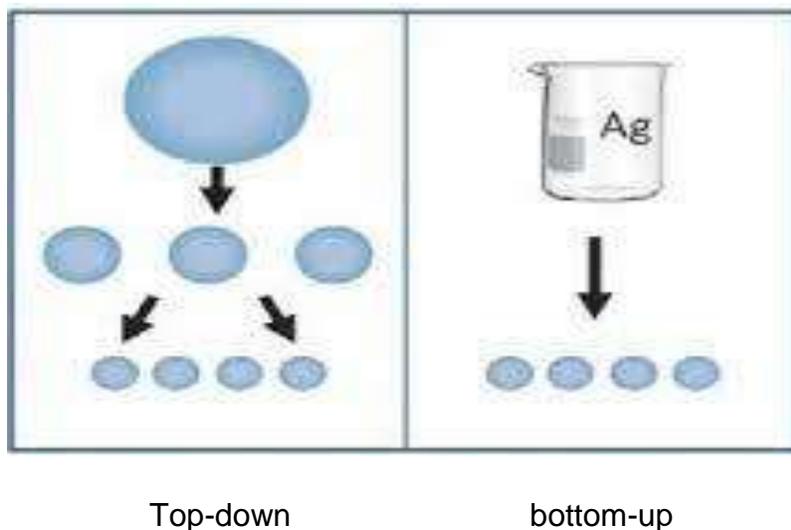


Figura 1.3 Método de preparación de nanopartículas de plata

1.2 Justificación

La contaminación microbiológica es un principal trasmisor infeccioso a través del agua por un sin número de microorganismos patógenos los cuales sobreviven en las diferentes etapas de tratamiento de esta. Las cantidades de microorganismos van de 10 000 a 100 000 coliformes totales y 1000 a 10 000 coliformes fecales por 100 ml de agua. Sin importar la susceptibilidad y riesgos epidemiológicos relacionados con el consumo de aguas contaminadas pone de manifiesto que la transmisión de patógenos por medio del agua potable continua siendo un problema

de suma importancia, conllevando a algunos tipos de *Escherichia coli* a causar diarrea hemorrágica, insuficiencia renal y hasta la muerte. Esto, en general, ocurre en niños y en adultos con sistemas inmunitarios debilitados. Afectando a todos los grupos de edad y comunidades enteras. Por tal razón es necesario proceder a la desinfección del agua. Esta desinfección es verdaderamente importante ya que pudiera usarse como fuente de agua para consumo humano.

Los métodos de desinfección de las aguas servidas son principalmente la cloración y la iozonización, pero también se ha usado otros métodos distintos. Donde el más usado es la cloración por ser barata, fácilmente disponible y muy efectiva. Sin embargo, el cloro es tóxico para la vida acuática.

Desde el punto de vista de la salud pública se encuentra aceptable un agua servida que contiene menos de 1000 coliformes totales por 100 ml y con una demanda biológica de oxígeno (DBO) inferior a 50 mg/L.

La estructura que se usa para efectuar la cloración es la *cámara de contacto*. Consiste en una serie de canales interconectados por los cuales fluye el agua servida tratada de manera que ésta esté al menos 20 minutos en contacto con el cloro, tiempo necesario para dar muerte a los microorganismos patógenos. Es ahí donde entra la necesidad de encontrar nuevas alternativas que resulten efectivas para su desinfección.

Las nanopartículas de plata surgen como un prometedor método eficiente por su excelente acción bactericida, evidenciando su actividad antibacteriana.

Comprobamos que su formulación es oxidada por el medio provocando la liberación de iones plata de tal manera que con la presencia del oxígeno podemos observar que hay un mayor efecto antibacteriano.

1.3 Hipótesis

El soporte de nanopartículas de plata en polvos nanoestructurados de óxido de cerio producido mediante la síntesis hidrotérmica y síntesis sol-gel asistido por microondas, podrán ser utilizados en los tratamientos de inhibición de bacterias *Escherichia coli* eficientemente; debido a que la plata por sí misma. Tiene una actividad antimicrobiana.

1.4 Objetivo general

Evaluar la inhibición de la bacteria *Escherichia coli*. Empleando las propiedades bactericidas de nanopartículas de plata soportadas en materiales mesoporosos de CeO₂, obtenidos mediante síntesis hidrotérmica y síntesis sol-gel asistida por microondas.

1.4.1 Objetivos particulares

- Estudiar la efectividad de nuestros sistemas inhibiendo la bacteria *Escherichia coli*.
- Determinar las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y concentraciones mínimas de bactericida (CMB) de los materiales biocidas en estudio para inhibir la *Escherichia coli*.
- Evaluar el efecto que tiene el soporte CeO₂ en las propiedades bactericidas de las partículas metálicas de Ag.
- Sinterizar polvos nanoestructurados a través del método hidrotérmico de CeO₂.
- Sinterizar polvos nanoestructurados a través del método sol-gel asistido por microondas de CeO₂.
- Soportar polvos nanoestructurados de CeO₂ con nanopartículas de Ag por el método de impregnación húmeda insipiente.

- Reducción de polvos nanoestructurados de (Ag/ CeO₂ 15%) con hidrógeno, mediante procesos químicos.
- Dar a conocer la importancia de los materiales mesoporosos como medios para soportar agentes de carácter bactericidas.

CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO

2.1 Óxido de Cerio (CeO₂)

Es un compuesto atractivo por su efectividad y su potencial en diferentes aplicaciones tecnológicas tales como: en catálisis, su uso en sensores y bloqueador solar (Yang Z. 2010), igualmente tiene la habilidad de oxidar totalmente los hidrocarburos junto con el monóxido de carbono.

De acuerdo con Trovarelli (2002) una de las principales características que tiene el cerio, es que actúa como un sistema de almacenamiento de oxígeno, cuando es preparado por descomposición de sales en la presencia del Ce⁴⁺, muestra en su superficie una gran cantidad de radicales OH, propiciando reacciones de óxido-reducción.

El CeO₂ lo encontramos como cerianita en la naturaleza, presenta una celda unitaria cúbica simple en las caras, como se muestra a continuación.

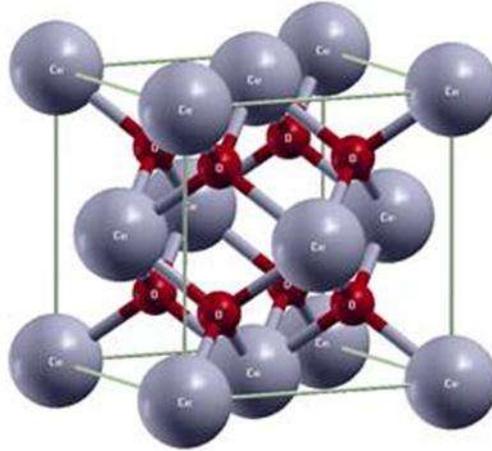


Figura 2.1 Fase Cristalina del (CeO₂), cerianita.

2.2 Plata (Ag)

La plata es un elemento químico, del grupo de los metales de transición, que tiene como símbolo químico, Ag, el cual proviene de la abreviación de su nombre en latín, argentum, que significa blanco y brillante. La plata es un metal escaso en la corteza terrestre, sin embargo es el más abundante y menos costoso de los metales preciosos (oro, plata, paladio y platino). La plata se encuentra en la naturaleza cerca de la superficie terrestre en forma de menas (minerales que contienen distintos metales) y en aleación con otros metales, usualmente con oro y cobre. El hombre, al desarrollar métodos de extracción, separación y purificación de oro y cobre, observó que se formaba la plata como uno de los subproductos, es por esto que se cree que fue el tercer metal que el hombre descubrió. (Hampel, C.A. 1968). (Everest, A.S. 1950). Desde el descubrimiento de la plata hasta la época moderna este metal ha causado una gran fascinación entre las civilizaciones, dado que cuenta con extraordinarias propiedades físicas y químicas. (Jastram, W.R. 1981).

Durante la segunda parte de la Revolución Industrial el uso de la plata aumentó, al intensificarse la producción masiva de compuestos químicos. En el año de 1931 la plata revolucionó la industria textil, ya que el químico francés Theodor Lefort descubrió una reacción química, que usa plata como catalizador, para la producción

de óxido de etileno, el cual es la principal materia prima en la producción de polyester textil. Asimismo, tecnologías recientes de identificación por medio de radio frecuencia, utilizan la plata como sensor, y se espera que tenga un impacto en el área de la medicina ya que se consigue el monitoreo de actividad metabólica digestiva de un paciente o niveles de glucosa en un diabético (R. J. Cross. 2008).

Finalmente, la plata metálica tiene un extenso pasado como agente esterilizador. En las antiguas civilizaciones (1000 A.C.) se observaba que contenedores de plata mantenían el agua potable. Asimismo, desde hace siglos se usan sales de éste metal en el tratamiento de heridas y quemaduras al observar que tiene propiedades cauterizadoras. Dado que es un bactericida de amplio espectro, actúa también previniendo infecciones y promoviendo la cicatrización. Con las nuevas tecnologías de fabricación desarrolladas recientemente, se ha usado la plata extensivamente al incorporarla a materiales como la madera para evitar descomposición y recubriendo superficies que requieren mantenerse estériles, como prótesis y como catéteres. (Gupta, A. Silver, S.1998)

Asimismo, sus capacidades bactericidas de amplio espectro lo posicionan como un potencial candidato a convertirse en la futura familia de antibióticos, ante la constante amenaza que presencia el hombre con el incremento de resistencia de las bacterias a antibióticos comunes. México, como pocos países del planeta, está agraciado con vastos recursos naturales, entre los que se encuentra la plata. El estudio de la plata y la investigación sobre sus propiedades y posibles aplicaciones futuras debe ser impulsado en México.

2.3 Nanopartículas

En la actualidad nanopartículas de diferente naturaleza son utilizadas en muy diversas disciplinas, desde la medicina a la óptica, la física, la biología, o, la química debido a sus excelentes propiedades y las cada vez más numerosas aplicaciones que de ellas se derivan.

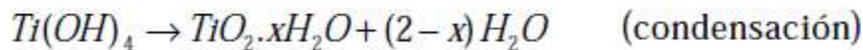
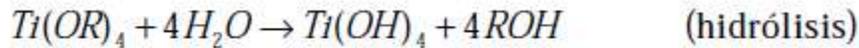
Una nanopartícula se define como un material con propiedades definidas de tamaño inferior a 100 nm. En función de la naturaleza del material estructurado hablamos de nanopartículas de naturaleza semiconductor, 1 metálica, 2 magnética, 3 etc... La estructuración de materiales en este intervalo de tamaños permite, en muchos casos, el control de sus propiedades ópticas, su conducción eléctrica, sus propiedades térmicas, su comportamiento magnético así como su reactividad o actividad catalítica. (Z. Alfassi, D. Bahnemann, A. Henglein, J. Phys. Chem. 1982)

Las nanopartículas constan de un núcleo inorgánico y un recubrimiento de naturaleza orgánica que cumple varias funciones. Por una parte les confiere estabilidad química en medio líquido. Mediante el método de inyección en caliente se producen generalmente nanopartículas rodeadas de moléculas orgánicas (ligandos) de naturaleza apolar que las estabiliza en medios no acuosos. Por otra parte, estos ligandos, aportan la carga necesaria para neutralizar trampas de superficie, es decir, estados localizados resultado de imperfecciones cristalinas o defectos de carga de la superficie del cristal (aunque también pueden ser resultado de impurezas o especies adsorbidas). (J. S. Owen, J. Park, P. E. Trudeau, A. P. Alivisatos, J. Am. Chem. 2008)

2.4 Síntesis Sol-Gel

El método más comúnmente utilizado es sol-gel, es el más exitoso en la síntesis de nanopartículas impurificadas, porque permite controlar el nivel de impurificación y el tamaño de partícula por simples variaciones en las condiciones experimentales, como la velocidad de hidrólisis y los precursores. El método sol-gel consiste, de manera general, en la preparación de un sol, gelación del sol y remoción del solvente. Un gel es una suspensión coloidal de partículas sólidas en un líquido. Donde por coloide entendemos que es una suspensión en la cual la fase dispersa es muy pequeña (~1-1000 nm), de tal manera que la influencia de la fuerza gravitacional es despreciable e interaccionan entre sí mediante fuerzas de atracción

de Van Der Waals y de cargas superficiales. Este estado se puede encontrar dentro de la síntesis en la etapa donde se tiene una solución de los diferentes reactivos y que se está sometiendo a las reacciones de hidrólisis y condensación. En este punto, el peso molecular de las especies producidas se incrementa constantemente. Conforme las especies crecen, pueden empezar a enlazarse formando una red tridimensional. (Burda, C. Qiu, X. 2007)



Reacciones de hidrólisis y condensación en el método sol-gel. (R=grupo alquilo)

El gel es una sustancia que contiene un esqueleto sólido continuo encapsulando una fase líquida continua. Si una molécula alcanza dimensiones macroscópicas y se extiende a través de la solución, se forma el gel.

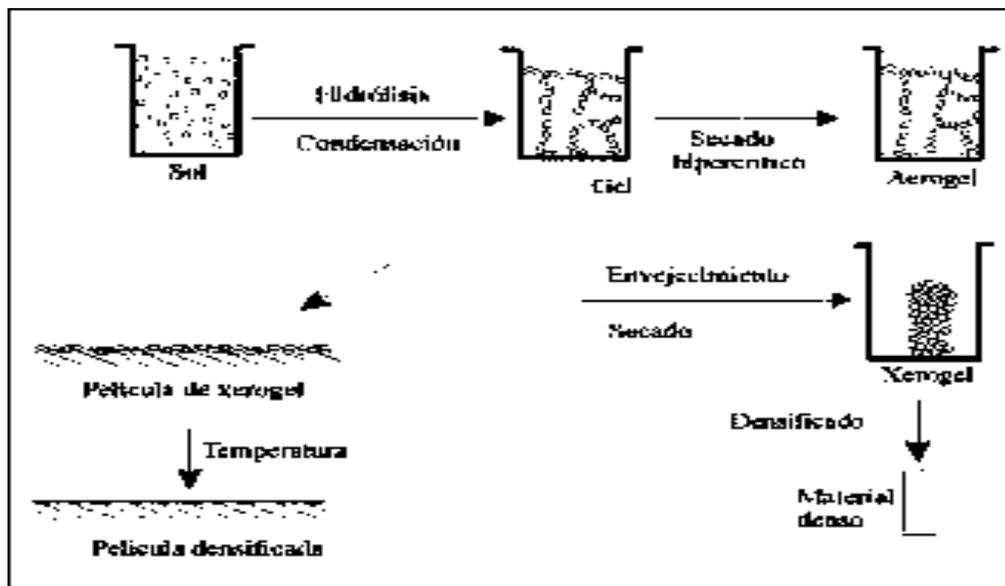


Figura 2.2 Síntesis Sol-Gel (Castañeda, J)

El alcogel consiste de dos partes, una sólida y una líquida. La parte sólida es una red tridimensional de partículas unidas. La parte líquida (el solvente original del sol) llena el espacio libre alrededor de la parte sólida. Se conoce como xerogel como el

producto de la eliminación de la parte líquida de un alcogel mediante evaporación. El secado por evaporación en condiciones normales provoca un aumento en la presión capilar que origina a su vez un encogimiento de la red del gel, este comúnmente es extremo, ~ 90%.(García, M. 2010)

2.5 Síntesis hidrotérmico

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

El tratamiento hidrotérmico tiene varias ventajas: la obtención de un producto altamente cristalino y homogéneo a una temperatura relativamente baja (< 150°C); esto favorece la baja aglomeración entre partículas, un homogéneo tamaño de partícula y el control de la morfología de la partícula; también ofrece una composición uniforme, partículas monodispersadas y control en la forma y en el tamaño de las partículas.

2.6 Síntesis por Microondas

La utilización de radiación micro ondas para la síntesis de sólidos inorgánicos presenta grandes beneficios: ahorro energético, tiempos cortos de procesamiento, mayor rendimiento, procedimiento económico y amigable con el medio ambiente (Byrappa, K; Adschiri, T. 2007). En un proceso de síntesis por microondas existe un perfil inverso de temperatura comparado con los métodos convencionales: el calentamiento ocurre por conversión en lugar de por transferencia de energía.

El fotón de microondas corresponde en promedio a 2.45 GHz, energía cercana a 0.0016 eV. Las microondas son ondas electromagnéticas compuestas de un campo eléctrico y otro magnético. Para propósitos relacionados con el calentamiento con

microondas, el componente eléctrico es el importante y para el caso de los materiales magnéticos las interacciones del campo magnético también tienen relevancia (Kappe, O. 2004)

Existen dos efectos principales de la irradiación con microondas:

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

Los componentes eléctricos provocan calentamiento por dos mecanismos: polarización dipolar y conducción iónica.

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

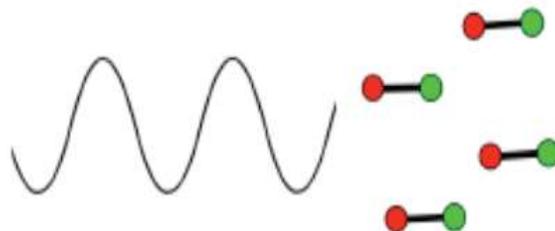


Figura 2.3 Interacción dipolar

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

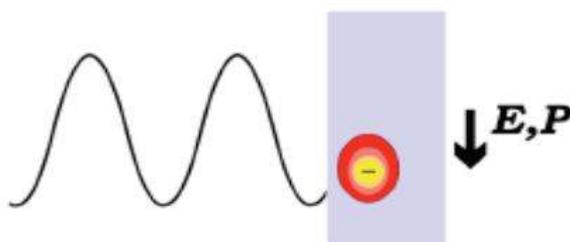


Figura 2.4 Conducción Iónica

Existen tres fenómenos que mejoran los procesos asistidos por microondas con respecto a los fenómenos térmicos convencionales.

1. Efectos térmicos: en la mayoría de los casos la razón de la mejora en de los procesos químicos es meramente un efecto térmico. Esto significa que la alta temperatura de reacción adquirida rápidamente bajo irradiación de microondas de materiales polares provoca un incremento en la constante de reacción.
2. Efectos térmicos específicos de microondas: Además de los efectos térmicos, hay efectos de microondas que son causados por la naturaleza única del calentamiento dieléctrico por microondas. Estos efectos deben ser definidos como aceleraciones de transformaciones químicas en microondas que no se puede lograr o duplicar por calentamiento convencional.

2.1. Efecto de súper calentamiento del solvente. El calentamiento mediante microondas de líquidos hace que su punto de ebullición esté por arriba que su punto de ebullición a presión atmosférica. Este efecto es debido a que la energía irradiada se disipa por todo el volumen del solvente y no existe una interface líquido-gas para que se libere la energía mediante la ebullición del líquido.

2.2. Efecto de pared: mediante calentamiento por microondas la superficie de la pared del reactor generalmente no se calienta debido a que la energía es disipada en todo el volumen de la mezcla de reacción.

Sin embargo, la temperatura en el interior de la pared del reactor es menor que la del líquido.

2.3. Calentamiento volumétrico: otro fenómeno característico del calentamiento por microondas es el rápido y prácticamente sin gradientes de temperatura calentamiento por toda la mezcla de reacción.

2.4. Calentamiento selectivo heterogéneo: si una muestra contiene más de un componente, solo aquella que acopla con las microondas es calentada selectivamente.

3. Efectos no térmicos específicos de microondas: resultado de la interacción del campo eléctrico con moléculas específicas en el medio de reacción y el efecto electrostático polar.

Incremento en el factor A de la ecuación de Arrhenius: la ecuación de Arrhenius:

$$k = A e^{\left(\frac{-E_a}{RT}\right)} \quad [\text{ecuación 2}]$$

Dónde:

K = constante cinética de reacción.

A = factor pre exponencial o de frecuencia.

E_a = energía de activación.

R = constante universal de los gases.

T = temperatura absoluta.

El factor A pre-exponencial que representa la probabilidad de un impacto molecular. El número de eventos de colisiones puede verse afectado por la orientación de las moléculas polares involucradas en la reacción. Dado que este factor depende frecuencia de las vibraciones de los átomos en la interface de reacción se puede afirmar que el campo de microondas influye en este.

CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA

En el presente capítulo se describe la metodología empleada para la obtención de los diferentes compuestos utilizados en el estudio de inhibición de la bacteria *Escherichia coli*. Así mismo se describen las condiciones de análisis para cada técnica utilizada para efectuar las concentraciones de plata en peso, favorecer la reducción e incorporación de esta misma sobre los cristales nanoestructurados de CeO_2 .

3.1 Materiales

Se realiza la síntesis de óxido de cerio (CeO_2) por las técnicas sol-gel e hidrotermico, en ambos casos se utiliza Acetato de cerio (III) hidratado grado reactivo (Sigma Aldrich) como precursor. Se depositara plata a una concentración 1.5 % en relación peso por el método de impregnación húmeda incipiente usando como precursor el nitrato de plata de grado reactivo (Sigma Aldrich). Para favorecer la reducción de la plata y la incorporación del metal, los materiales se someterán a tratamientos químicos. Los materiales soporte-Ag preparados se pusieron en contacto con las bacterias para explorar las propiedades biocidas del material.

Compuesto involucrado en la síntesis de catalizadores.

Método de síntesis	Compuestos deseados	Compuesto precursor	Formula química	Marca
Sol-gel asistido por microondas	CeO_2	Acetato de cerio (III) hidratado	$(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_3\text{Ce} \cdot x\text{H}_2\text{O}$	ALDRICH
Hidrotermico	CeO_2	Acetato de cerio (III) hidratado	$(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_3\text{Ce} \cdot x \text{H}_2\text{O}$	ALDRICH

Tabla 3.1 Compuestos involucrados en la síntesis de catalizadores



Figura 3.1 Microondas marca Anton Paar modelo Synthos 300



Figura 3.2 Equipo para síntesis hidrotermico y horno marca Felisa

3.2 Síntesis sol-gel de CeO₂ asistido por microondas

El proceso comienza con la disolución del acetato de cerio con 11.6 ml de agua, (según sea el caso) calentando a una temperatura de 60°C, con agitación constante durante 4 horas, en otro vaso de precipitado, se tiene el etilenglicol con 21.6 ml de agua, bajo las mismas condiciones, la función del etilenglicol será como agente gelificante.

Una vez cumplido y efectuada la hidrolisis, se procede a mezclar poco a poco las dos soluciones con agitación continua, a una temperatura de 80°C hasta la obtención del gel. Posteriormente se lleva al microondas durante 20 minutos a una temperatura de 150°C. Se seca durante 24 horas a una temperatura de 120°C; el polvo es molido y tamizado. Se coloca en un crisol, sometándose a calcinación durante 4 horas a una temperatura de 400°C permitiendo que el material se enfríe en el horno; el polvo es nuevamente molido y tamizado.

El siguiente esquema muestra de manera general lo descrito con anterioridad.

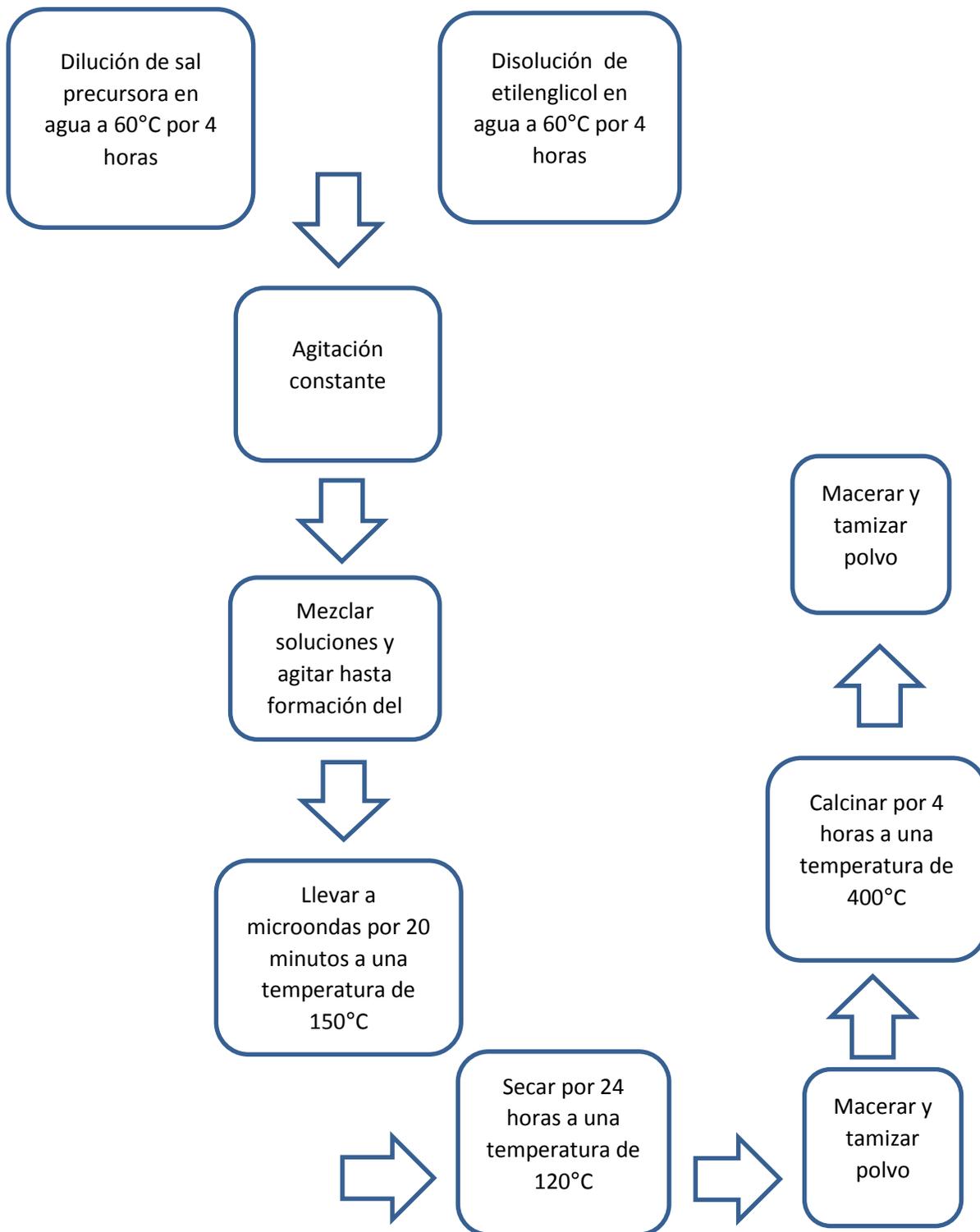


Figura 3.3 Esquema general síntesis sol-gel asistido por microondas de CeO₂

3.2.1 Síntesis hidrotermico de CeO₂

El proceso comienza con disolver el acetato de cerio en 10 ml de agua, (según sea el caso) calentando a una temperatura de 60°C durante 2 horas, agregar gota a gota 10 ml de solución de hidróxido de sodio. Una vez homogéneo pasar a reactor cerrar herméticamente, tapar y secar por 48 horas a una temperatura de 180°C; el polvo se saca de la estufa y se lava con agua hasta obtención de un pH de 7.

Secamos por segunda vez en vaso de precipitado durante 12 horas a una temperatura de 120°C; el polvo se macera y pasamos a crisol. Calcinar por 4 horas a una temperatura de 400°C; el polvo se macera y tamiza.

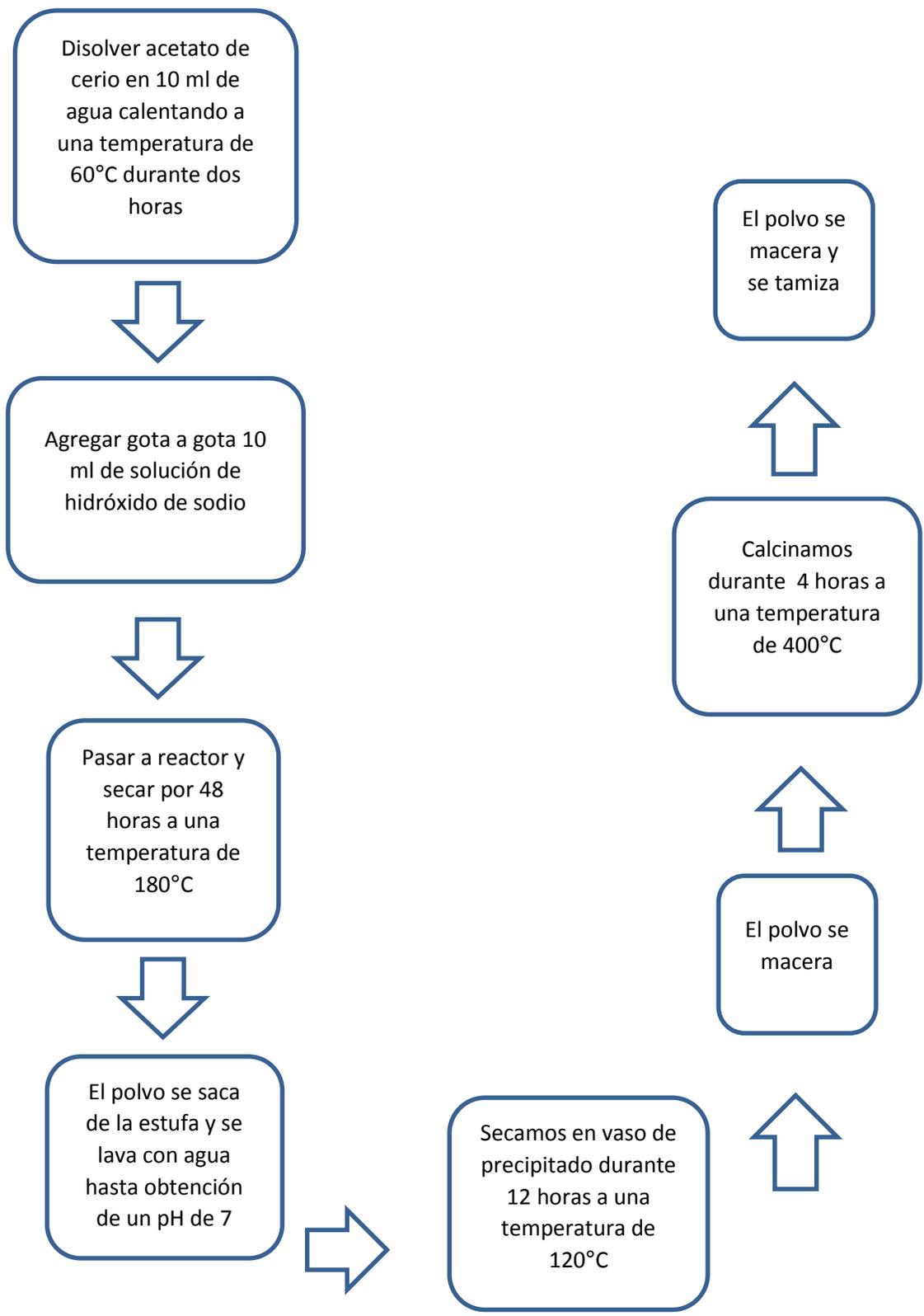


Figura 3.4 Esquema general de Síntesis hidrotermico de CeO₂

3.3 Método de impregnación húmeda incipiente

El proceso comienza en hacer una solución con 0.071 gr (según sea el caso) nitrato de plata (AgNO_3) en 3 ml de agua, con agitación constante hasta disolución a una temperatura de 70°C . Colocar en baño maría a una temperatura de 70°C el polvo de óxido de cerio e ir impregnando gota a gota con solución de nitrato de plata durante 2 horas; agitando y no dejando que seque la muestra. Secar polvo de (Ag/CeO_2) durante 12 horas a una temperatura de $100\text{-}120^\circ\text{C}$; macerar polvo. Calcinamos el polvo de (Ag/CeO_2) durante 2 horas a una temperatura de 400°C .

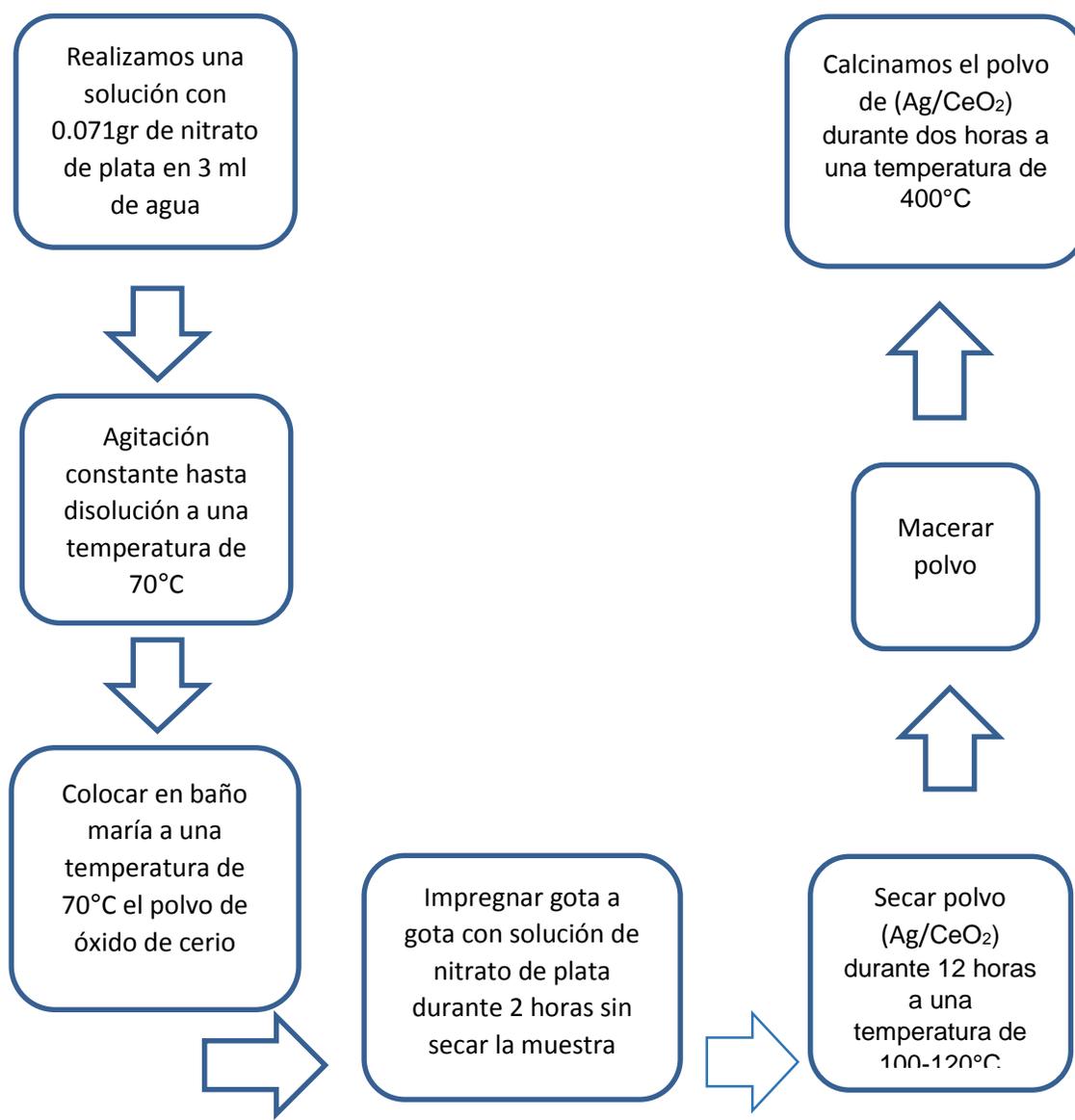


Figura 3.5 Esquema general de impregnación húmeda incipiente

3.4 Método de reducción con hidrogeno

El proceso comienza en distribuir el polvo de (Ag/CeO₂) previamente impregnado en canoa de porcelana e introducir a reactor, conectamos flujo laminar de hidrogeno de 30 ml por minuto, durante 2 horas a una temperatura de 400°C.

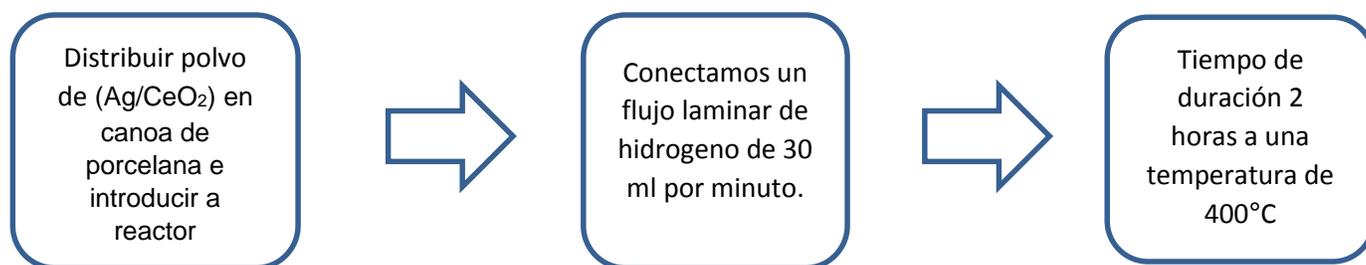


Figura 3.6 Esquema general de método de reducción con hidrogeno.



Figura 3.7 Equipo para reducción de cristales mediante hidrogeno marca LINDBERG/BLE

3.5 Caracterización de los materiales

3.5.1 Microscopia electrónica de barrido (MEB)

En esta técnica mediante un haz de luz de electrones que incide sobre la superficie de muestra, realiza un barrido, dando información morfológica y topográfica de la superficie en estudio. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio electrónico de barrido MEB modelo JSM-7600 JEOL Noran Instruments, con condiciones de trabajo de 15keV y 10⁻⁶ mmHg. De manera previa las muestras fueron cubiertas en vacío con un elemento metálico, a fin de evitar cargas electrostáticas que dificultan tomar las imágenes.



Figura 3.8 Microscopio electrónico de barrido MEB modelo JSM-7600 JEOL Noran Instruments

3.5.2 Difracción de rayos X (XRD)

Con esta técnica se pretende evaluar la estructura cristalina de los compuestos sintetizados, así como los cambios en el tamaño de cristal en los principales planos cristalográficos. La caracterización se llevó a cabo en un equipo de difracción de rayos X, SIEMENS D5000 X-Ray diffractometer. Los distintos polvos impurificados y sin impurificar se analizaron en este equipo, las condiciones de operación fueron con un tamaño de paso de 0.02° en un intervalo de análisis de $10-80^\circ$, un voltaje de 35 KeV y una corriente de 30 mA. Como lo podemos ver en la siguiente figura.



Figura 3.9 difracción de rayos X XRD, SIEMENS D5000 X-Ray diffractometer.

3.6 Actividad antibacterial

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

3.6.1 Preparación de 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) 25922. Las cepas fueron proporcionadas por el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Michoacán, las cuales se hicieron crecer en cuñas 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 *Escherichia coli*, observando su morfología en microscopio óptico.

3.6.2 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 ensayo con tapa rosca, en condiciones asépticas. Y se almacenó en refrigerador a una temperatura de 4°C.

3.6.3 Preparación de placas con agar

El agar Müller-Hinton, se preparó según las indicaciones del fabricante. Después de esterilizarse, se dejó enfriar (en forma estéril bajo campana de flujo laminar 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.

3.6.4 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 5 ml de caldo de soya tripticaseína a 37°C hasta alcanzar la turbidez estándar. Esta suspensión contendrá aproximadamente 1×10^8 UFC/ml de *Escherichia coli*. Los inóculos se sembraron cada 24 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.

3.6.5 Valoración de concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) de los sistemas

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 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.

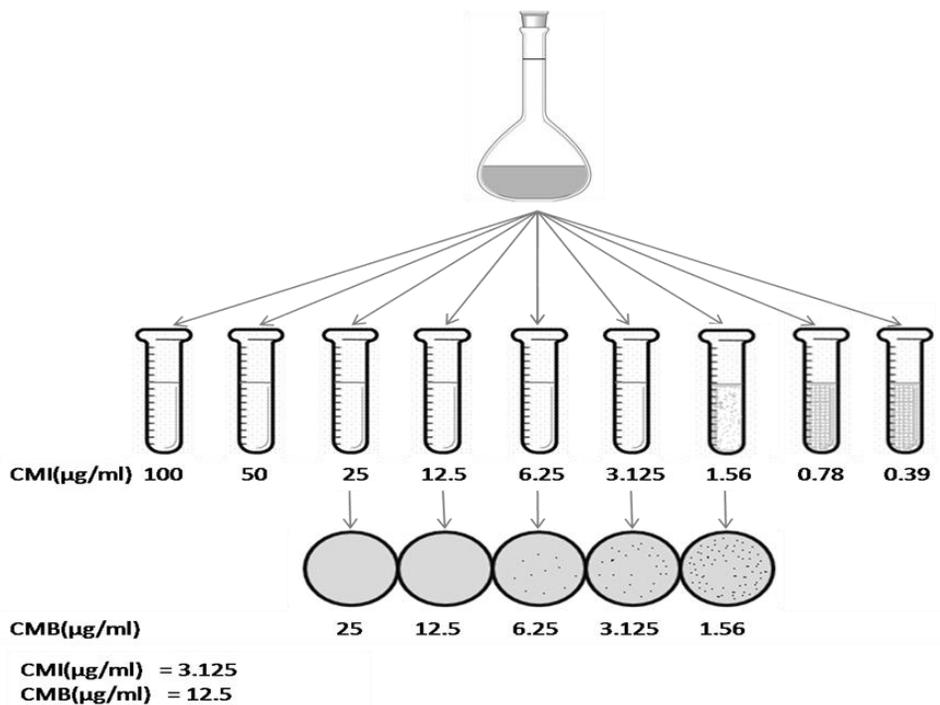


Figura 3.10 Valoración de concentración, mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) de los sistemas.

3.6.6 Crecimiento bacteriano en presencia de los sistemas

Se determinó el crecimiento de las bacterias en presencia de los sistemas 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.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aquí se mostrarán los resultados obtenidos para las diferentes técnicas empleadas para caracterizar, sintetizar y evaluar los sistemas como inhibidores para *Escherichia coli*. En una primera parte, se muestra los resultados relativos a la preparación de los sistemas CeO₂, (Ag/CeO₂ 15%) en forma de cristales por síntesis sol-gel asistido por microondas, síntesis hidrotérmico, impregnación vía húmeda incipiente y proceso de reducción con hidrogeno. En una segunda etapa se muestran tanto el crecimiento como la inhibición de las colonias de la bacteria de *Escherichia coli* formadas en las placas. Los compuestos fueron evaluados en su eficiencia para poder inhibir a la bacteria *Escherichia coli* de las aguas residuales que afectan al ser humano en general.

4.1 Microscopia electrónica de barrido (MEB)

A continuación, se presenta las fotomicrográficas haciendo los análisis químico para el (Ag/CeO₂ 15%) por síntesis sol-gel asistido por microondas y síntesis hidrotérmico, ambos sistemas reducidos con hidrogeno, con el propósito de medir la luminiscencia de cada elemento que lo componen, observar la distribución del elemento Ce principalmente Ag.

4.2 Oxido de cerio impregnado con plata al 1.5% reducido por síntesis sol-gel asistido por microondas (Ag/ CeO₂-1.5%)

En la siguiente figura (a), (b), corresponde a (Ag/CeO₂ 15%) ya reducido por síntesis sol-gel asistido por microondas con aumento de 1000x respectivamente, con tamaños de grano que oscilan entre 10.2 micras. Observamos su forma de cristales irregulares de gran tamaño.

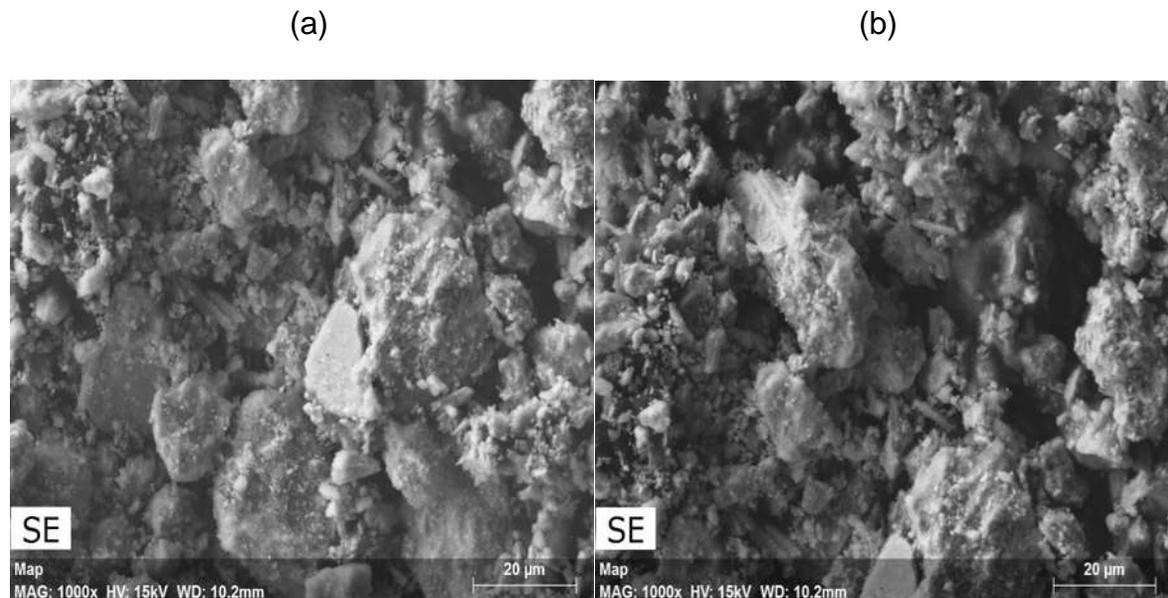


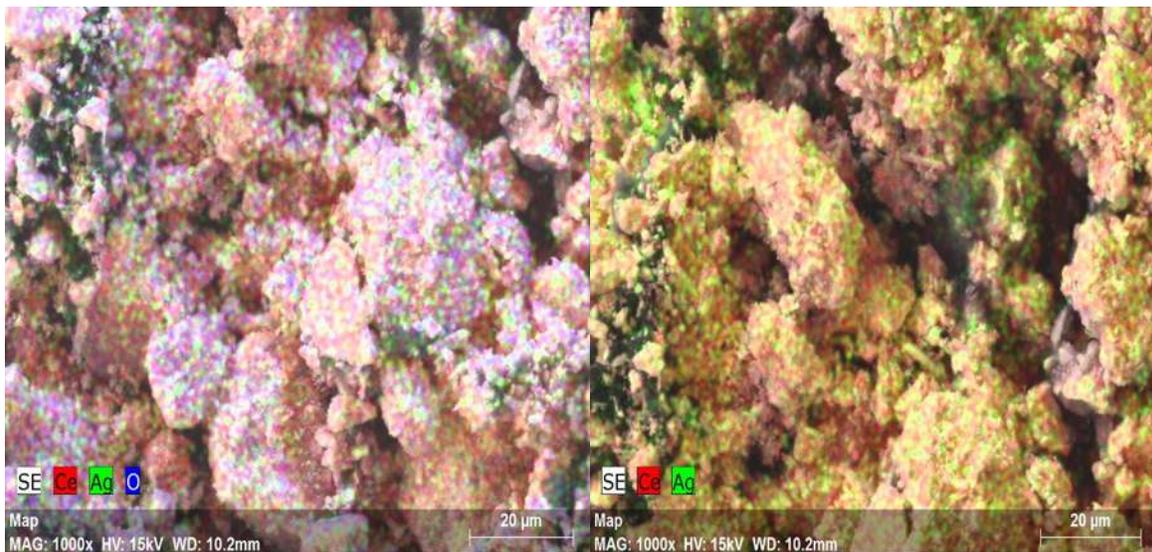
Figura 4.1 (Ag/CeO₂ 15%) por síntesis sol-gel asistido por microondas y reducido con hidrogeno (a) 1000x;(b) 1000x.

4.2.1 Mapeo a color de Óxido de cerio impregnado con plata al 1.5% reducido por síntesis sol-gel asistido por microondas (Ag/CeO₂ 15%)

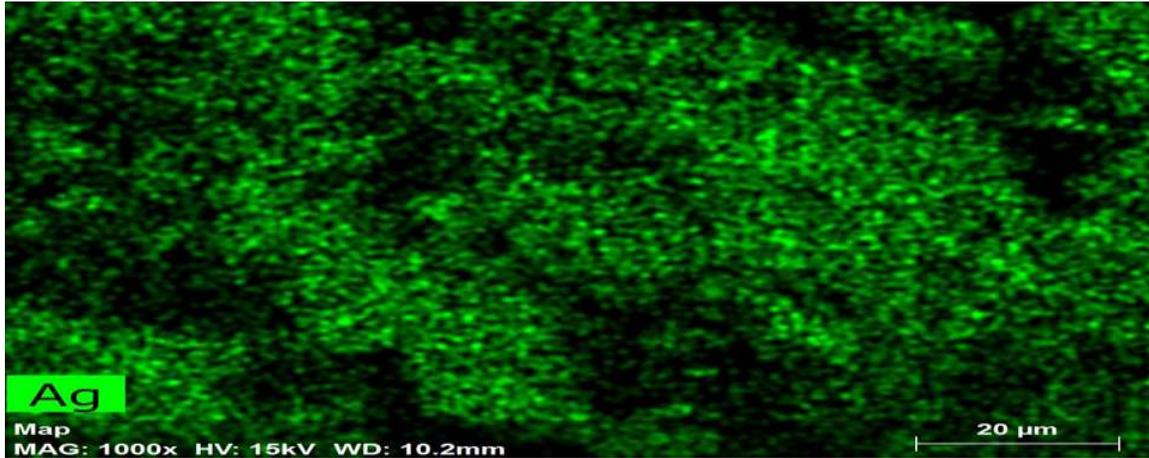
En la siguiente figura (a), (b), (c), (d) y (e) corresponde a (Ag/CeO₂ 15%) ya reducido por síntesis sol-gel asistido por microondas con aumento de 1000x respectivamente, Se muestran las imágenes por mapeo a color de cada uno de los elementos con fin de conocer su distribución del polvo los cuales están perfectamente distribuidos, principalmente.

(a)

(b)



(c)



(d)

(e)

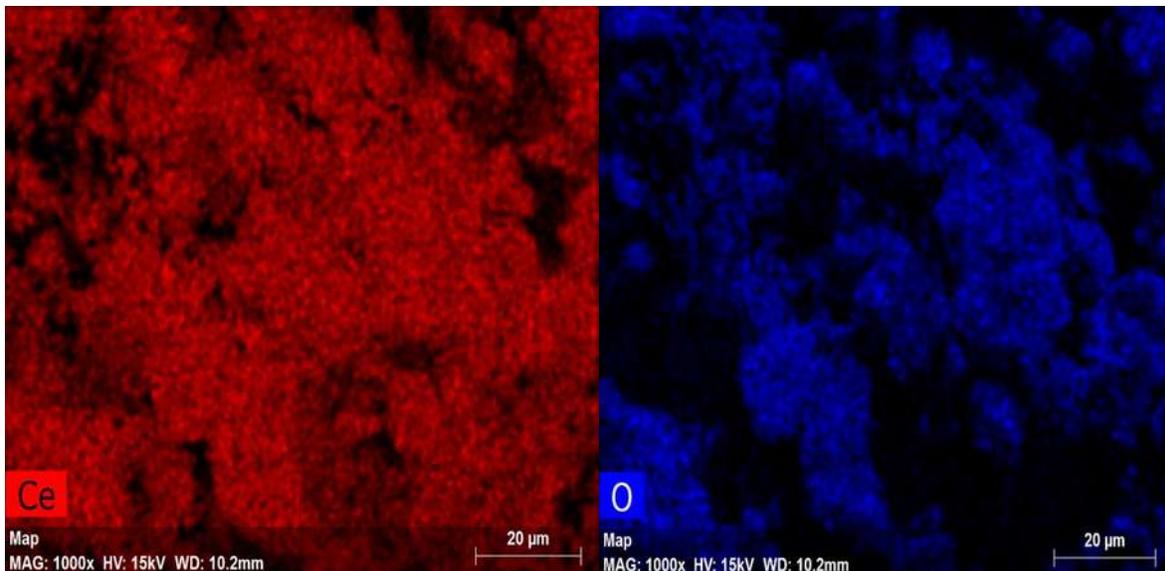


Figura 4.2 (a), (b), (c), (d) y (e) corresponde a el mapeo de Ag, O y Ce por color de cada uno de los elementos de (Ag/CeO₂ 15%) ya reducido por síntesis sol-gel asistido por microondas con aumento de 1000x.

4.3 Óxido de cerio impregnado con plata al 1.5% por síntesis sol-gel asistido por microondas recuperado después de las pruebas microbiológicas (Ag/CeO₂ 15%)

En el siguiente mapeo figura (a), (b), corresponde a (Ag/CeO₂ 15%) recuperado de las pruebas microbiológicas ya reducido por síntesis sol-gel asistido por microondas con aumento de 1000x; 2500x respectivamente, con tamaños de grano que oscilan entre 10.2 – 10.3 micras. Con fin de observar su distribución, los cuales están perfectamente distribuidos, su forma de arena las cuales las vemos de un tamaño uniforme.

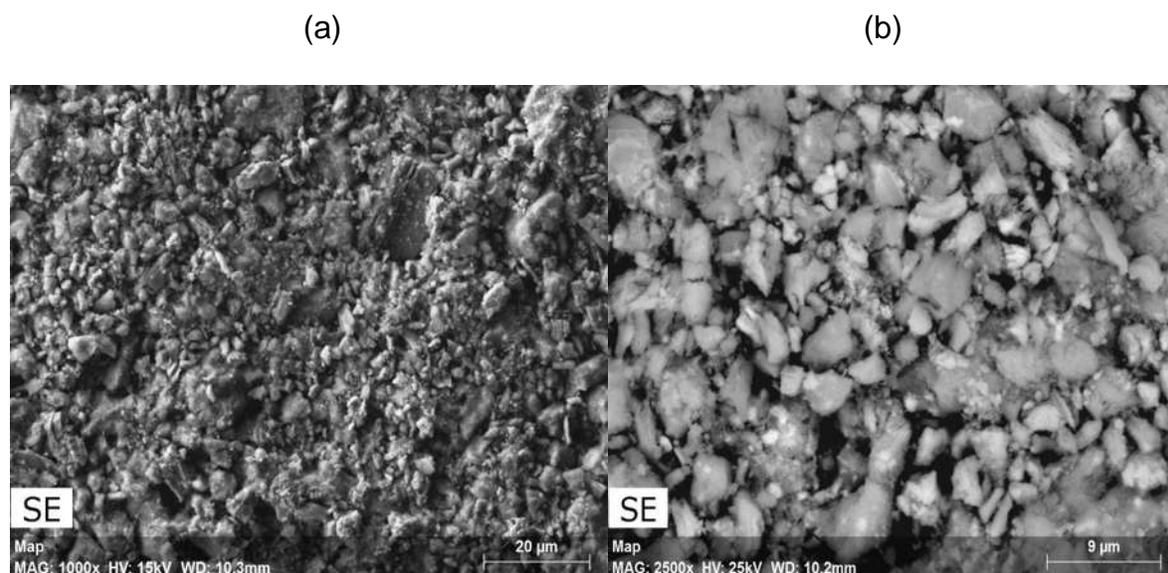


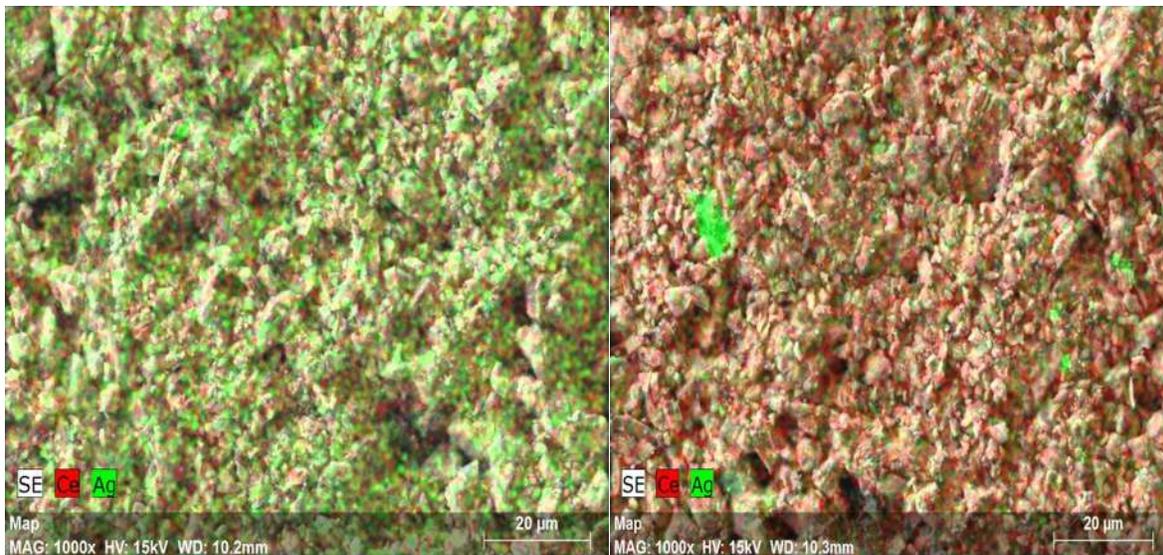
Figura 4.3 (Ag/CeO₂ 15%) recuperado de muestras microbiológicas por síntesis sol-gel asistido por microondas reducido con hidrogeno recuperado (a) 1000x;(b) 2500x.

4.3.1 Mapeo a color de Óxido de cerio impregnado con plata al 1.5% por síntesis sol-gel asistido por microondas reducido y recuperado después de las pruebas microbiológicas (Ag/CeO₂ 15%)

En la siguiente figura (a), (b), (c) y (d) corresponde a (Ag/CeO₂ 15%) ya reducido por síntesis sol-gel asistido por microondas después de las pruebas microbiológicas con aumento de 1000x respectivamente, Se muestran las imágenes por mapeo a color de cada uno de los elementos con fin de conocer su distribución de cristales los cuales están perfectamente distribuidos, principalmente de la plata con tamaño uniforme y algunos acúmulos de esta misma.

(a)

(b)



(c)

(d)

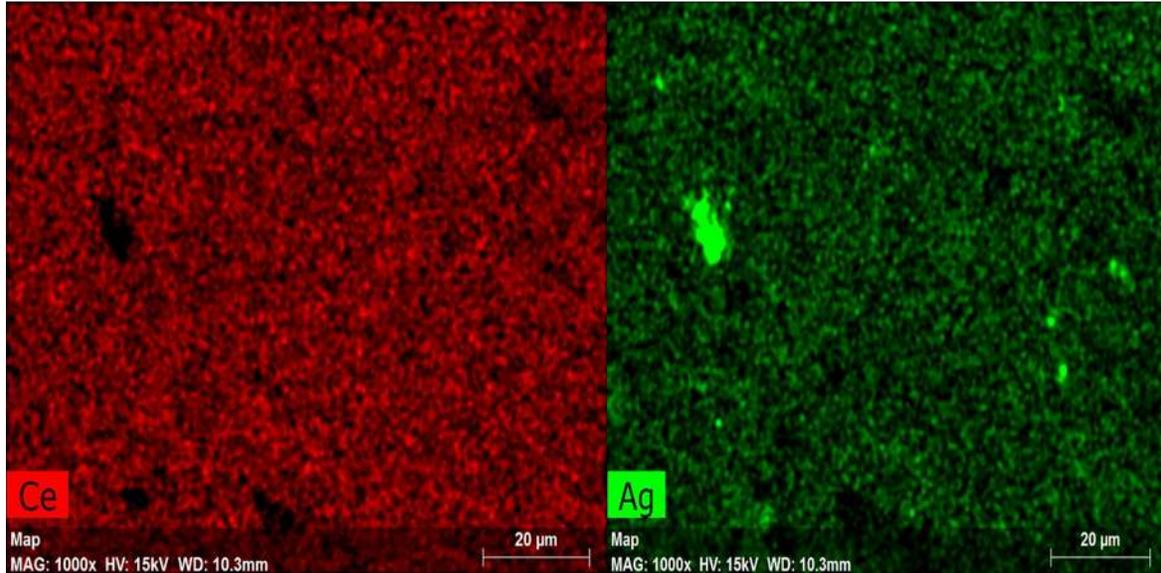


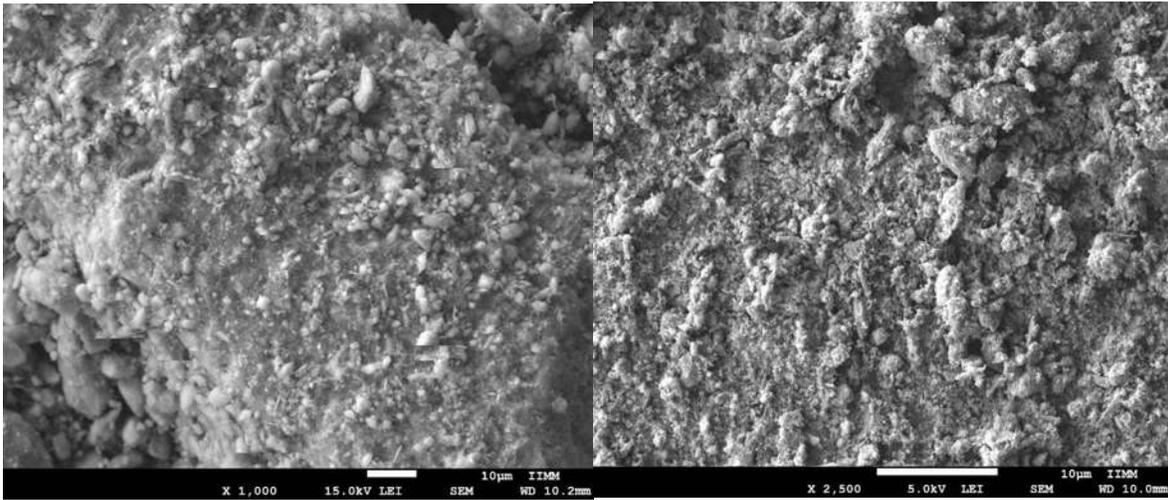
Figura 4.4 (a), (b), (c) y (d) corresponde a el mapeo de Ag, Ce por color de cada uno de los elementos de (Ag/CeO₂ 15%) recuperado y reducido por síntesis sol-gel asistido por microondas con aumento de 1000x, después de las pruebas microbiológicas.

4.4 Óxido de cerio impregnado con plata al 1.5% por síntesis hidrotermico (Ag/CeO₂ 15%)

En la siguiente figura (a), (b), (c) y (d) corresponde a (Ag/CeO₂ 15%) ya reducido por síntesis hidrotermico con aumento de 1000x; 2500x; 5000x; y 10000x respectivamente, con tamaños de grano que oscilan entre 10.0 y 10.2 micras. Observamos su forma de cristales irregulares de gran tamaño.

(a)

(b)



(b)

(d)

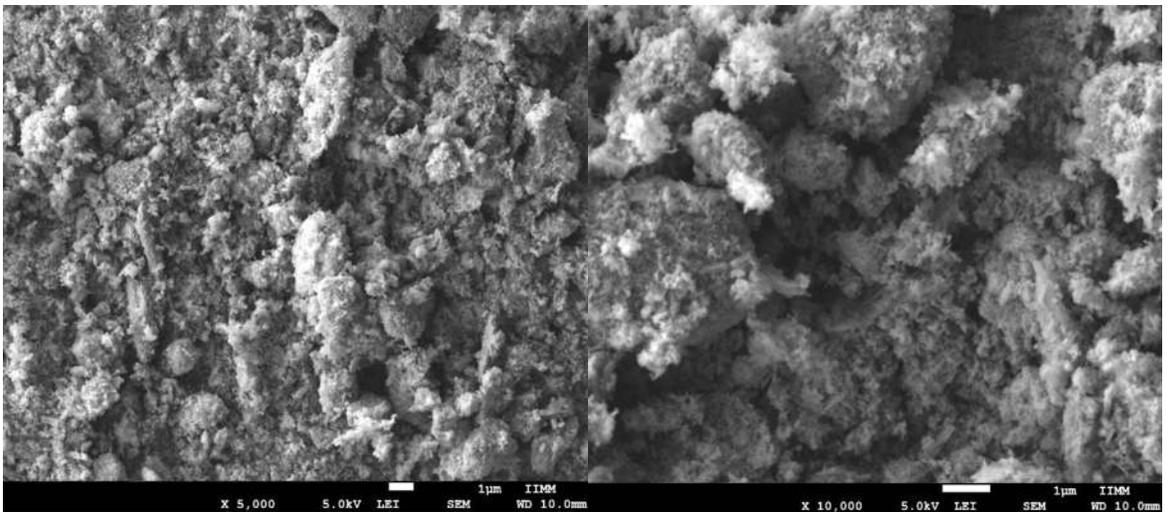


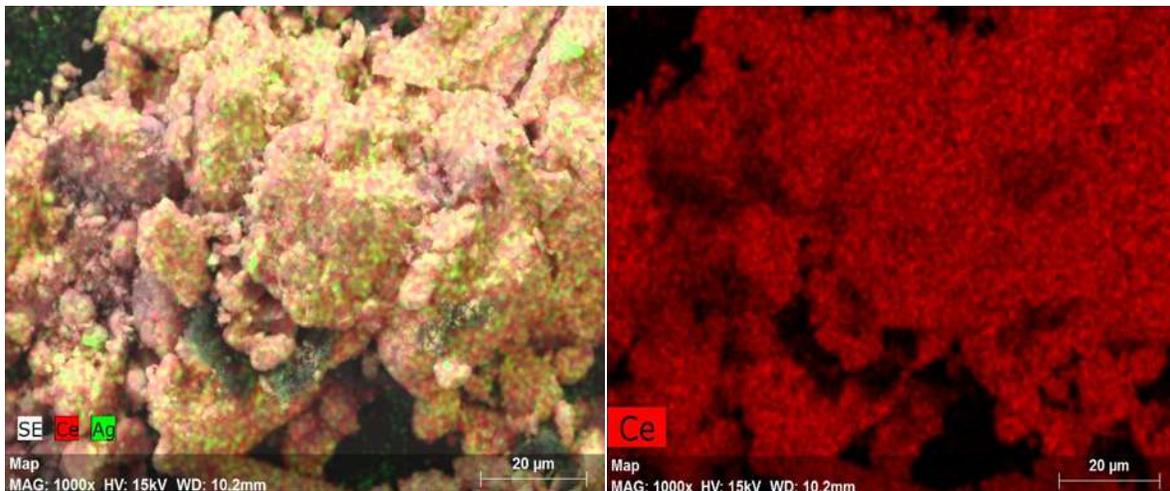
Figura 4.5 (a), (b), (c) y (d) corresponde a (Ag/CeO₂ 15%) ya reducido por síntesis hidrotermico con aumento de 1000x; 2500x; 5000x; y 10000x respectivamente.

4.4.1 Mapeo a color de Óxido de cerio impregnado con plata al 1.5% por síntesis hidrotérmica recuperado después de las pruebas microbiológicas (Ag/CeO₂ 15%)

En la siguiente figura (a), (b) y (c) corresponde a (Ag/CeO₂ 15%) ya reducido por síntesis hidrotérmica después de las pruebas microbiológicas con aumento de 1000x respectivamente, Se muestran las imágenes por mapeo a color de cada uno de los elementos con fin de conocer su distribución de los cristales cuales están perfectamente distribuidos, principalmente de la plata con tamaño uniforme y algunos acúmulos de esta misma.

(a)

(b)



(c)

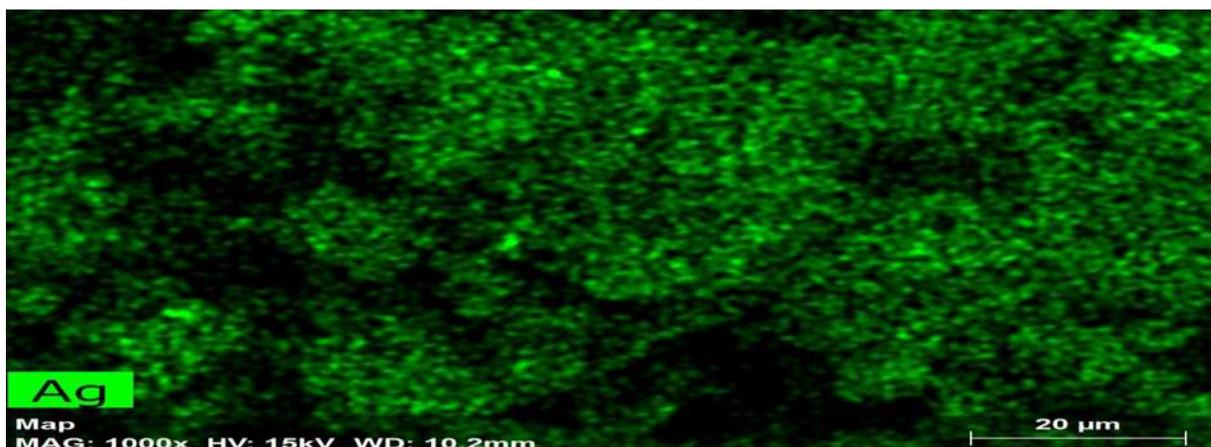


Figura 4.6 (a), (b) y (c) corresponde a los compuestos Ce, Ag del polvo (Ag/CeO_2 15%) ya reducido por síntesis hidrotérmico después de las pruebas microbiológicas con aumento de 1000x respectivamente.

4.5 Difractogramas de rayos x (XRD) de (Ag/CeO_2 15%)

En seguida se muestra los patrones de difracción de rayos x (XRD) de las muestras de (Ag/CeO_2 15%). Los cuales utilizamos para autenticar si efectivamente se encuentran dispersos las nanopartículas tanto de la plata como del cerio dando como resultado el difractogramas picos asociados a la plata y cerio, los picos etiquetados como Ag corresponden a las nanopartículas de plata y Ce a las nanopartículas de cerio. Las muestras con plata presentan picos estrechos bien definidos, atribuibles a plata metálica

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 plata se conservó. Con el aumento de la cantidad de plata, las partículas pequeñas se aglomeran para formar otras más grandes, que se localizan.

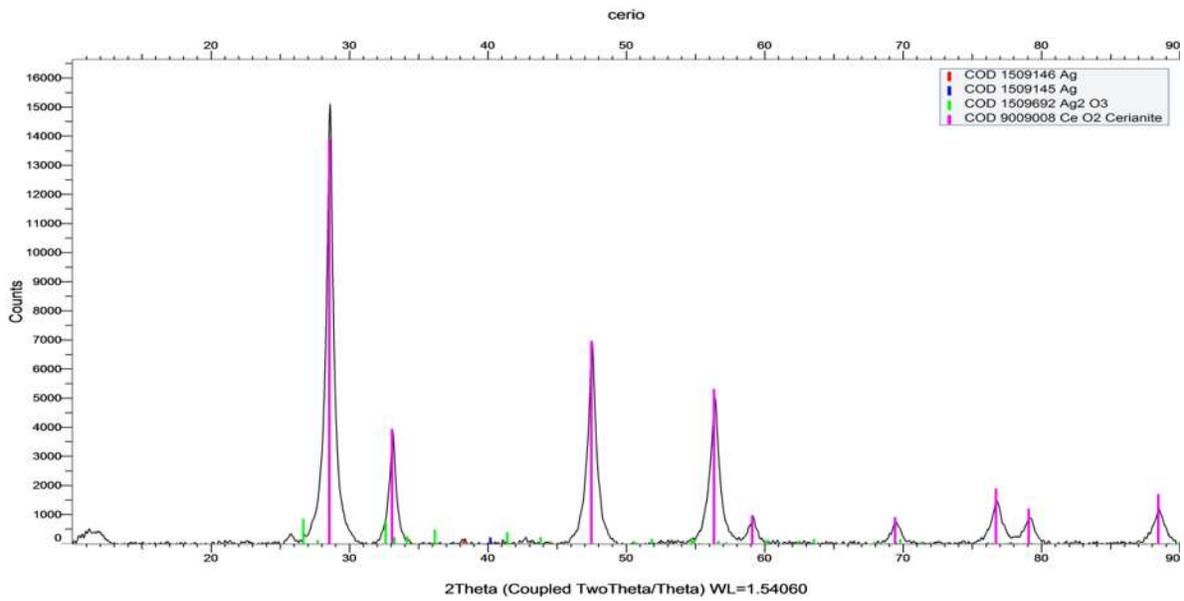


Figura 4.7 Difractograma de nanopartículas de (Ag/CeO₂ 15%) por síntesis hidrotermico.

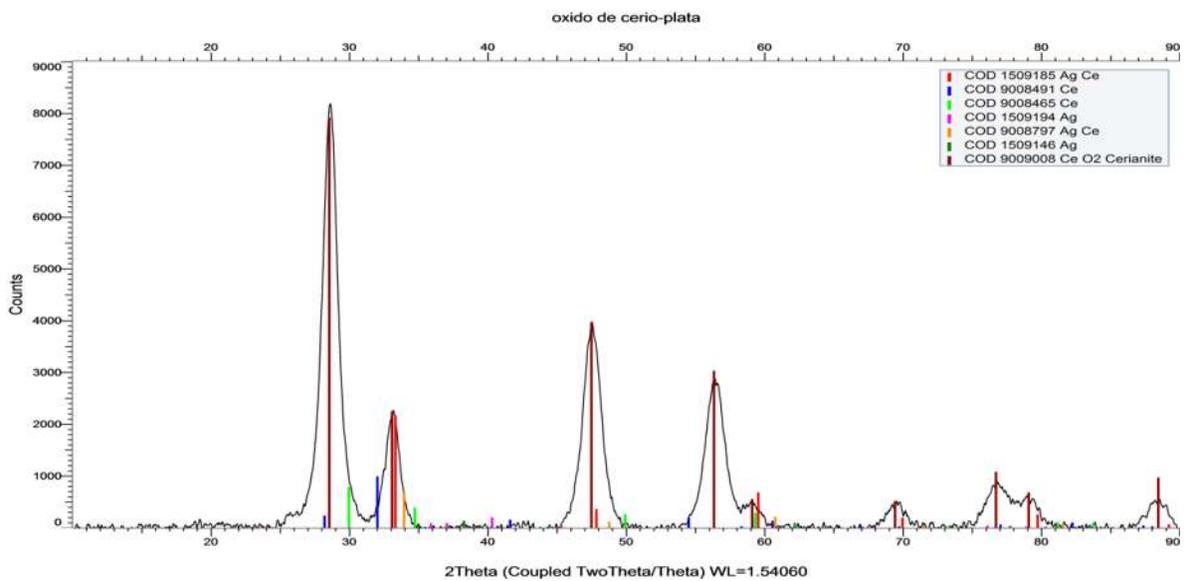


Figura 4.8 Difractograma de nanopartículas de (Ag/CeO₂ 15%) por síntesis hidrotermico recuperado después de pruebas microbiológicas.

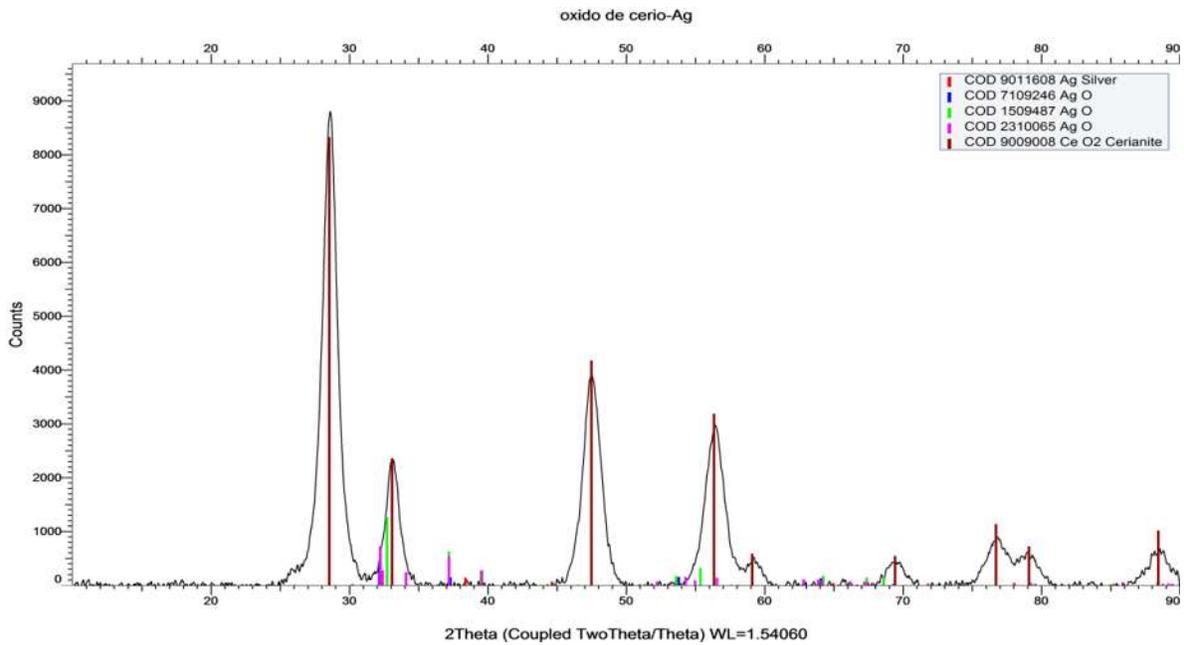


Figura 4.9 Difractograma de nanopartículas de (Ag/CeO₂ 15%) por síntesis sol-gel asistida por microondas.

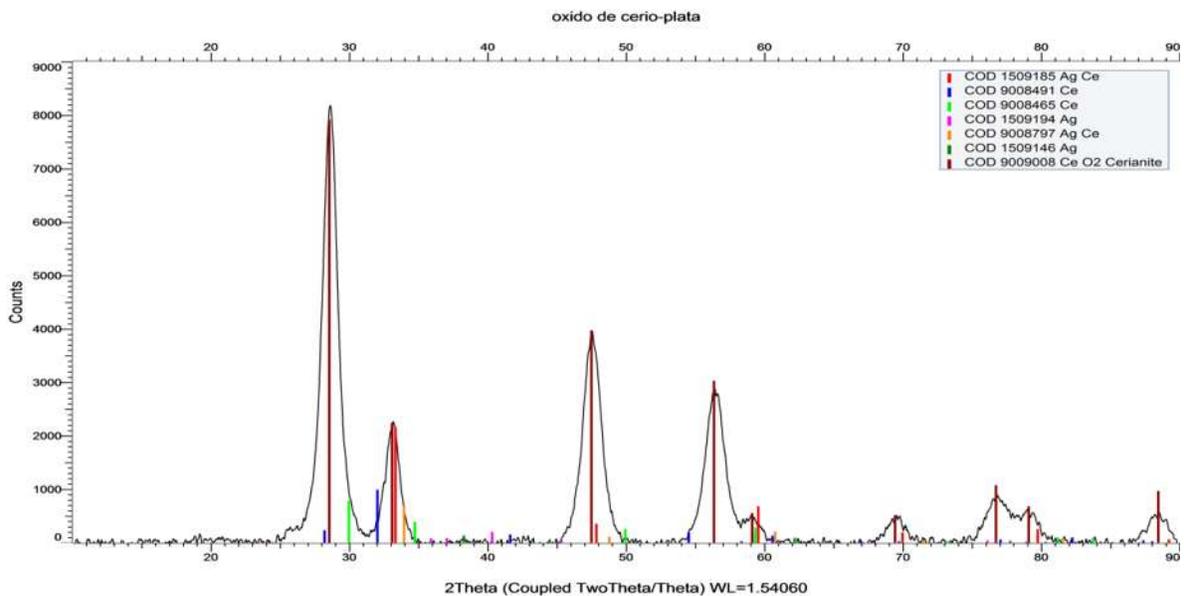


Figura 4.10 Difractograma de nanopartículas de (Ag/CeO₂ 15%) por síntesis sol-gel asistida por microondas recuperado después de pruebas microbiológicas.

4.6 Antibiograma en medio sólido

Para el análisis del efecto de los materiales sobre la cepa, se utilizó la técnica de difusión empleamos discos de papel impregnados con 0.06g (según sea el caso) de cristales sobre el medio inoculado con nuestra cepa. Tras un periodo de exposición de 24 horas frente a los diferentes materiales a una temperatura de incubación de 37°C La cuantificación de colonias bacterianas crecieron en placas con agar Hinton-Müller, Para el análisis del efecto de los materiales.



Figura 4.11 Antibiograma en medio sólido de *Escherichia coli* en medio Müller-Hinton.

4.7 Evaluación antibacterial de (Ag/CeO₂ 15%) contra *Escherichia coli*.

Los métodos para evaluar la actividad antimicrobiana se clasifican en distintos grupos uno de ellos fue la dilución en caldo el cual se utiliza para determinar tanto concentración mínima bactericida (CMB), como concentración mínima inhibitoria (CMI), definiendo como CMI la concentración más baja que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de aislar en placas de agar Müller-Hinton e incubar por 24 horas. Cabe mencionar que los materiales en esta investigación, puede modificarse al ser usados y no perder sus propiedades antibacteriales.

Concentraciones mínimas de los materiales soporte-Ag para *Escherichia Coli*.

Cepa/ Material biocida	Control 1	2.2 x 10 ⁻³ g/ml	3.3 x 10 ⁻³ g/ml	4.4 x 10 ⁻³ g/ml	5.5 x 10 ⁻³ g/ml	6.6 x 10 ⁻³ g/ml	7.7 x 10 ⁻³ g/ml	Control 2
CMI	+	+	+	+	-	-	-	+
CMB	+	+	+	+	-	-	-	+

Tabla 4.1 (+): Indica que hubo crecimiento bacteriano, (-): indica ausencia de crecimiento

En seguida se muestra la tabla de valores con respecto al conteo de colonias *Escherichia coli* y tiempo de acción de las nanopartículas utilizadas del (Ag/CeO₂ 1.5%).

Nanopartículas	Tiempo (0min)	Tiempo (15min)	Tiempo (30min)	Tiempo (60min)	Tiempo (90min)	Tiempo (120min)	Tiempo (180min)	Tiempo (240min)
Patrón	250	280	292	310	328	344	370	400
CeO ₂ -Ag 1.5%. Sol-gel Microondas	37	34	13	6	0	0	0	0
CeO ₂ -Ag 1.5%. Sol-gel Microondas recuperado	39	38	28	13	0	0	0	0
CeO ₂ -Ag 1.5%. Hidrotermico	250	180	58	0	0	0	0	0
CeO ₂ -Ag 1.5%. Hidrotermico recuperado	250	195	70	0	0	0	0	0

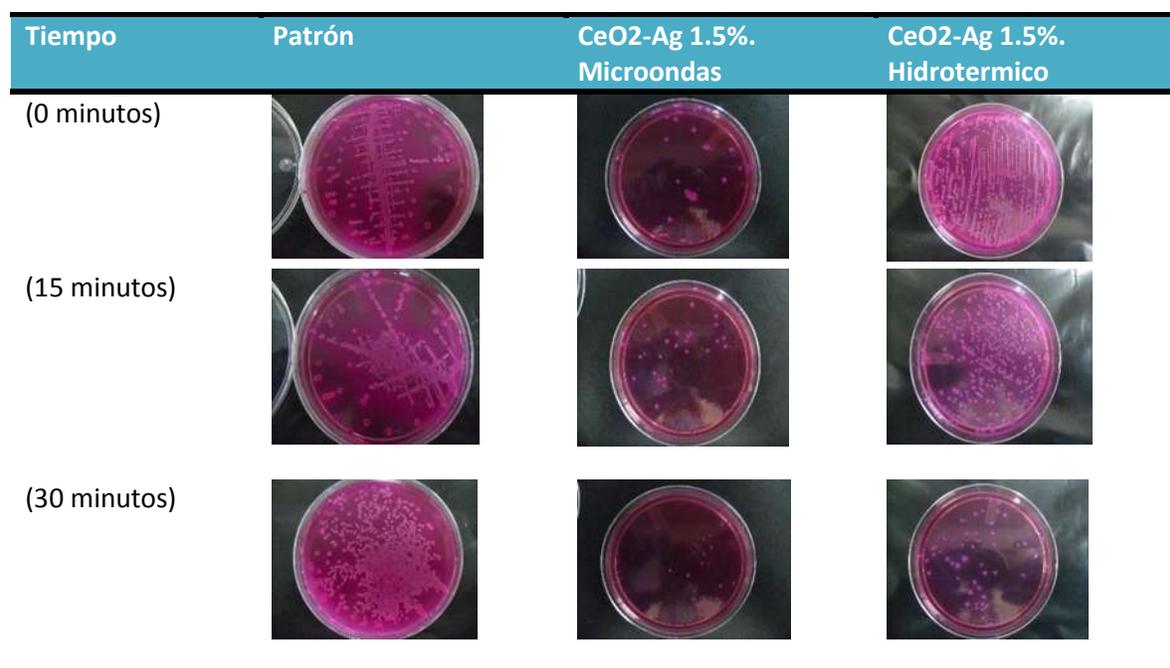
Tabla 4.2 Conteo de colonias de *Escherichia coli* contra nanopartículas de (Ag/CeO₂ 15%) por síntesis sol-gel asistido por microondas, sol-gel asistido por microondas recuperado, hidrotermico, hidrotermico recuperado.

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

En la figura 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 *Escherichia 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.



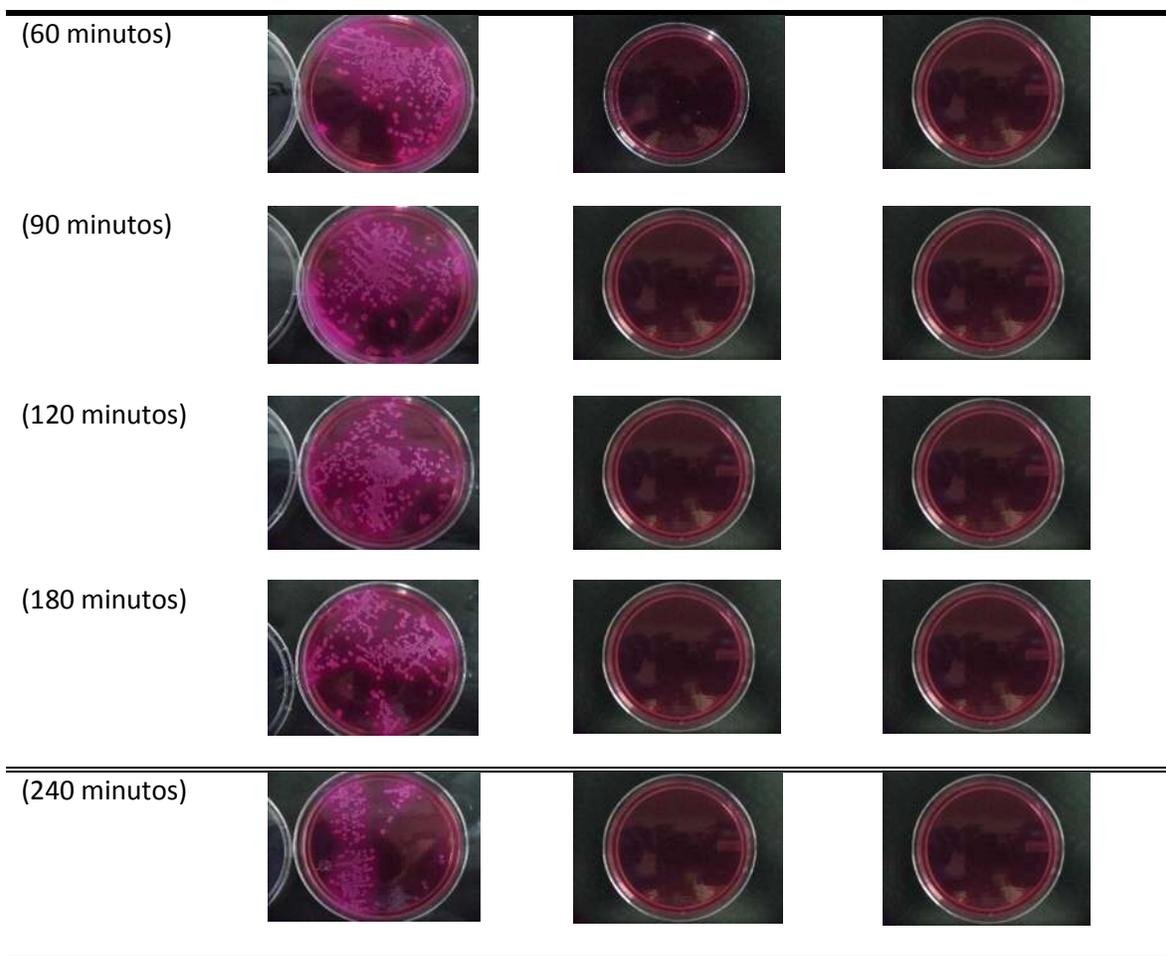


Tabla 4.3 Efecto inhibitorio de la *Escherichia coli* con los materiales (Ag/CeO₂ 15%) por los diferentes sistemas.

La valoración del efecto bactericida de los materiales se realizó al medir la viabilidad celular a los 0, 15, 30, 60, 90, 120, 180 y 240 minutos después de la exposición e incubación de las bacterias con los distintos materiales. Las pruebas se realizaron por triplicado en placas con agar Müller-Hinton. 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 gráfica diferente que va de acuerdo a su mecanismo de acción.

4.9 Curvas del conteo de colonias que corresponden a las pruebas realizadas a cada uno los sistemas utilizados.

La pauta de administración de los materiales bactericidas está en función a la concentración mínima bactericida (CMB) promedio determinada para cada bacteria.

En seguida se muestran las pruebas microbiológicas realizadas, para obtener curvas de crecimiento de los microorganismos en presencia de los materiales como agentes antimicrobianos. Presentando las curvas de viabilidad de las bacterias *Escherichia coli* expuestas a la plata iónica y a los materiales respectivamente. La actividad de la plata iónica y los materiales (Ag/CeO₂ 15%) por síntesis sol-gel asistido por microondas, microondas recuperado, hidrotermico, hidrotermico recuperado. Presentan un efecto bactericida en todo momento para bacterias *Escherichia coli* (*E. Coli*)

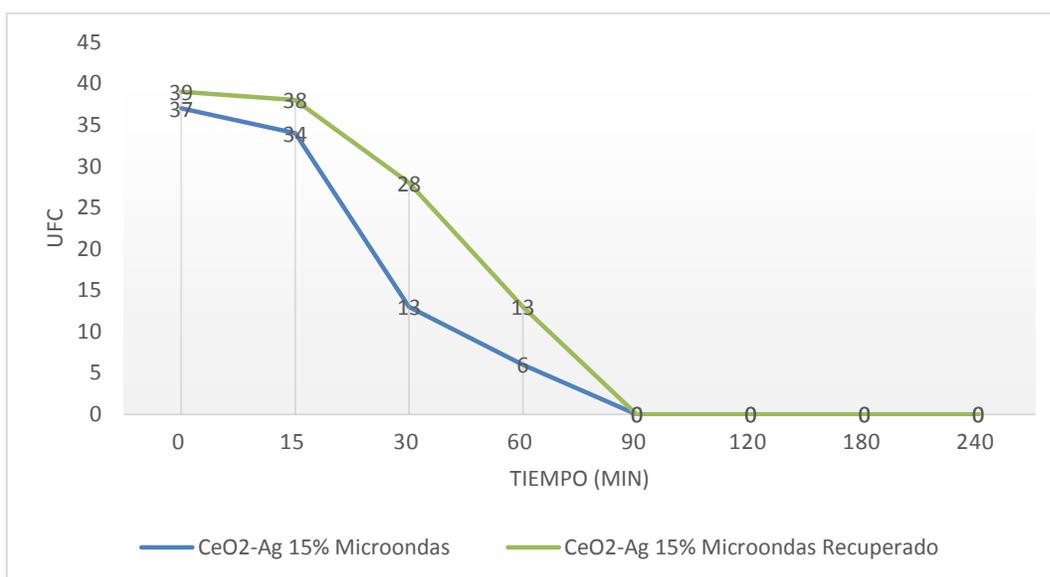


Figura 4.12 Efecto inhibitorio de las nanopartículas de Ag por síntesis sol-gel asistida por microondas sobre el crecimiento de *Escherichia coli* (*E. coli*).

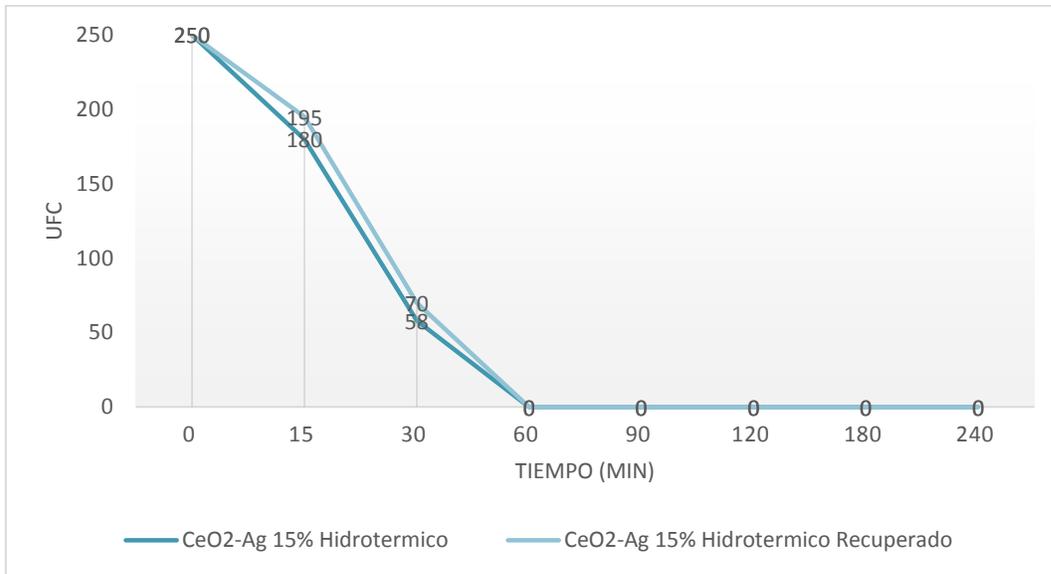


Figura 4.13 Efecto inhibitorio de las nanopartículas de Ag por síntesis Hidrotermico sobre el crecimiento de *Escherichia coli* (*E. coli*).

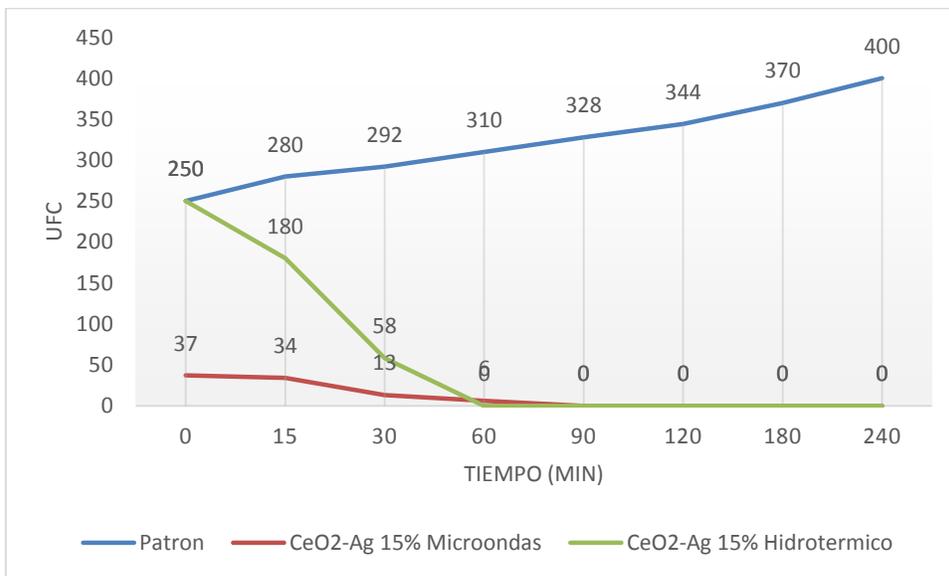


Figura 4.14 Comparación patrón de efecto inhibitorio de las nanopartículas de Ag sobre el crecimiento de *Escherichia coli* (*E. coli*).

Los resultados de los estudios microbiológicos “in vitro” han mostrado que las partículas manométricas de plata soportadas en cristales de óxido de cerio, poseen gran actividad bactericida.

Se observa un comportamiento bacteriostático con nanocristales por síntesis hidrotermico después de los 60 minutos de exposición con la bacteria frente a las NPAg, eliminando el 92% del inóculo inicial en este tiempo.

A diferencia de las NPAg, los nanocristales por síntesis sol-gel asistido por microondas presentaron un comportamiento menos bactericida. Los materiales con plata soportada eliminaron más del 90% de las colonias de *Escherichia coli* (*E. coli*) en un tiempo de 90 minutos. En los siguientes minutos, el efecto supresor de los materiales fue aún más claro, eliminando el 100% de colonias con las diferentes concentraciones utilizadas.

En los cultivos de *Escherichia coli* (*E. coli*) en presencia de los materiales con Ag, independientemente de la concentración en el soporte, siempre se observó un efecto bactericida. De toda la serie de materiales evaluados, el material (Ag/CeO₂ 15%) síntesis hidrotermico tuvo el mayor efecto bactericida eliminando el 100% del inóculo inicial en un tiempo de 60 min.

Las pruebas con los materiales (Ag/CeO₂ 15%) frente a *Escherichia coli* (*E. coli*) se observó similitud en la velocidad y porcentaje de eliminación de colonias. Esto puede atribuirse al tamaño de las nanopartículas de plata, a la forma de los cristales de cada uno de los sistemas, en la solución de plata iónica, en los sistemas por sí solos y por último la interacción con la célula bacteriana al penetrar en las bacterias.

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

A través del desarrollo del presente proyecto fue posible llegar y cumplir el objetivo inicial planteado inhibir a la bacteria *Escherichia coli*, empleando los sistemas de iones Ag, incorporados en cristales de CeO₂ como medio de soporte.

Se logró sinterizar los polvos nanoestructurados por síntesis hidrotermico y síntesis sol-gel asistido por microondas de CeO₂. La síntesis química del material propuesto a través de sol-gel asistido por microondas se llevó en un tiempo mucho menor que al método convencional de sol-gel.

Soportando los cristales nanoestructurados de CeO₂ con nanopartículas de Ag por el método de impregnación húmeda incipiente obteniendo una perfecta homogenización de los cristales. Para poder someter a un método químico de reducción de plata en los cristales nanoestructurados de nuestros sistemas (Ag/CeO₂ 15%) empleando hidrógeno.

Se observa a partir de los resultados obtenidos que este tipo de materiales mesoporosos son un medio adecuado para soportar agentes de carácter bactericida.

En las fotomicrografías de MEB obtenidas para nuestros sistemas de (Ag/CeO₂ 15%) nos muestran su amplia y perfecta distribución de los cristales. Por síntesis hidrotermico y sol-gel asistido por microondas, nos provee un material poroso y con formas definidas con tamaños de partícula de orden de micras o de nanómetros, también observamos cada elemento por mapeo a color observando muy buena distribución y buen tamaño de partícula de cada uno de nuestros sistemas.

En los análisis de DRX en los difractogramas obtenidos no se observa la formación de fases adicionales o de impurezas, por consecuencia podemos constatar que la actividad bactericida es atribuida únicamente al (Ag/CeO₂ 15%). Los sistemas de (Ag/CeO₂ 15%) son agentes antibacterianos para *Escherichia coli* (*E. coli*). Su eficacia, reflejada indica que los materiales son bactericidas y no bacteriostáticos. Algo importante es que es posible recuperar los sistemas con la posibilidad de reutilizarse.

BIBLIOGRAFÍA

- Arenas Hernández Margarita María de la Paz, Armando Navarro Ocaña, Tonatiuh Molina Villa, Jaqueline Martínez Alvarado, Fabiola Aroche Camarillo, Ygnacio Martínez Laguna. Rocha Gracia Rosa Del Carmen, Lozano Zarain, Patricia y Martínez Laguna. Escherichia coli UROPATÓGENA. En "Modelos de la Patogénesis de las Enfermedades Infecciosas II". Publicación especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, México. (2012); 978-607-487-476-1.
- Adán, "Fotocatalizadores nanoestructurados de TiO₂ y Fe-TiO₂ para la degradación de compuestos aromáticos en medio acuoso empleando Luz solar" Instituto de catálisis y Petroquímica. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. España. (2008).
- Alessandro Trovarelli. Catalysis by Ceria and Related Materials. Front Cover. Imperial College Press, (2002) - Science - 508.
- Barker, William H. "Perspectivas en la epidemiología y control de las enfermedades entéricas agudas". Pan American Health Organization Bulletin. (1975). 9(2): 148-156.
- Blanca Elena Jiménez. Technology & Engineering. La Contaminación Ambiental en México. Front Cover. Editorial Limusa, (2001); 200.
- Byrappa, K; Adschiri, T. "Hydrothermal technology for nanotechnology" Progress in crystal growth and characterization of materials. (2007) 53, 117-166.
- Burda, C; Qiu, X. "Chemically Synthesized Nitrogen-Doped Metal Oxide Nanoparticles". Chemical Physics (2007) 339, 1-10.
- Comité Mixto UNICEF-OMS sobre Política de Salud. "UNICEF/WHO Joint Study on Water Supply and Sanitation components of Primary Health Care". JC 22/UNICEF-WHO 79.3. Organización Mundial de la Salud. Ginebra. (1979). 30pp.
- Chmielewska D, Lukasiewicz A., Waliś L., Water soluble silica biocides containing quaternary ammonium salts. INCT Annual Report, (2006); 141-153.

- Chen X, Schluesener H. J. Nanosilver: A nanoparticle in medical application. Schluesener. (2007). Jan 4; 176(1):1-12
- Choi E, Unique D Box and KEN Box Sequences Limit Ubiquitination of and Promote Pseudosubstrate Inhibition of the Anaphase-promoting Complex. J Biol Chem (2008); 283(35):237 (01-10).
- Castañeda, J. "Fabricación de materiales amorfos y policristalinos con la ruta sol-gel" Centro Universitario de Los Lagos, Universidad de Guadalajara.
- Droste, R.L. Theory and practice of water and wastewater treatment. Jhon Wiley and Sons. Canada. (1997).
- Everest, A. S. Morgenthau the New Deal and Silver. A Story of Pressure Politics. King's Crown Press. (1950).
- F. Hernández-Chavarría, Fundamentos de epidemiología: el arte detectivesco de la investigación epidemiológica, San José, Costa Rica, 2002.
- Gwatkin, Davison. "Cuántos mueren" Un conjunto de estimados demográficos sobre el número de muertes anuales de infantes y niños en el mundo". American Journal of Public Health. (1980). 70: 1286-1289.
- Guyton A.C. and J.E. Buku Ajar Fisiologi Kedokteran. Jakarta. (2007); 74, 76, 80-81, 244, 248, 606, 636, 1070, 1340.
- Gupta A., Silver S. Silver as a biocide: will resistance become a problem Nat. Biotechnol. (1998); 16:888.
- García, M. "Síntesis y caracterización de Fotocatalizadores mesoporosos de óxidos mixtos de TiO₂-Al₂O₃ TiO₂-ZrO₂" Tesis de Doctorado en Metalurgia y Ciencias de los Materiales. (2010) UMSNH. México.
- Hampel, C.A. The Encyclopedia of the Chemical Elements. 1 ed., Skokie, Illinois: Reinhold Book Corporation. (1968).
- Henglein, A. J, Phys, Alfassi, Bahnmann. (1982); 86, 46, 56.

- Henglein, A. In Photochemical Conversion and Storage of Solar Energy, the Weizmann Science Press. Israel (1982); 115.
- H. M Kingston. S. J. Haswell. "Microwave-enhanced Chemistry." American Chemical Society Publication. (1997). 3-20.
- J.S. Owen, J. Park, P. E. Trudeau, A .P. Alivisatos, Reaction chemistry and ligand Exchange at cadmium-selenide nanocrystal surfaces, Chem. Soc. 130 (2008), 12279-12281.
- Jastram, W.R. Silver the Restless Metal. John Wiley and Sons Inc. (1981).
- K. Byrappa, T. Adschiri. Hydrothermal technology for nanotechnology, Review Article, (2007) Pages 117-166.
- Kappe, O. 'Controlled Microwave Heating in Modern Organic Synthesis' Angewandte Chemie International Edition. Volume 43, Issue 46. (2004) 6250-6284.
- Lee, N. M. Parameters Affecting Microorganisms and the Process Performance in Biological Wastewater Treatment. Tesis Doctoral. Department of Biotechnology Lund University, Suecia. (1996).
- L. Zhao, H. Wang, K. Huo, L. Cui, W. Zhang, H. Ni, et al., Antibacterial nano-structured titania coating incorporated with silver nanoparticles., Biomaterials. 32 (2011) 5706.
- L. Cheng, M.D. Weir, H.H.K. Xu, J.M. Antonucci, A.M. Kraigsley, N.J. Lin, et al., Antibacterial amorphous calcium phosphate nanocomposites with a quaternary ammonium dimethacrylate and silver nanoparticles., Dent. Mater. 28 (2012) 561.
- M07-A9: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition, (2012).
- MC. Guadalupe Rodríguez, Ángeles, "Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli", Salud Publica México. (2002); 44: 464-475
- M. Zhang, K. Zhang, B. De Gusseme, W. Verstraete, Biogenic silver nanoparticles (bio-Ag 0) decrease biofouling of bio-Ag 0/PES nanocomposite membranes., Water Res. 46 (2012) 2077.

- M. Montazer, A. Shamei, F. Alimohammadi, Stabilized nanosilver loaded nylon knitted fabric using BTCA without yellowing, *Prog. Org. Coatings*. 74 (2012) 270.
- M. Moritz, M. Geszke-Moritz, The newest achievements in synthesis, immobilization and practical applications of antibacterial nanoparticles, *Chem. Eng. J.* 228 (2013) 596.
- Nataro J, Enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. *Current Opinion in Gastroenterology*. (2005); 21, 4-8.
- Nataro J, Kaper J, Diarrheogenic *Escherichia coli*, *Clinical Microbiology Reviews*. (1998); 11, 142-201.
- Nataro J., Mai V., Johnson J., Diarrheogenic *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 reúsen 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).
- Neidhardt FC. *Escherichia coli* and *Salmonella*: celular and molecular Biology. 2nd edition. ASM Press. Washington. (1999).
- P. J. Bickel, K. A. Doksum, and J. L. Hodges. Wadsworth, Belmont. *Contributions to the Theory of Robust Estimation*. D. F. R.HAMPEL (1968).

- P. Prombutara, Y. Kulwatthanasal, N. Supaka, I. Sramala, S. Chareonpornwattana, Production of nisin-loaded solid lipid nanoparticles for sustained antimicrobial activity, *Food Control*. 24 (2012) 184.
- Ramalho R. Tratamiento de Aguas Residuales. Segunda edición. Editorial Reverté, S.A. Barcelona, España. (1993) Pp. 97 – 102.
- Rohde, Jon Eliot y Northrup, Robert S. “Taking Science Where the Diarrhoea Is”: End Acute Diarrhea in Childhood. Elsevier, Amsterdam. (1976) Pp.339-366.
- R. J. Cross. Vibration-rotation spectroscopy of molecules trapped inside C60. *J. Phys. Chem. A* (2008), 112, 7152.
- Romero, E. Characterization and thermos-hydro-mechanical behavior of unsaturated Boom clay. An experimental study. Tesis doctoral. Universidad Politecnica de Catalunya. (1999).
- R. J. Cross. Vibration-rotation spectroscopy of molecules trapped inside. *Chem.* (2008); 112, 7152.
- Veerapandian M, Lim SK, Nam HM, Kuppannan G, Yun KS. Glucosamine-functionalized silver glyconanoparticles: characterization and antibacterial activity. *Anal. Bioanal. Chem.* (2010); 398: 867–876.
- Yang, Z., Khangaonkar T. Calvin M., Nelson K. Evaluation of nonlinear cumulative effect of estuarine restoration projects using a three-dimensional hydrodynamic model. *E.coli. Modell.* (2010) 221, 969–977.
- 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

APENDICE A

Cálculos de CeO₂ por síntesis sol-gel asistido por microondas

Compuesto	Peso molecular
(CH ₂ CH ₃ O ₂) ₃ Ce•xH ₂ O	335.261
CeO ₂	172.113

Para preparar 6 g de CeO₂.

$$PM_{\text{CeO}_2} = 172.113 \text{ g/mol}$$

$$n = \frac{6 \text{ g}}{172.113 \text{ g/mol}} = 0.0348 \text{ mol}$$

$$g \text{ de acetato} = (335.261 \text{ g/mol}) (0.0348 \text{ mol}) = 11.667 \text{ g}$$

Compuesto	Peso molecular	Densidad
Etilenglicol	62.07 g/mol	1.112g/mol

Para 0.0348 moles de Etilenglicol

$$m = (0.0348 \text{ mol}) (62.07 \text{ g/mol}) = 2.16 \text{ g}$$

$$(2.16)(1.2) = 2.59 \text{ g}$$

$$V = \frac{2.59 \text{ g}}{1.112 \text{ g/mol}} = 2.329 \text{ mol de etilenglicol}$$

Más el 20 % en exceso tenemos un volumen de $V = 2.79 \text{ ml}$

Ahora para el agua si sabemos que: $W = nPM$

$$W = 0.0348 \text{ mol} (62.07 \text{ g/mol}) = 2.16 \text{ g}$$

$1 \text{ g} = 10 \text{ ml}$ de agua

$$V_{\text{agua}} = 21.6 \text{ ml}$$

Cálculos de CeO_2 por síntesis hidrotermico

Compuesto	Peso molecular
$(\text{CH}_2\text{CH}_3\text{O}_2)_3 \text{Ce} \cdot x\text{H}_2\text{O}$	335.261
CeO_2	172.113

Para preparar 6 g de CeO_2 .

$$PM_{\text{CeO}_2} = 172.113 \text{ g/mol}$$

$$n = \frac{6 \text{ g}}{172.113 \text{ g/mol}} = 0.0348 \text{ mol}$$

$$g \text{ de acetato} = (335.261 \text{ g/mol}) (0.0348 \text{ mol}) = 11.667 \text{ g}$$

Cálculos para solución de NaOH 10M

Compuesto	Peso molecular
Hidróxido de sodio	40 g/mol

$$10 \text{ mol}(40\text{gr/molNaOH}) = 400\text{g}$$

$$400\text{g} - 1000\text{ml}$$

$$X - 100 \text{ ml} = 40 \text{ g}$$

Agregar agua destilada y aforar a 100ml. (para esta síntesis se utilizó 10 ml de solución de hidróxido de sodio).

Cálculos para impregnación húmeda incipiente de (Ag/CeO₂ 5%).

Dividimos $0.5/100=0.005\%$

$$\text{Ag}=3\text{g} (0.005) =0.015\text{g}$$

$$\text{Sal precursora} =\text{g Ag} / \text{P.A Ag} = \text{n Ag}$$

$$\text{Sal precursora} = 0.015\text{g}/107.87=0.00014\text{g}$$

$$\text{g De Sal precursora} =\text{PM de sal precursora}/\text{pureza}$$

$$\text{g De Sal precursora} =168.88/.9999=1.6989$$

$$\text{g De Sal precursora} =1.6989\text{g} * 0.00014\text{g}=0.024\text{g de nitrato de plata}$$

$$\text{g De CeO}_2 =3-0.24\text{g}=2.76 \text{ g de CeO}_2$$

Cálculos para impregnación de (CeO₂-Ag). 1.5%

Dividimos $1.5/100=0.015\%$

$Ag=3g (0.015)=0.045g$

Sal precursora = $gAg / P.A Ag = n Ag$

Sal precursora = $0.045g/107.87=0.00042g$

g De sal precursora = PM de sal precursora/pureza

g De sal precursora = $168.88/.9999=169.89$

g De sal precursora = $169.89g*0.00042g=0.071g$ de nitrato de plata

g De CeO₂ = $3-0.071g=2.929 g$ de CeO₂

APÉNDICE B

34-0394		Wavelength= 1.5405981				*
CeO2	2 θ	Int	h	k	l	
Cerium Oxide	28.555	100	1	1	1	
	33.082	30	2	0	0	
	47.479	52	2	2	0	
Cerianite-(Ce), syn	56.335	42	3	1	1	
	59.087	8	2	2	2	
Rad.: CuK α 1 λ : 1.540598 Filter: Graph Mono d-sp: Diff.	69.402	8	4	0	0	
Cut off: 22.1 Int.: Diffract. 1/lor.:	76.700	14	3	3	1	
Ref: Natl. Bur. Stand. (U.S.) Monogr. 25, 20, 38 (1983)	79.070	8	4	2	0	
	88.412	14	4	2	2	
	95.397	11	5	1	1	
	107.265	4	4	4	0	
	114.730	13	5	3	1	
Sys.: Cubic S.G.: Fm $\bar{3}$ m (225)	117.318	6	6	0	0	
a: 5.41134(12) b: c: A: C:	128.393	9	6	2	0	
α : β : γ : Z: 4 mp:	137.972	6	5	3	3	
Ref: Ibid.	141.568	5	6	2	2	

Dx: 7.215 Dm: SS/FOM: P₁₆ = 130(.0077, 16)

Color: Light gray, yellowish brown

Peak height intensity. Pattern taken at 26(1) C. CAS #: 1306-38-3. This yttria stabilized phase was prepared at NBS, Gaithersburg, Maryland, USA, by Dragoo, Domingues (1982) from co-precipitation of the oxides. The powder was calcined at 620 C and then formed into a billet without binder, isostatically pressed, and then hot-pressed in an alumina die for 30 minutes at 1350 C with an applied stress of 28 MPa. The structure of fluorite was determined by Bragg (1914), Ca F₂ type. Fluorite Group, oxide Subgroup. Also called: ceria. Silver used as an internal stand. PSC: cF12. To replace 4-593. See ICSD 28753, 28785 and 29046 (PDF 75-120, 75-151 and 75-390). Mwt: 172.12. Volume[CD]: 158.46.

