

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS



EVALUACIÓN DEL EFECTO BACTERICIDA MEDIADO POR ZEOLITAS
DOPADAS CON NANOPARTICULAS DE PLATA EN *Escherichia coli*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I Ó L O G O

PRESENTA

ANAID MEZA VILLEZCAS

Ensenada, B. C.

Junio de 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACIÓN DEL EFECTO BACTERICIDA MEDIADO POR ZEOLITAS
DOPADAS CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN *Escherichia coli*

T E S I S

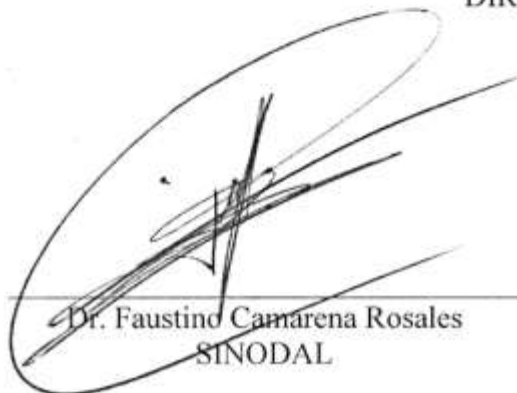
QUE PRESENTA

ANAID MEZA VILLEZCAS

APROBADO POR:



Dr. Alejandro Huerta Saquero
DIRECTOR



Dr. Faustino Camarena Rosales
SINODAL



Dr. Carlos Alberto Flores López
SINODAL

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que han formado parte de esta experiencia de formación profesional a las que me honra agradecerles su apoyo, amistad, ánimo y compañía.

Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y corazón, sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de esta etapa y de mi vida.

Agradezco sinceramente a mi director de tesis Dr. Alejandro Huerta Saquero, por haberme ofrecido este proyecto y por darme toda la confianza y libertad de desarrollarlo. Sus conocimientos, su orientación, su manera de trabajar, su persistencia y su motivación han sido fundamentales para mi formación, además ha inculcado en mí un sentido de seriedad, responsabilidad y rigor académico sin los cuales no podría tener la formación profesional que hoy día tengo. Usted se ha ganado mi lealtad y admiración, convirtiéndose no solo en mi director de tesis y tutor, sino también en mi colega y amigo. Gracias Doc.

Agradezco también al Dr. Armando Reyes, por su paciencia y confianza al brindarme el apoyo económico mediante la beca para el desarrollo del trabajo de tesis otorgado por medio del Convenio CoNaCyT – Matematiké 1010/295/2014 C-477/2014.

Agradezco al proyecto PAPIIT No. RN204815 por su financiamiento.

Gracias al Departamento de Bionanotecnología del Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la UNAM, al Dr. Rafael Vázquez, al Dr. Rubén Cadena y a la Dra. Katrin Quester por permitirme desarrollar mi trabajo de tesis y brindar siempre todas las facilidades. Gracias también a todos y cada uno de los integrantes del departamento “Bionano” por los buenos tiempos y excelentes pláticas.

Al Dr. Oscar Raymond y al Dr. Oscar Jaime, por permitirme colaborar con ustedes en el producto de esta investigación.

Al Dr. Faustino Camarena, quien fue mi maestro en la licenciatura, mi padrino de generación y quien de manera siempre tan servicial acepto ser parte de mi comité de

titulación, gracias por siempre motivarnos a seguir adelante, por mostrarnos que si se puede, gracias de ser un excelente profesor y una maravillosa persona.

Al Dr. Carlos Alberto Flores, quien sin antes conocerme, se mostró tan interesado y dispuesto a ser parte de mi comité de titulación, es motivante ese entusiasmo y disposición que me mostró, y es confortante saber que ese mismo entusiasmo logrará motivar a futuras generaciones.

Estoy completamente agradecida con el M.C. Roberto Vázquez Muñoz quien creyó en mi hace más de 3 años, quien me motivo e involucró por primera vez en el área de la investigación, quien ha sido pilar de mi formación profesional, pero sobretodo quien al paso de los años se ha convertido en mi amigo y colega.

Quiero también agradecer a mi madre Guadalupe Villezcas y a mi padre Juan Manuel Meza, por todo, por su motivación desde que era pequeña, por educarme y enseñarme que el no puedo NO existe, que un compromiso se cumple, que el respeto, la dignidad, la puntualidad y la disciplina son fundamentales en esta vida, pero sobre todo por siempre demostrarme su amor y apoyo. Los amo muchísimo.

Agradezco a toda mi familia en especial a mi tía Ma. Guadalupe Meza y a mi hermana Diana Wido por su apoyo incondicional a lo largo de mi vida.

Muchas muchas gracias Israel Torres y Luis Felipe Ullate, por lograr vencer la barrera de la distancia y siempre estar conmigo en las buenas y en las malas. Los echo de menos.

Agradezco a Diana Esquivel y a Luis Bojórquez amigos y compañeros que han vivido este mismo proceso de titulación, quienes siempre con toda la paciencia del mundo me decían y me repetían los trámites y papeles que debía de presentar tanto para titularme como para dar el siguiente paso al posgrado.

A mis amigos Yasmín Lozano, Ahui López, Horacio Real, Wendy Camacho, Katya Sandoval, Naim Martínez, Adriana Echeagaray, Alejandra García y José Alberto Prats por siempre hacer divertidos y memorables los momentos que pasamos juntos.

A mis maestros, quienes fueron participes de mi formación académica, en especial agradezco a la Maestra Cuquita y al Maestro Carrillo, por motivarme y apoyarme en el área de la investigación.

Resumen de la tesis de Anaid Meza Villezcas presentada como requisito parcial para la obtención de la Licenciatura de Biología.

Ensenada Baja California, México. Junio de 2015.

Título de tesis. EVALUACIÓN DEL EFECTO BACTERICIDA MEDIADO POR ZEOLITAS DOPADAS CON NANOPARTICULAS DE PLATA EN *Escherichia coli*

Resumen aprobado:



Director. Doctor Alejandro Huerta Saquero

Los materiales inorgánicos antimicrobianos presentan ventajas sobre sus equivalentes orgánicos, debido a sus características. La actividad antimicrobiana de especies de plata, tales como los nanocompuestos dopados con nanopartículas de plata (AgNPs) y plata iónica (Ag⁺), ha sido ampliamente documentada. El uso de zeolitas (ZEO) como soporte de cúmulos y nanopartículas con propiedades oligodinámicas, es una línea de investigación promisorio para el desarrollo de nuevos materiales de liberación controlada. Entre las características más importantes de las zeolitas dopadas con AgNPs o Ag⁺ destacan: estabilidad química y térmica, una gran área de superficie y capacidad de apoyo, alta capacidad de intercambio iónico y baja o nula toxicidad. Así, los materiales con capacidad para almacenar AgNPs o bien Ag⁺ en su estructura, tienen un uso potencial en aplicaciones de importancia ambiental: desinfección y tratamiento de aguas residuales, desinfección de superficies, etc. Con el objetivo de determinar la eficacia antimicrobiana de nanocompuestos dopados con plata, el presente trabajo evalúa los siguientes parámetros: Concentración Mínima Bactericida (CMB), la concentración mínima inhibitoria (CMI), concentración inhibitoria media (CI₅₀) y la determinación del efecto bactericida o bacteriostático del material, tiempo de acción, efecto concentración-dependiente, capacidad de reúso del nanocompuesto y la evaluación del efecto del nanocompuesto para diferentes concentraciones de inóculo bacteriano inicial. El nanocompuesto utilizado se conforma por una matriz de zeolita del tipo mordenita, dopada con AgNPs de 3-10 nm Ø, con un porcentaje en peso de plata de 18% (Ag-MOR). Se reportan para *Escherichia coli* MC4100: CMB = 3 µg*ml⁻¹, CMI = 2 µg*ml⁻¹, CI₅₀ = 1 µg*ml⁻¹; se determinó que el efecto de Ag-MOR es bactericida y para la CMB tiene un tiempo de acción de 120 min; el tiempo de acción de Ag-MOR es inversamente proporcional a la concentración de plata utilizada; por último el efecto de Ag-MOR es concentración dependiente del inóculo inicial bacteriano. Se concluye que las características fisicoquímicas adquiridas del nanocompuesto mordenita más las cualidades propias de las AgNPs confieren a Ag-MOR propiedades antimicrobianas con gran potencial para aplicaciones ambientales y de sanitización.

INDICE

Contenido	Pág
Aprobación	I
Agradecimientos	II
Resumen	IV
Lista de Figuras	VII
Lista de Tablas	VIII
Capítulo I. Introducción	1
I.1. Nanotecnología y Bionanotecnología	1
I.1.1. Materiales con propiedades antimicrobianas y aplicaciones	2
I.1.2. Mecanismos de acción de la plata	3
I.2. Zeolitas	5
I.2.1. Estructura y propiedades de las zeolitas	5
I.2.2. Mecanismos de acción de zeolitas como reservorios de especies de plata	6
Capítulo II. Antecedentes	9
II.1. Concentración mínima bactericida (CMB) y concentración mínima inhibitoria (CMI)	9
II.2. Tiempo de acción de las AgNPs y su efecto bactericida a diferentes concentraciones	10
II.3. Capacidad de reúso: tiempo de vida del nanomaterial	12
Capítulo III. Hipótesis	14
Capítulo IV. Objetivos	15
IV.1. Objetivos generales	15
IV.2. Objetivos específicos	15

Capítulo V. Materiales y Métodos	16
V.1. Materiales y Equipo	16
V.1.1. Plata/mordenita (Ag-MOR) y mordenita (Na-MOR): Síntesis y caracterización	16
V.1.2. Material biológico, medios de cultivo y condiciones de crecimiento	19
V.2. Propiedades bactericidas de Ag-MOR en <i>Escherichia coli</i>	20
V.2.1. Determinación de la CMI y de la CMB de Ag-MOR	20
V.2.2. Determinación de la CI ₅₀ de Ag-MOR	21
V.2.3. Evaluación del efecto bactericida/bacteriostático de Ag-MOR	21
V.2.4. Tiempo de acción bactericida de Ag-MOR	22
V.2.5. Capacidad de reúso de Ag-MOR	23
V.2.6. Efecto bactericida de Ag-MOR a diferentes concentraciones de inóculo inicial bacteriano	23
 Capítulo VI. Resultados y Discusión	 24
VI.1. Propiedades bactericidas de Ag-MOR en <i>Escherichia coli</i>	24
VI.1.1. Determinación de la CMB y de la CMI de Ag-MOR	24
VI.1.2. Determinación CI ₅₀ de Ag-MOR	28
VI.1.3. Evaluación del efecto bactericida/bacteriostático de Ag-MOR	30
VI.1.4. Tiempo de acción bactericida de Ag-MOR	30
VI.1.5. Capacidad de reúso de Ag-MOR	32
VI.1.6. Efecto bactericida de Ag-MOR a diferentes concentraciones de inóculo inicial bacteriano	34
 Conclusiones	 37
 Perspectivas	 38
 Referencias Bibliográficas	 39

Lista de figuras

Figura		Página
1	Estructura del tectosilicatos y del tetraedro de silicio.	6
2	Tiempo de acción de Ag ⁰ -EMT 4h y Ag ⁰ -EMT 6h	12
3	Eficacia antimicrobiana de una Sílice amino-funcionalizada con AgNPs en <i>E. coli</i> .	13
4	Micrografías por SEM y TEM de Ag-MOR.	17
5	Espectro UV-Vis para Ag-MOR.	18
6	Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB) de Ag-MOR en <i>E. coli</i> .	25
7	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para Ag-MOR para <i>E. coli</i> .	26
8	Efecto de la mordenita (MOR) en el crecimiento de <i>E. coli</i> .	28
9	Determinación de la Concentración Inhibitoria media (CI ₅₀) para Ag-MOR a partir de conteo en placa para <i>E. coli</i> .	29
10	Tiempo de acción bactericida de Ag-MOR en <i>E. coli</i>	31
11	Efecto bactericida de Ag-MOR a diferentes concentraciones de inóculo inicial.	35

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Relación entre el rendimiento antibacteriano y el contenido de plata en la Ag-Z sobre la cepa de <i>E. coli</i> .	10
2	Análisis químico y resultados del área superficial por SEM-EDS de Ag-MOR.	17
3	Valores de las CMB, CMI y de la CI ₅₀ para Ag-MOR en <i>E. coli</i> .	24
4	Valores de la CMB, CMI y CI ₅₀ para AgNPs libres, zeolitas dopadas con AgNPs y Ag ⁺ reportados en la literatura sobre <i>E. coli</i> .	27
5	Tiempo de acción bactericida de materiales con AgNPs en <i>E. coli</i> .	32
6	Tiempo de vida de Ag-MOR como agente bactericida.	33

INTRODUCCIÓN

1.1. NANOTECNOLOGÍA Y BIONANOTECNOLOGÍA

El desarrollo, estudio y aplicación de las nanociencias y la nanotecnología son relativamente recientes. La bionanotecnología emerge de la interacción entre la biotecnología y la nanotecnología. Ésta área del conocimiento interdisciplinaria permite el desarrollo biosintético y ambientalmente amigable de la tecnología para la síntesis de nanomateriales (Rai *et al.* 2009).

La nanotecnología es definida como el diseño, síntesis y aplicación de materiales y dispositivos cuyo tamaño y forma han sido elaborados a escala nanométrica (Buzea, 2007). Estos son materiales que tienen componentes estructurales menores a cien nanómetros en al menos una dimensión, pueden ser amorfos o cristalinos y sus superficies pueden actuar como contenedores. La materia a escala nanométrica tiene propiedades diferentes a la de la escala macrométrica, lo que le proporciona características químicas, físicas, eléctricas y mecánicas únicas (Buzea, 2007).

Las nanopartículas (NPs) inorgánicas, tienen diferentes aplicaciones, tales como nanodispositivos, nanosensores, recubrimiento de superficies. Lo que permite el desarrollo de aplicaciones físicas, biológicas y farmacéuticas. Las NPs son generalmente

clasificadas según su dimensión, morfología, composición, uniformidad y aglomeración. Adicionalmente pueden diferenciarse entre películas o conglomerados nanoestructurados y NPs libres, que podrían ser liberadas al ambiente, presentando un riesgo para la salud; por otro lado, los materiales que contienen a los nanomateriales presentan un riesgo menor. La toxicidad de las nanopartículas de plata (AgNPs) depende de la composición química, la concentración, el tamaño y forma de la nanopartícula (Buzea C. 2007).

1.1.1. Materiales con propiedades antimicrobianas y sus aplicaciones

Los elementos químicos inorgánicos, en especial los metálicos, tienen propiedades antimicrobianas relevantes y presentan ventajas sobre sus equivalentes orgánicos (Dong *et al.* 2014; Campoccia *et al.* 2013). Las NPs antibacterianas son principalmente sintetizadas a partir de: cobre, zinc, titanio, magnesio, oro y plata (Retchkiman-Schabes *et al.* 2006; Rai *et al.* 2009; Gu *et al.* 2003). La actividad antimicrobiana de especies de plata, tales como los nanocompuestos dopados con AgNPs y plata iónica (Ag^+), ha sido ampliamente documentada (Zhou *et al.* 2014; Ferreira *et al.* 2012; Sondi & Salopek-sondi *et al.* 2004; Guerra *et al.* 2012; Jiraroj *et al.* 2014; Dong *et al.* 2014; Agnihotri *et al.* 2013).

La plata presenta un efecto oligodinámico. La capacidad antimicrobiana de la Ag^+ y de las AgNPs ha sido extensamente documentado (Guerra *et al.* 2012; Agnihotri *et al.* 2013; Greulich *et al.* 2012). La dosis letal de la plata iónica es 1000 veces menor para

bacterias que la dosis letal para mamíferos (Agnihotri et al, 2013; Greulich *et al.* 2012; Guerra *et al.* 2012).

Las AgNPs y la Ag⁺ han sido extensamente utilizadas en diversas aplicaciones. Área biomédica: catéteres y recubrimiento de implantes, suturas y cemento óseo, sistemas de infusión, materiales dentales, revestimiento de prótesis óseas y dispositivos quirúrgicos (Greulich *et al.* 2012; Agnihotri *et al.* 2013; Loza *et al.* 2013). Productos de consumo: pinturas, utensilios de cocina, cosméticos, filtros de aire y agua, contenedores de alimentos y textiles (Khin *et al.* 2012; Shameli *et al.* 2013; Greulich *et al.* 2012; Agnihotri *et al.* 2013). Además, las AgNPs han sido ampliamente utilizadas como catalizadores, biomarcadores y antimicrobianos (Jiraroj *et al.* 2013).

1.1. 2. Mecanismos de acción de la plata

El efecto antimicrobiano de la plata presenta un amplio espectro de acción. Al contrario de los antibióticos, la plata no es específica y afecta tanto a bacterias Gram-positivas como Gram-negativas (Ferreira.*et al.* 2012; Ghosh *et al.* 2010; Greulich *et al.* 2012). Las AgNPs son mayormente utilizadas sobre otras especies de plata, debido a sus características, tales como su estabilidad, lo que permite una liberación continua de plata (Greulich *et al.* 2012) y porque poseen una gran área superficial, lo que incrementa su contacto con los microorganismos (Guerra *et al.* 2012). El efecto bactericida de las AgNPs es dependiente de sus características físicas (tamaño, forma, etc.) y de su concentración (Dong *et al.* 2014, Khin *et al.* 2012, Mocanu *et al.* 2013). Se ha reportado

que el tamaño con mayor actividad antimicrobiana oscila entre 1 a 30 nm de diámetro. A estos tamaños, las AgNPs, presentan propiedades químicas, magnéticas, eléctricas, ópticas, mecánicas y estructurales relevantes, en comparación con la plata macroscópica (Beer *et al.* 2011).

Los mecanismos de acción de la plata a nivel celular y metabólico han sido previamente estudiados, particularmente Ag^+ . Las AgNPs tienen diferentes tipos de interacción, tales como: adhesión a la membrana y a la pared celular, lo que altera sus propiedades y funcionamiento, debido a la formación de “pozos” por la degradación de lipopolisacáridos, lo que incrementa la permeabilidad de la membrana (Khin *et al.* 2012; Dong *et al.* 2014); por otro lado, las AgNPs penetran en la célula, lo que provoca daños en el ADN (Khin *et al.* 2012; Jiraroj *et al.* 2013); la liberación continua de Ag^+ a partir de las AgNPs, lo que provoca toxicidad (Khin *et al.* 2012).

Los iones de plata interaccionan de diferentes formas con las células: forman complejos con los grupos tiol y amino de las proteínas, lo que puede inactivar enzimas; provocan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS); alteran la replicación del ADN; afectan la estructura y permeabilidad de la membrana celular (Guerra *et al.* 2012, Matsumura *et al.* 2003); interaccionan con diversas biomoléculas intracelulares, tales como ácidos nucleicos y grupos sulfhidrilos de las proteínas (Greulich *et al.* 2012).

Las propiedades antimicrobianas de la plata, propician el desarrollo de nuevos dispositivos que puedan contener y estabilizar a las AgNPs y a la Ag^+ . Por tal motivo, es

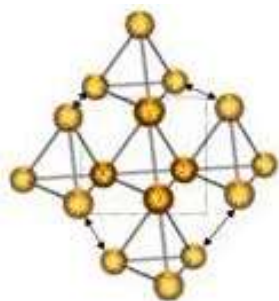
importante evaluar su eficacia microbicida y su posible aplicación en la bionanotecnología.

1.2. ZEOLITAS

El desarrollo de materiales zeolíticos antimicrobianos, basados en zeolitas sintéticas y naturales, es un área de estudio con aplicaciones prometedoras (Im K. *et al.* 1996; Hotta *et al.* 1998). Las zeolitas son un grupo de materiales con cavidades y canales interconectados de tamaño uniforme y bien definidos cristalográficamente. Debido a sus características, las zeolitas pueden absorber gases y moléculas de agua, facilitar el intercambio iónico y actuar como tamices moleculares, con estabilidad química y biológica.

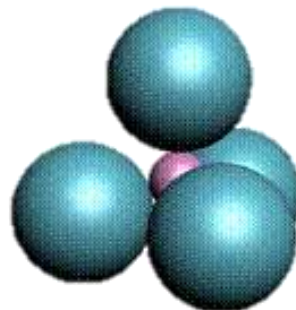
1.2.1 Estructura y propiedades de las Zeolitas

Las zeolitas son tectosilicatos y su estructura básica es el tetraedro de silicio (SiO_4) (*Figura 1*). Según la Asociación Mineralógica Internacional (IMA) las zeolitas se clasifican en: fibrosas, tubulares, cadenas de tetraedros y cadenas de anillos de 4 miembros conectados simples y dobles. Las zeolitas tubulares se sub-clasifican en las siguientes familias: Gismondinas, Cabasitas, Natrolitas, Analcimas y Heulanditas. La familia de las Heulanditas se conforma por zeolitas del tipo: Levyna-Ca, Levyna-Na, Maricopaita y Mordenita.



<http://dateca.unad.edu.co/contenidos/358013/ContenidoEnLinea/FIGURA4.jpg>

(a)



(http://www.mim-us.es/estructuras_cristalinas/estructuras_cristalinas.html).

(b)

Figura 1. Estructura del tectosilicatos y del tetraedro de silicio. (a) Estructura del tectosilicato, conformado por tetraedros unidos por sus cuatro vértices a otros tetraedros, produciendo una malla de extensión tridimensional compleja. (b) Estructura básica del tetraedro de silicio (SiO_4).

Las zeolitas se caracterizan por su capacidad reversible de hidratación y deshidratación. Las cavidades pueden superar el 50% del volumen y éstas pueden ser ocupadas por moléculas de agua. Además, poseen la capacidad de intercambio iónico (Baerlocher, 2000).

1.2.2. Mecanismos de acción de Zeolitas como reservorios de especies de plata

El uso de zeolitas (ZEO) como soporte de cúmulos y nanopartículas con propiedades oligodinámicas, es una línea de investigación promisoría para el desarrollo de nuevos materiales de liberación controlada. Nanocompuestos AgNPs-ZEO presentan el mecanismo de acción consiste en la liberación controlada y continua de Ag^+ . Éste ion se libera cuando se intercambia con los cationes del medio, principalmente Na^+ . La presencia de Ag^+ en el medio genera el efecto microbicida.

Reportes previos proponen dos mecanismos de acción para el efecto bactericida de zeolitas dopadas con AgNPs (AgNPs-ZEO): el primero es la acción directa de Ag^+ cuando se libera al medio; el segundo es debido a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS).

Hay diferentes propuestas sobre la actividad bactericida de AgNPs-ZEO: Inoue *et al.* (2002) propone que el oxígeno es necesario para la acción antimicrobiana; en contraste Kawahara *et al.* (2000) reporta que estas son eficaces bajo condiciones anaerobias, mientras Sondi & Salopek-sondi *et al.* (2004) y Morones *et al.* (2005) señalan la co-existencia de ambos mecanismos.

Entre las características más importantes de las zeolitas dopadas con AgNPs o Ag^+ destacan: estabilidad química y térmica, una gran área de superficie, alta capacidad de intercambio iónico y baja o nula toxicidad (Shameli *et al.* 2013; Dong *et al.* 2014). Así, los materiales con capacidad para almacenar AgNPs o bien Ag^+ en su estructura, estabilizarlos y retenerlos tienen un uso potencial en aplicaciones de importancia ambiental, como ejemplo: desinfección y tratamiento de aguas superficiales, desinfección de superficies.

Con el objetivo de determinar la eficacia antimicrobiana de nanocompuestos dopados con plata, el presente trabajo evalúa los siguientes parámetros: concentración mínima bactericida (CMB), la concentración mínima inhibitoria (CMI), concentración inhibitoria media (CI₅₀) y la determinación del efecto bactericida o bacteriostático del material, tiempo de acción, efecto concentración-dependiente y capacidad de reúso del nanocompuesto. Un aspecto relevante de éste trabajo, es la evaluación del efecto del nanocompuesto en diferentes concentraciones de células en el inóculo bacteriano inicial. El principal interés de este trabajo es la evaluación del efecto antimicrobiano de zeolitas tipo mordenita dopadas con AgNPs (Ag-MOR) en una cepa de *E. coli*.

ANTECEDENTES

Lalueza *et al.*, (2011) evaluó el efecto bactericida de diferentes materiales con especies de plata. Se propone una jerarquía de la eficacia de materiales bactericidas basados en plata. Los materiales por orden de eficiencia, de mayor a menor, son: nitrato de plata (AgNO_3), matriz Zeolítica dopada con AgNPs, dióxido de plata (Ag_2O), pellets de zeolitas dopados de AgNPs, zeolita granular dopados de AgNPs y AgNPs libres. Por tanto, las Zeolitas dopadas con AgNPs o Ag^+ presentan actividad antibacteriana mayor a la del Ag_2O y de las AgNPs libres.

II.1. Concentración mínima bactericida (CMB) y concentración mínima inhibitoria (CMI)

Zhou *et al* (2014) evalúan el efecto bactericida e inhibitorio de zeolitas dopada con diferentes cargas de Ag^+ (*Tabla 1*) en *E. coli* ATCC 8739. Reportan que la zeolita con mayor contenido de Ag^+ presenta el efecto antibacterial más eficiente, con una CMB de $3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y una CMI de $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Tabla 1. Relación entre el rendimiento antibacteriano (CMI y CMB) y el contenido de plata en la zeolita (Ag-Z) sobre la cepa de *E. coli*. Zhou *et al* (2014).

[Ag] /mg*ml ⁻¹	56.47	103.09	139.84	188.25	260.85	329.43	365.73
CMI/ µg*ml ⁻¹	650	40	32	28	3.5	2.5	1.0
CMB/ µg*ml ⁻¹	700	100	70	65	8	6	3.5

Por otro lado, Ferreira L. *et al.* (2012) reportan la actividad antimicrobiana en zeolitas del tipo faujasita: AgY (0.5-1.1µm) y AgX (0.5-3.3 µm) dopadas con AgNPs. Su efecto antimicrobiano fue evaluado en *E. coli* CECT423. La CMI para cada zeolita fue de 29.4 µg*ml⁻¹ y 19.4 µg*ml⁻¹ para AgX y AgY respectivamente.

Otros autores como Sondi & Salopek-sondi *et al.* (2004) reportan la actividad antimicrobiana de las AgNPs de 12nm Ø en *E. coli* (Cepa B). Reportan el efecto bactericida de las AgNPs, con valor entre 50-60 µg*ml⁻¹.

II.2. Tiempo de Acción y su efecto bactericida a diferentes concentraciones de AgNPs

Guerra *et al.* (2012) evaluaron AgNPs de 4-10 nm Ø, dispersas en zeolitas del tipo clinoptilolita, en *E. coli* y *Salmonella typhi* adquiridas de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional de México. *E. coli* fue inhibida en 120 min, con una concentración de peso en plata de 2.1-4.0 %.

Por su parte, Jiraroj *et al.* (2014) reporta la modificación de zeolita A (NaA) por la impregnación de diferentes concentraciones de Ag⁺ y de AgNPs (4-10 nm Ø) para determinar la actividad antibacterial de los materiales. Tanto los compositos de Ag⁺-NaA como los de AgNP-NaA mostraron actividad antimicrobiana dosis y tiempo

dependiente para la bacteria *E. coli* (ATCC 25922). Por otra parte, el composito de Ag⁺-NaA fue más eficaz para *E. coli* que el composito de AgNP-NaA. El composito Ag⁺-NaA200 exhibe la mayor actividad antibacterial en *E. coli* con más del 95% de reducción de las células viables posterior a la primera hora de exposición. Al analizar los compositos AgNP-NaA concluyen que el tiempo de acción del material depende de la concentración de plata que este contenga.

Por su parte, Dong *et al.* (2014) reportan la preparación y propiedades antimicrobianas de nanocristales puros de zeolita (estructura tipo EMT) y su intercambio de Ag⁺ (Ag⁺-EMT) y de plata reducida (Ag⁰-EMT) en *E. coli* (ATTC 8739). Las muestras Ag⁰-EMT (2, 4 y 6 h) mostraron mejor eficacia antimicrobiana comparada con las muestras para Ag⁺-EMT (2, 4 y 6 h). La *Figura 2* muestra el efecto bactericida mediado por Ag⁰-EMT 4h y Ag⁰-EMT 6h, en donde para la muestra “4h” tiene un tiempo de acción de dos minutos a una concentración de 45 µg*ml⁻¹[Ag] y la muestra “6h” tiene un tiempo de acción de 1 min con una concentración de 70.05 µg*ml⁻¹ [Ag], concluyen también que el tiempo de acción del material es concentración dependiente.

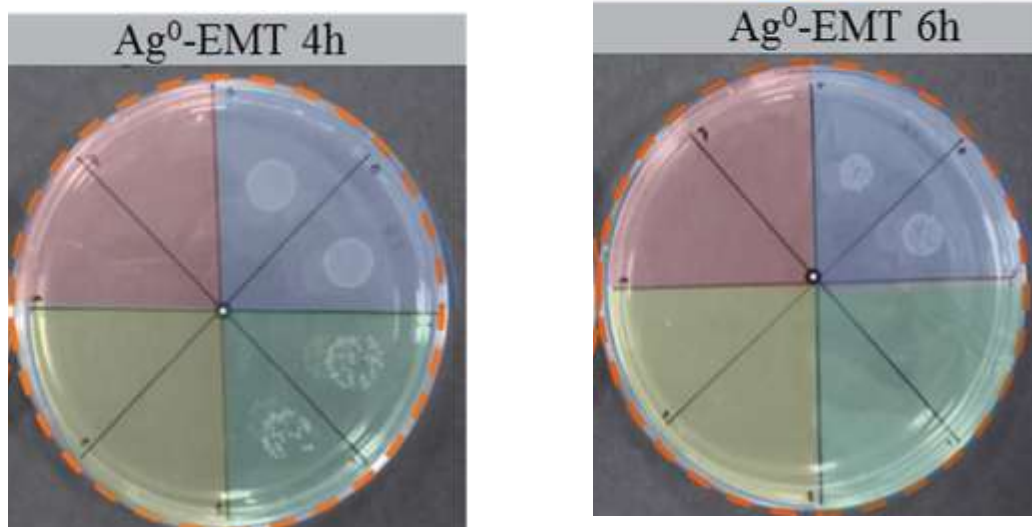


Figura 2 Tiempo de acción de Ag⁰-EMT 4h y Ag⁰-EMT 6h, punto de inoculación de *E. coli* por duplicado. Cada color corresponde a cada tiempo de muestreo por minuto; la primera muestra (Azul) es la toma directa después de la mezcla del tratamiento, consecutivamente 1 min de exposición (Verde), 2 min de exposición (Amarillo) y 3 min de exposición (rojo). Dong *et al.* (2014)

II.3. Capacidad de reúso: tiempo de vida del nanomaterial

Agnihotri *et al.* (2013) reportan la inmovilización de AgNPs (10-15 nm Ø) en una superficie de sílice y evalúan el efecto antimicrobiano en *E. coli* MTCC 25922, demuestran que las AgNPs inmovilizadas en una superficie de vidrio presentan una extraordinaria y efectiva acción antimicrobiana, causando un 100% de mortalidad para *E. coli* en 50 min, y manteniendo la eficacia bactericida para 11 re-inóculos con una concentración de plata del 35.6 % en peso, esto sin haber diferencias significativas en la cinética de liberación de iones durante el experimento (*Figura 3*).

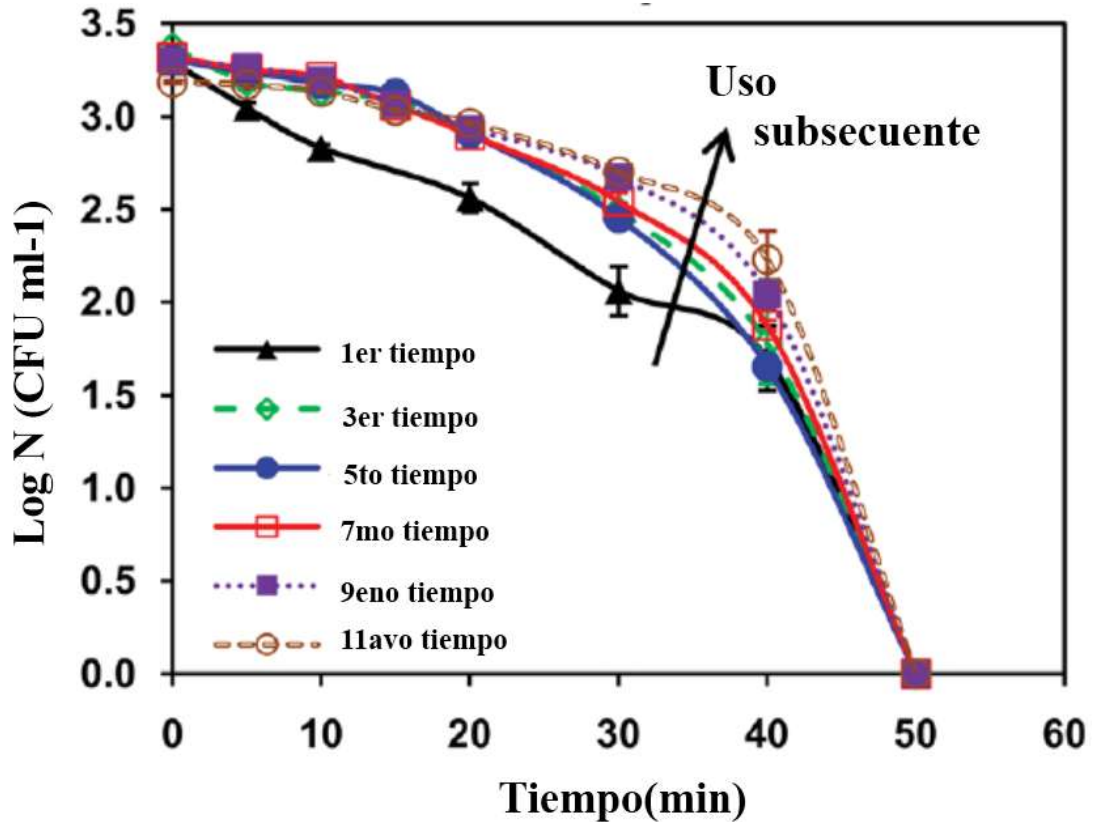


Figura 3. Eficacia antimicrobiana de una Sílice amino-funcionalizada con AgNPs en un reactor de 100 ml con 10^3 UFC* ml^{-1} de *E. coli* MTCC. La dirección de la flecha indica como la cinética de desinfección después de la reutilización se torna más lenta. Agnihotri *et al.* (2013).

Debido a que nanocompuestos con plata presentan un uso potencial como agentes antimicrobianos, este proyecto propone el desarrollo de un protocolo para la caracterización completa de nanocompuestos con actividad antimicrobiana la cual proporcionará la información necesaria para establecer la eficacia y competitividad de los nanocompuestos propuestos agentes antimicrobianos con uso potencial en áreas de desinfección y tratamiento de aguas y superficies.

HIPOTESIS

Las nanopartículas de plata soportadas en zeolitas del tipo mordenita (Ag-MOR) ejercen efecto bactericida en la cepa de *Escherichia coli* ATCC MC4100, el cual es dependiente del inóculo bacteriano inicial al cual se exponga, del tiempo en el que se lleve a cabo dicha exposición y de la concentración de nanopartículas que interaccionan con las bacterias durante el tratamiento.

OBJETIVOS

IV.1. Objetivo general

Evaluar el efecto bactericida de nanopartículas de plata esféricas de 3-10 nm de diámetro soportadas en zeolitas del tipo mordenita en *Escherichia coli*.

IV.2. Objetivos específicos

1. Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), la concentración mínima bactericida (CMB) y la concentración inhibitoria media (CI₅₀) de Ag-MOR en *E. coli*.
2. Evaluar si el efecto de Ag-MOR es bactericida o bacteriostático.
3. Determinar si el efecto bactericida es tiempo dependiente, concentración de inóculo bacteriano dependiente y concentración de nanopartículas dependiente.
4. Determinar el tiempo de vida útil del nanocompuesto como agente bactericida.

MATERIALES Y MÉTODOS

V.1. MATERIALES Y EQUIPO

V.1.1. Plata/mordenita (Ag-MOR) y mordenita (Na-MOR): Síntesis y caracterización

La Plata/mordenita (Ag-MOR) se sintetizó a partir de la metodología descrita en la solicitud de patente MX / a / 2012/013218; procedimiento libre de solventes orgánicos, semillas y templates. Una primera solución de 110 ml de soluciones acuosas 0.1 M de silicato de sodio y sulfato de aluminio (con $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$ relación molar de 1:5) se agitó durante 30 min; posteriormente se tomaron 30 ml de la solución 0.1 M de sales de iones y se mezclaron con la primera solución. La composición química, morfológica y estructural del nanocompuesto fue estudiada por difracción de rayos X (XRD) con un difractómetro Philips X'Pert (Radiación CuK), por Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM) utilizando JEOL JEM-2010 (con tensión de aceleración de 200 kV), y por Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) utilizando un microscopio JEOL JSM-5300 con un detector de energía dispersa (EDS) (*Figura 4 a-b-c*). Las propiedades ópticas fueron estudiadas por espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-Vis) utilizando un espectrofotómetro AvsSpec-ULS 2048-UA-50 (Jaime-Acuña *et al.* 2014).

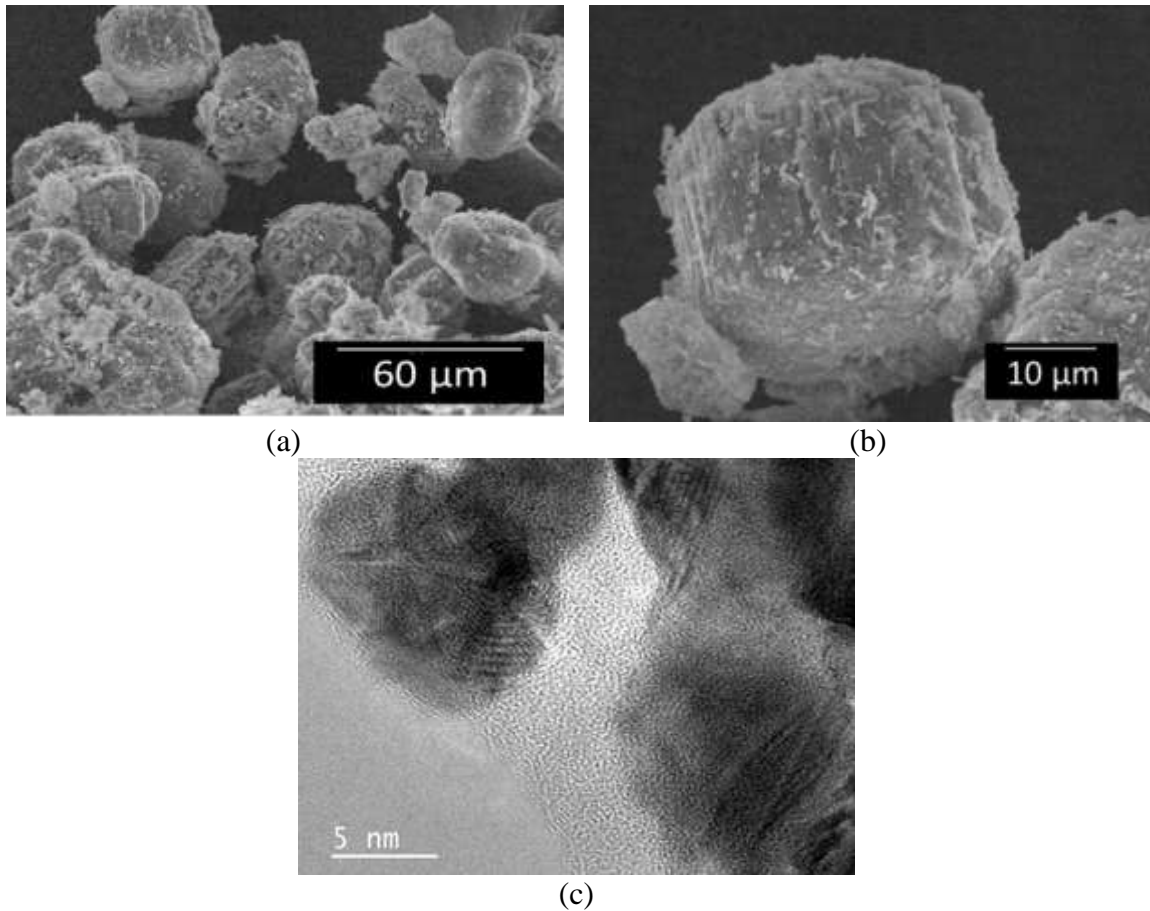


Figura 4. Micrografías por SEM y TEM de Ag-MOR. (a y b) Morfología de cristales de mordenita. (c) Cúmulos de AgNPs en matriz de Mordenita.

La *Tabla 2* presenta un resumen del porcentaje en peso de cada elemento para todos los materiales obtenidos por EDS y el área superficial por dos métodos (BET y Langmuir) (Jaime-Acuña *et al.* 2014).

Tabla 2. Análisis químico y resultados del área superficial por SEM-EDS de Ag-MOR.

Porcentaje en peso %					Área superficial (m ² /g)	
Si	Al	Na	Ag	Si/Al	BET	Langmuir
28	4	2	18	7	167.2	254.8

La espectrofotometría UV-Vis (*Figura 5*) muestra una absorción de resonancia del plasmón superficial típica a 420 nm (Jaime-Acuña *et al.* 2014).

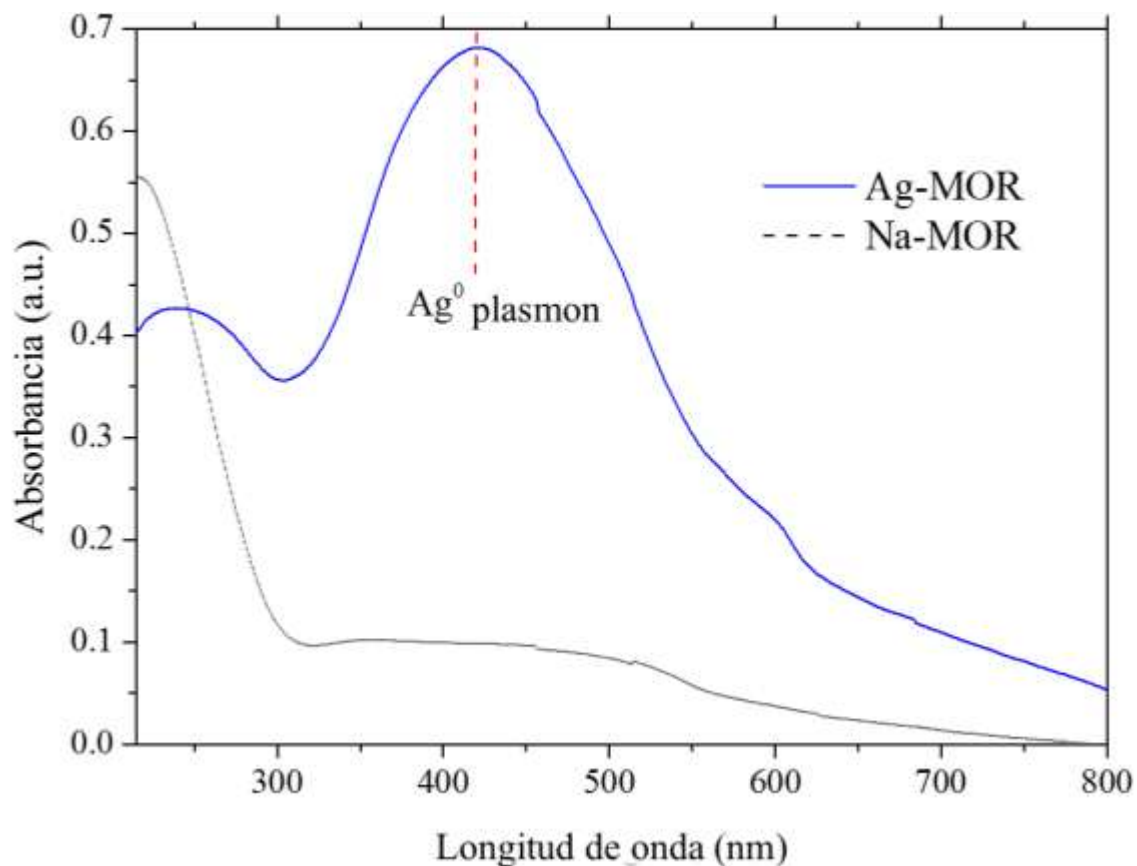


Figura 6. Espectro UV-Vis para Ag-MOR.

Una solución acuosa de Ag-MOR se preparó a una concentración de $500 \mu\text{g}^*\text{ml}^{-1}$ de AgNPs, en agua Milli-Q esterilizada, a 4°C y aisladas de la luz. Las alícuotas de Ag-MOR se renovaron para el desarrollo de cada experimento.

V.1.2. Material Biológico, medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Para el desarrollo de la investigación se trabajó con la cepa de referencia *Escherichia coli* ATCC MC4100, obtenida del cepario del Dr. Alejandro Huerta Saquero del Departamento de Bionanotecnología del Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

E. coli fue cultivada a 37°C en medio Luria Bertani caldo/agar (LB-caldo: 1% Triptona *Becton & Dickinson Company*, 1% Cloruro de Sodio *Fermont*, .5% Extracto de Levadura *Becton & Dickinson Company*; Placas de agar LBA: se agrega 2% de Agar Bacteriológico *Becton & Dickinson Company*; ajustados a un pH de 7.5). El medio de cultivo fue preparado con agua destilada y esterilizado por métodos convencionales.

Los experimentos se realizaron en LB, de 18-24 horas, a 37°C y a 180 rpm (Thermo SCIENTIFIC MAXQ 6000 modelo 4353). Mediante un espectrofotómetro ThermoFisher SCIENTIFIC Oy tipo 1510 se ajustó la turbidez del cultivo a 0.1 de densidad óptica (DO) a 600 nm, equivalente de 1.5×10^8 UFC*ml⁻¹, de acuerdo al índice de McFarland. Posteriormente se diluyó a una concentración aproximada de 1×10^4 UFC*ml⁻¹. En el caso del experimento “Eficacia bactericida de Ag-MOR” los inóculos bacterianos iniciales se ajustaron a diferentes concentraciones.

Los cultivos fueron expuestos a los tratamientos de Ag-MOR correspondientes a los parámetros a evaluar. Todos los tratamientos se realizaron al menos por triplicado.

V.2. PROPIEDADES BACTERICIDAS DE Ag-MOR EN *Escherichia coli*

V.2.1. Determinación de la CMB y CMI de Ag-MOR

La concentración mínima bactericida (CMB) es la mínima cantidad de un agente microbicida capaz de eliminar el 99.9% de una muestra inoculada en condiciones estandarizadas (Murray, 2009). La concentración mínima inhibitoria (CMI) es la mínima cantidad de un agente microbicida capaz de inhibir el crecimiento visible de un microorganismo en comparación con el crecimiento del control (Brock, 2009).

La CMB y la CMI de AgNPs-MOR se determinaron mediante un método de microdiluciones que se describe a continuación: una vez preparado el inóculo inicial de 1×10^4 UFC*ml⁻¹, los cultivos fueron expuestos a tratamientos de Ag-MOR a diferentes concentraciones (1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 y 4.0 µg*ml⁻¹ de AgNPs). Posteriormente se incubaron por 20 horas, a 37 °C y a 180 rpm, en placas multipozos. Finalmente, se inocularon 5 µl de las células tratadas en placas LB-agar, y se incubaron por 24 horas a 37 °C. Se evaluó el crecimiento mediante espectrofotometría, a $\lambda=600$ nm.

Para determinar si la Mordenita (MOR), agente estabilizante de las AgNPs, poseen actividad bactericida se analizó como control. El efecto de MOR en la cepa control *E. coli*, se evaluó conforme al procedimiento para la determinación de la CMI y la CMB, con las siguientes concentraciones: 65, 100, 130, 160, 200, 230 y 260 µg*ml⁻¹

(Equivalente a la concentración de MOR en los tratamientos con Ag-MOR). Por 24 horas se incubaron a 37°C a 180 rpm. Después del tratamiento, se inocularon 5µl de cada tratamiento en placas de LB-agar y se incubaron por 24 horas a 37°C. Las densidades ópticas de los tratamientos se leyeron por medio de espectrofotometría a una absorbancia de 600 nm.

V.2.2. Determinación de la CI₅₀ de Ag-MOR

La concentración inhibitoria media (CI₅₀) es definida como la concentración de agente antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento de un cultivo al 50% comparado con el control sin tratamiento. La CI₅₀ fue determinada a partir de un inóculo inicial de 1×10^4 UFC*ml⁻¹ que se expuso a concentraciones de plata por debajo de la CMB y se incubó a condiciones estándar, en placa de multipozos. El crecimiento se evaluó por espectrofotometría y por cuenta en placa.

De manera complementaria se determinó el número de células viables a las siguientes concentraciones 0.5, 1, 1.5, 2 y 2.5 µg*ml⁻¹ de plata las cuales están incluidas en la determinación por espectrofotometría. Los tratamientos se incubaron por 2 horas y posterior a esto se procedió a inocular en LB-agar para conteo en placa, se incubó a condiciones estándar.

V.2.3. Evaluación del efecto bactericida/bacteriostático de Ag-MOR

Determinar el efecto bactericida o bacteriostático de agentes antimicrobianos es relevante para sus aplicaciones. Un agente bacteriostático es aquel que previene el crecimiento de las bacterias, manteniéndolas en una fase estacionaria del crecimiento. Por otro lado, un agente bactericida es aquel capaz de eliminar a las bacterias en un 99.9% (Pankey *et al.* 2004). El efecto Bactericida/Bacteriostático se determinó de la siguiente manera: se expusieron cultivos bacterianos a la CMB y se incubaron durante toda la noche. Posteriormente, se tomaron 100 μ l de dicho cultivo para re-inocular medio fresco, sin la presencia de Ag-MOR. Los nuevos cultivos se incubaron en condiciones estándar y posteriormente se evaluó si había crecimiento por densidad óptica y viabilidad en placa.

V.2.4. Tiempo de acción bactericida de Ag-MOR

Algunas de las características relevantes para determinar la viabilidad industrial de éste tipo de materiales, son: tiempo de acción microbicida, efecto a diferentes concentraciones y su capacidad de reúso.

El tiempo de acción de de Ag-MOR se determinó en un cultivo bacteriano ajustado a 1×10^4 UFC* ml^{-1} al cual se le agregó Ag-MOR a la CMB. Posteriormente se tomó una muestra de 10 μ l cada hora por 5 horas y una última a las 24 horas de exposición. Las muestras se inocularon en LB-agar para conteo en placa y se dejaron incubar en condiciones estándar.

Por otro lado, se evaluó el efecto inhibitorio de Ag-MOR a través del tiempo, con diferentes concentraciones del nanomaterial. Un cultivo ajustado a 1×10^4 UFC*ml⁻¹ se expuso a la CMB (3 µg*ml⁻¹), 2X CMB (6 µg*ml⁻¹), 4X CMB (12 µg*ml⁻¹), 8X CMB (24 µg*ml⁻¹) y 16X CMB (48 µg*ml⁻¹). Posteriormente se tomó una muestra de cada tratamiento a los 0 min, 10 min, 20 min, 40 min, 60 min y 120 min, las cuales se inocularon en LB-agar y se incubaron a condiciones estándar.

V.2.5. Capacidad de reúso de Ag-MOR

La capacidad de reúso del material se define como la duración estimada en que un objeto puede cumplir correctamente la función que tiene asignada. En el caso de Ag-MOR la función relevante es su capacidad antimicrobiana. Un cultivo ajustado a 1×10^4 UFC*ml⁻¹ se expuso a la CMB (3 µg*ml⁻¹), la CMB 2X (6 µg*ml⁻¹) y la CMB 3X (9 µg*ml⁻¹). Se tomó una muestra de 10µl cada 2 horas durante 20 horas de cada condición, se inocularon en LB-agar y se incubaron en condiciones estándar. Cada 2 horas los cultivos se re-inocularon con la misma cantidad de bacterias que el inóculo inicial, justo después de haber tomado la muestra de ellos para evaluar viabilidad bacteriana.

V.2.6. Efecto bactericida de Ag-MOR a diferentes concentraciones de inóculo inicial.

El efecto bactericida de Ag-MOR (CMB) se evaluó con diferentes inóculos iniciales para determinar su eficacia como agente antibacteriano. Se cultivó *E. coli* en LB-caldo en condiciones estándar, posteriormente el cultivo se ajustó a diferentes concentraciones celulares: 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 3.75×10^8 y 7×10^8 UFC*ml⁻¹.

Posteriormente los cultivos fueron expuestos a la CMB de Ag-MOR ($3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) y se incubaron en condiciones estándar. Posteriormente se re-inocularon en LB-agar, en condiciones estándar y se evaluó crecimiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI.1. PROPIEDADES BACTERICIDAS DE Ag-MOR EN *Escherichia coli*

VI.1.1 Determinación de la CMB y CMI de Ag-MOR

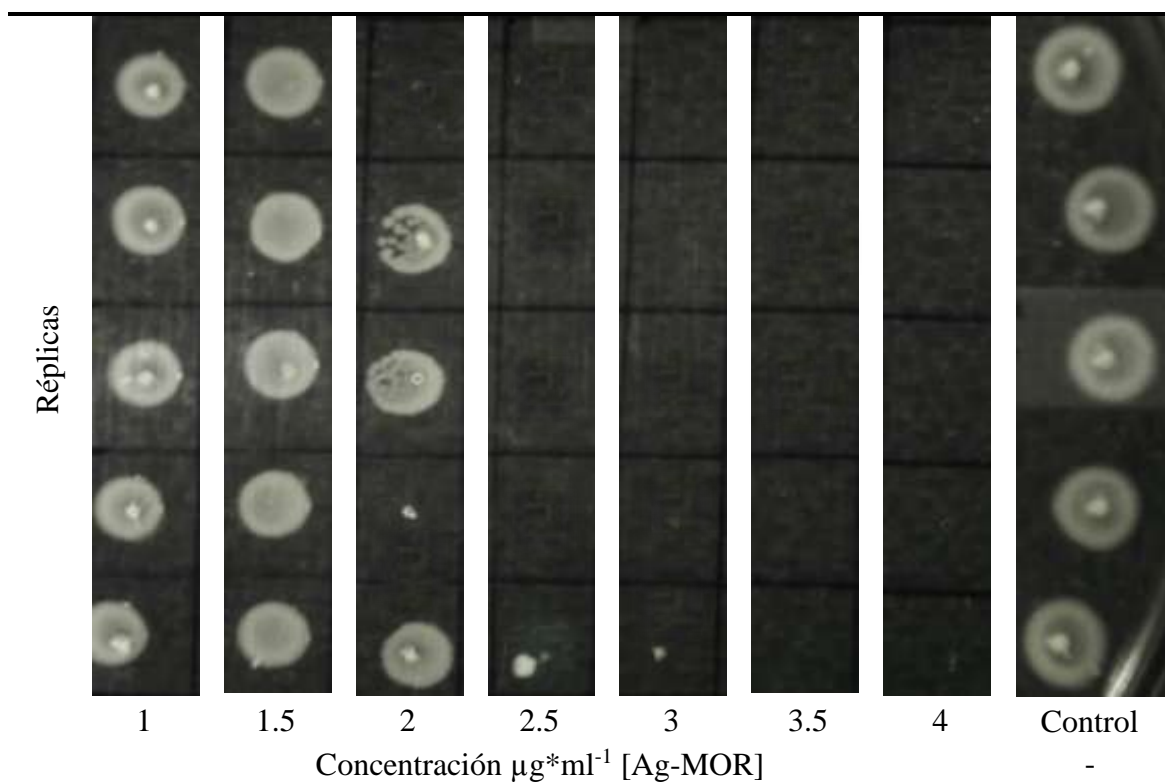
Ag-MOR exhibe propiedades antimicrobianas, las cuales se muestran en la *Tabla 3*, lo que sugiere que este comportamiento antimicrobiano está asociado a las nanopartículas de plata embebidas en la matriz de mordenita.

Tabla 3. Valores de las CMB, CMI y de la CI_{50} para Ag-MOR en *E. coli*. Se reporta la concentración en función de los microgramos de plata que contiene el nanocompuesto.

Ag-MOR $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	<i>CMB</i>	<i>CMI</i>	<i>CI₅₀</i>
	3	2	0.5 - 1

La CMB es de $3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. El efecto bactericida es directamente proporcional a la concentración de plata *Figura 6*. Como se puede observar, la exposición de *E. coli* a $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ de Ag-MOR es letal, pues no se observa crecimiento posterior al tratamiento con esa concentración del nanomaterial o mayores concentraciones. A $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ se observa inhibición casi en todas las réplicas, sin embargo en una de ellas observamos crecimiento, lo que nos indica que esta cantidad no es suficiente para eliminar el 99.9 % del inóculo de *E. coli* y el porcentaje de sobrevivencia es capaz de restablecer el cultivo igualando el control negativo, por lo que no se considera como la CMB.

Figura 6. Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB) de Ag-MOR para *E. coli*.



La CMI de Ag-MOR es de $2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, determinada mediante espectrofotometría, a $\lambda = 600 \text{ nm}$ (Figura 7). La inhibición del crecimiento, evaluada mediante la turbidez del medio de cultivo resultó a $2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de Ag-MOR. Sin embargo, a dicha concentración, al retirar el nanomaterial, se observa la restauración de crecimiento bacteriano (Figura 6), por lo que se estableció la CMB a $3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y la CMI a $2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

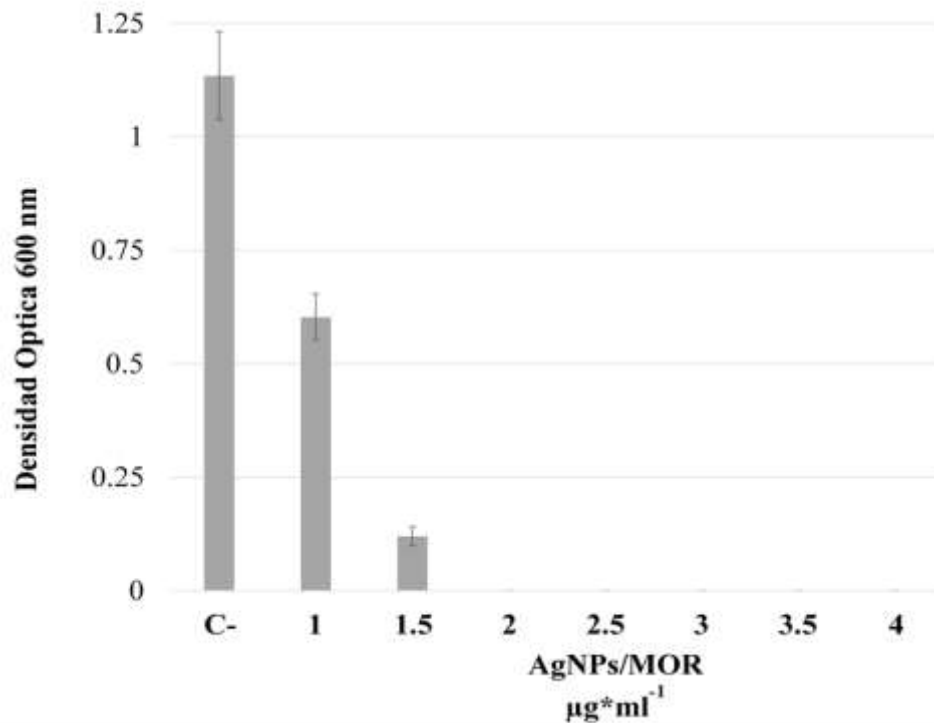


Figura 7. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para Ag-MOR a partir de Densidad Óptica a 600 nm para *E. coli*. La figura muestra en el eje izquierdo la densidad óptica registrada para los tratamientos.

Con éstos resultados, se realizó un análisis comparativo entre Ag⁺ZEO, AgNPs-ZEO y AgNPs previamente reportadas en la literatura (*Tabla 4*). La CMB reportada para Ag⁺-ZEO y AgNPs fue respectivamente de 3.5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y de 50-60 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, mientras que para Ag-MOR fue de 3 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Con base en lo anterior se establece la siguiente jerarquía de efectividad antimicrobiana (de mayor a menor): Ag-MOR, ZEO-Ag⁺ y AgNPs.

Estos resultados concuerdan con la jerarquía propuesta por Lalueza *et al.* (2004) en relación a que una matriz zeolítica con AgNPs es más eficaz que una zeolita dopada con Ag⁺, considerando a las AgNPs libres menos eficaces.

Tabla 4. Valores de la CMB, CMI y CI₅₀ para AgNPs libres, ZEO-AgNPs y ZEO-Ag⁺ reportados en la literatura sobre *E. coli* contrastados con Ag-MOR. (Concentración en función de microgramos de plata)

	CMB μg*ml ⁻¹	CMI μg*ml ⁻¹	CI₅₀ μg*ml ⁻¹	Referencia
Ag-MOR	3	2	0.5 - 1	Este trabajo
ZEO-Ag⁺	3.5	1	-	Zhou (2014)
ZEO-AgNPs	-	19.4	-	Ferreira (2012)
AgNPs_{12 nm} ∅	50-60	-	-	Sondi & Salopek-sondi (2004)

La CMI reportada para ZEO-Ag⁺ y ZEO-AgNPs fue respectivamente de 1 μg*ml⁻¹ y 19.4 μg*ml⁻¹, mientras que para Ag-MOR es de 2 μg*ml⁻¹. La diferencia mínima de 0.5 μg*ml⁻¹ para la CMB y de 1 μg*ml⁻¹ para la CMI entre ZEO-Ag⁺ y Ag-MOR muestra la efectiva capacidad bactericida de zeolitas dopadas con Ag⁺ o AgNPs. Los iones Ag⁺ se han reportado como altamente tóxicos para una amplia variedad de organismos incluyendo bacterias, debido a su rápida liberación en medios líquidos (Choi *et al.* 2007); lo que justifica que ZEO-Ag⁺ tenga una CMI menor a Ag-MOR. Por su parte, las AgNPs tienen la capacidad de generar ROS, que afectan a la viabilidad de las bacterias.

Por su parte la matriz de mordenita (Na-MOR) sin nanopartículas de plata no presenta un efecto inhibitorio sobre *E. coli* a las concentraciones tratadas (*Figura 8*).

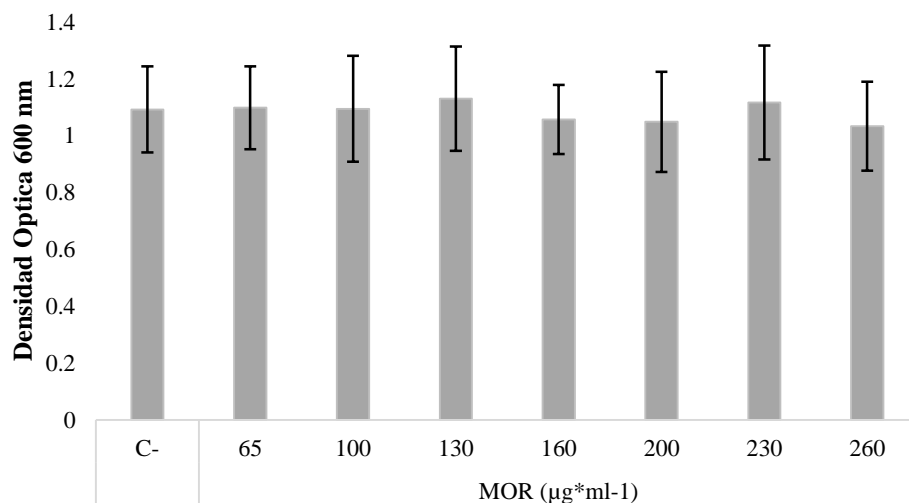


Figura 8. Efecto de la mordenita (Na-MOR) en el crecimiento de *E. coli*. En la figura se contrasta el crecimiento por densidad óptica de 7 concentraciones de Na-MOR con el control negativo (C-). No se reportan diferencias significativas.

VI.1.2. Determinación de la CI_{50} de Ag-MOR

La determinación de la CI_{50} para materiales con AgNPs en *E. coli* no ha sido previamente reportada de acuerdo a la bibliografía consultada. Es un parámetro útil para el desarrollo de protocolos que determinan la capacidad que tienen los microorganismos de adquirir resistencia, en su caso para nanocompuestos con actividad antimicrobiana.

La CI_{50} de Ag-MOR es de $0.5 - 1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Tabla 3). La Figura 8 muestra mediante espectrofotometría que la CI_{50} es de $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($\lambda = 0.603$) contrastada con el Control negativo ($\lambda = 1.13$). La CI_{50} a $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ se encuentra cercanamente a la media del crecimiento del control negativo de *E. coli*.

Como muestra la Figura 9 el control negativo (C-) alcanzo en dos horas un total de

160 000 UFC*ml⁻¹, a 0.5 µg*ml⁻¹ y a 1 µg*ml⁻¹ de plata el número de células viables fue de 126 333 UFC*ml⁻¹ y 18 000 1 UFC*ml⁻¹ respectivamente, con base a este resultado y al obtenido por espectrofotometría se considera que la CI₅₀ está dada por las concentraciones entre 0.5 y 1 µg*ml⁻¹, pues se espera que ronde en las 80,000 UFC/ml.

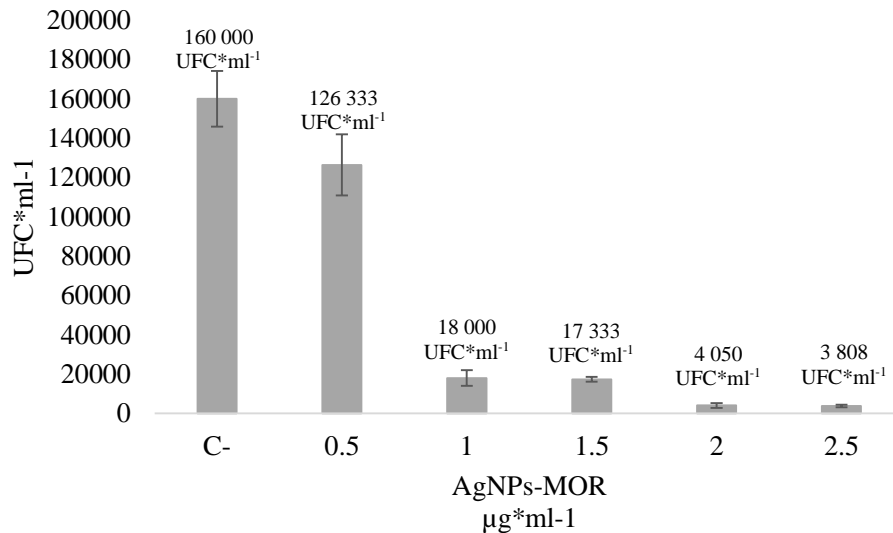


Figura 9. Determinación de la Concentración Inhibitoria media (CI₅₀) para Ag-MOR a partir de conteo en placa para *E. coli*.

Es importante mencionar que no se observa en general, un decremento gradual en el crecimiento bacteriano expuesto a diferentes concentraciones de Ag-MOR, como el observado para la evaluación antimicrobiana de antibióticos, por ejemplo. Esta parece ser una característica particular de los nanomateriales con actividad bactericida, en especial, de los nanocompuestos que contienen plata.

VI.1.3. Evaluación del efecto bactericida/bacteriostático de Ag-MOR

La evaluación del efecto bactericida o bacteriostático para nanocompuestos de plata en *E. coli* no han sido previamente reportados de acuerdo a la bibliografía consultada. En este sentido, determinar el tipo de efecto del agente antimicrobiano (bacteriostático o bactericida), es relevante para las aplicaciones. En este trabajo observamos que Ag-MOR ejerce un efecto “bactericida” sobre la cepa de *E. coli*. Al exponer a los cultivos bacterianos a la CMB de Ag-MOR, se eliminan el 100% de las bacterias, lo que comprobamos al utilizar dichos cultivos como re-inóculos de medios libres del nanomaterial, en los que no observamos restauración de crecimiento.

VI.1.4. Tiempo de acción bactericida de Ag-MOR

El efecto bactericida de Ag-MOR determinado por la CMB fue evaluado en función del tiempo como se muestra en la *Figura 10 a*. En la curva de mortalidad a la CMB se observa como al paso del tiempo el número de bacterias disminuye paulatinamente hasta morir en un 100% después de 120 min de interacción. El tiempo de acción ha sido previamente reportado para materiales con AgNPs de 4 – 10 nm Ø *Tabla 6 (a-b)*, con concentraciones de plata (% peso y $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) por encima de la reportada para Ag-MOR.

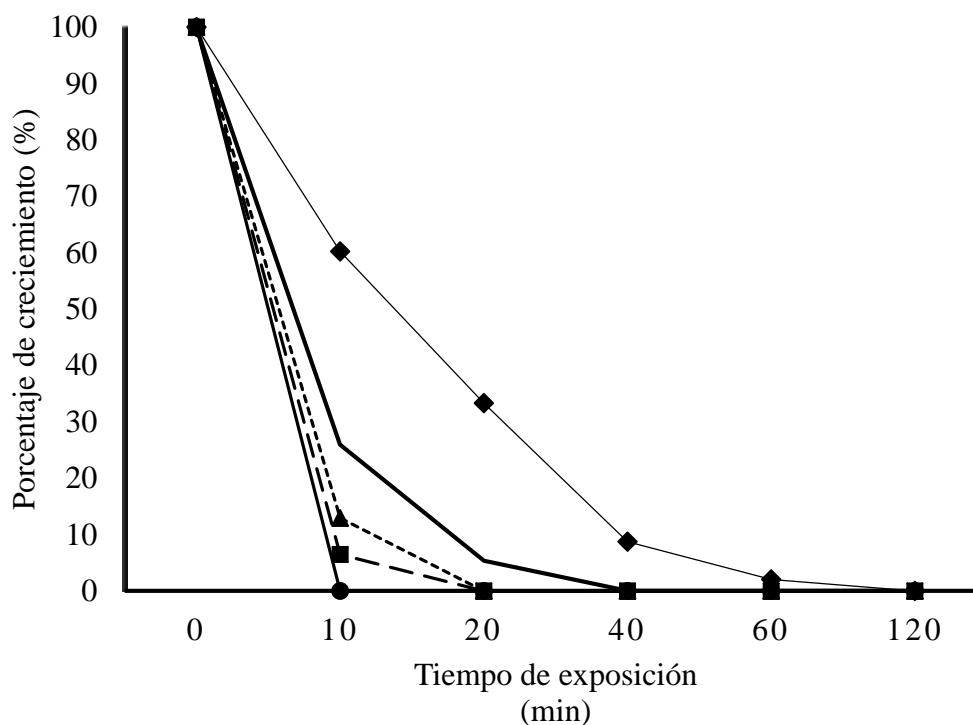


Figura 10. Tiempo de Acción Bactericida de Ag-MOR en *E. coli*: (a) CMB = $3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (♦), (b) CMB x2 = $6 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (—), (c) CMB x4 = $12 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (▲), (d) CMB x8 = $24 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (■), (e) CMB x16 = $48 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (●).

La *Figura 10* muestra que el tiempo de acción bactericida es inversamente proporcional a la concentración de plata. El incremento de la concentración de plata en los tratamientos a un mismo inóculo inicial reduce el tiempo requerido para llevar a cabo el efecto bactericida, de acuerdo con reportes previos (*Tabla 5 a-c; e-f-g*). Al comparar el tiempo de acción bactericida de Ag-MOR con el tiempo de acción y concentración de Ag⁰-EMT-type (2, 4, 6h) (*Tabla 5 e-f-g; Figura 2*), observamos que el efecto bactericida se lleva a cabo en menos de 6 min, lo que es 4 minutos menos que el tiempo de acción

encontrado para Ag-MOR CMB x16 (*Figura 10 e*). La eficacia de NPs. Ag⁰-EMT-type (2, 4, 6h) se puede atribuir al tamaño sub-nanométrico de las AgNPs reportadas, debido que a una misma concentración de 6 µg*ml⁻¹ y una aproximada de 45-48 µg*ml⁻¹, Ag⁰-EMT-type (2, 4, 6h) tuvo un tiempo de acción de 6 y 2 minutos respectivamente (*Tabla 5 e-f*), mientras que para Ag-MOR fue de 40 y 10 minutos (*Figura 10 b-e*).

Tabla 5. Tiempo de acción bactericida de Materiales con AgNPs en *E. coli*.

*T.A. = *Tiempo de acción*

	Material con AgNPs	NP (Ø nm)	Ag (% peso)	µg*ml ⁻¹ [Ag]	T.A. (min)	Ref.
(a)	Zeolita / Plata (AgNP-NaA100)	4-10	-	100	120	Jiraroj (2014)
(b)	Clinoptilolita / AgNPs	4.5-8	2.1-4.0	-	120	Guerra (2012)
(c)	Zeolita/Plata (AgNP-NaA200)	4-10	-	200	90	Jiraroj (2014)
(d)	Sílica amino-funcionalizada / AgNPs	10-15	35.6	-	50	Agnihotri (2013)
(e)		.6	1.2	6	6	
(f)	Ag ⁰ -EMT (2, 4, 6h)	.6	9.1	45	2	Dong (2014)
(g)		2-5	14.1	70.5	1	

VI.1.5. Capacidad de reúso de Ag-MOR

Un material con un continuo y eficaz efecto bactericida, capaz de ser reutilizado y recuperado del medio es buscado para aplicaciones de desinfección, tratamiento de agua y sanitización. En ese sentido, se determinó el número de veces que Ag-MOR puede ser utilizado de manera efectiva en la eliminación de bacterias, para de esta forma determinar el número de inóculos (bacterias = UFC *ml⁻¹) que podrían ser eliminadas por la misma cantidad de nanocompuesto.

La *Tabla 6* muestra el tiempo de vida de Ag-MOR. Para la CMB se observa un crecimiento del 4.8% a la 4ta re-inoculación, e igual al control negativo (sobrevivencia del 100%) después de la séptima carga bacteriana. Se eliminó un aproximado de $\sim 4.91 \times 10^4$ UFC * ml⁻¹. Se observó para la CMB 2X un 12% de sobrevivencia a la sexta re-inoculación y alcanzó un 100% del crecimiento al octavo re-inóculo. El número total de bacterias eliminadas fue de $\sim 6,01 \times 10^4$ UFC * ml⁻¹. Finalmente para la CMB 3X se observó el 12.5% de sobrevivencia después del noveno re-inóculo y un crecimiento igual al control negativo al undécimo inóculo. El número total de bacterias eliminadas fue de $\sim 8.89 \times 10^4$ UFC*ml⁻¹.

Tabla 6. Tiempo de vida de Ag-MOR como agente bactericida.

$\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ [Ag]	Numero de reúsos (Inóculos de 1×10^4 UFC*ml ⁻¹)										
	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>11</i>
CMB 3	0	0	0	4.8	55.5	98.5	100	100	100	100	100
CMB 2X 6	0	0	0	0	0	12.5	86.4	100	100	100	100
CMB 3X 9	0	0	0	0	0	0	0	0	12.5	98.5	100
% de sobrevivencia											

Agnihotri *et al.* (2013) reporta una sílica animo-funcionalizada con AgNPs (*Figura 3; Tabla 5*) con una desinfección total en 50 min durante 11 re-inóculos de 1×10^3 UFC*ml⁻¹. Complementa los resultados inhibitorios con la cinética de la liberación de iones durante el experimento.

La concentración de plata en el material Ag-MOR es del 18% en peso mientras que Agnihotri *et al.* (2013) reporta 35.6% en peso, casi el doble del porcentaje de plata (% Ag). Cabe resaltar que incluso con un menor porcentaje de plata reportamos un efecto

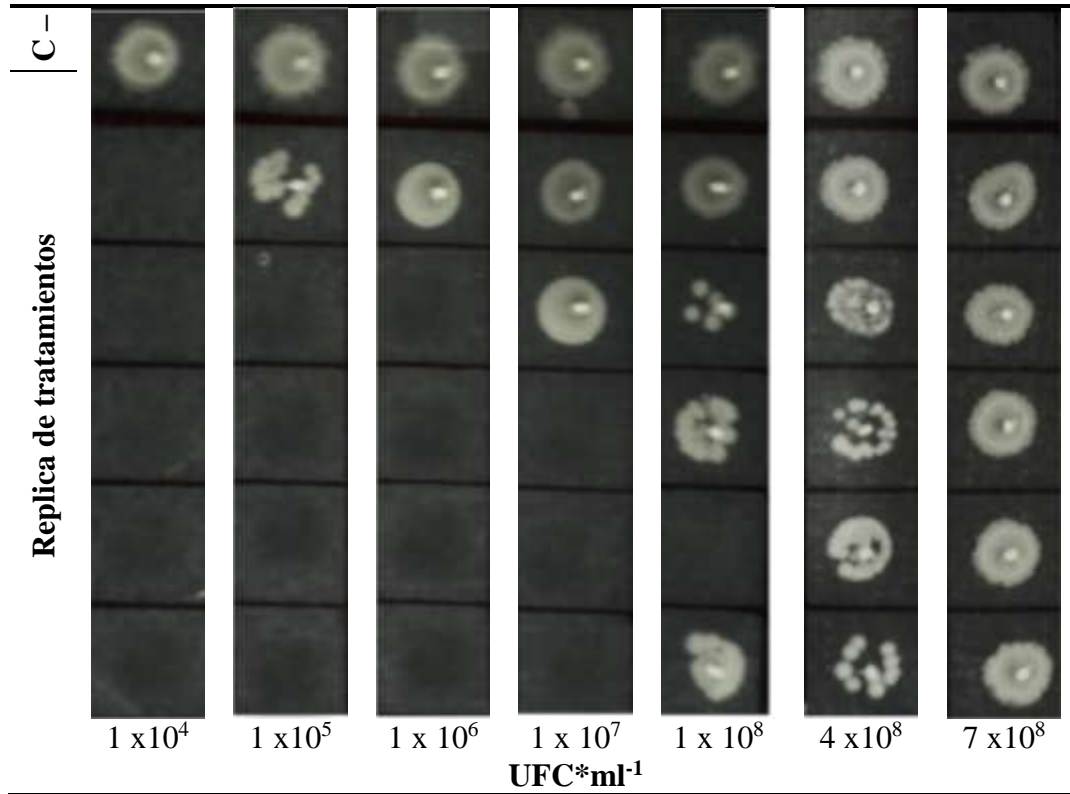
bactericida prolongado y casi igual al reportado por Agnihotri *et al.* (2013). Se considera para futuras investigaciones complementar la determinación del tiempo de vida del material con un análisis de cinética de liberación de iones.

VI.1.6. Efecto bactericida de Ag-MOR a diferentes concentraciones de inóculo inicial.

La *Figura 11* muestra la eficacia bactericida de la CMB a diferentes inóculos iniciales. Se demostró que al incrementar el inóculo bacteriano inicial la capacidad bactericida del material disminuye. Como muestra la *Figura 11* el agente bactericida ejerce un efecto inhibitorio parcial a un inóculo de 1×10^8 UFC*ml⁻¹. A una concentración de 7×10^8 UFC*ml⁻¹ el crecimiento es igual al control negativo, lo que indica que la CMB de Ag-MOR es ineficiente para una concentración bacteriana tan elevada.

Adicionalmente se determinó la concentración mínima bactericida para los inóculos a 1×10^8 UFC*ml⁻¹ y 7×10^8 UFC*ml⁻¹, la cual fue respectivamente de $9 \mu\text{g*ml}^{-1}$ [AgNPs] y $15 \mu\text{g*ml}^{-1}$ [AgNPs].

Figura 11. Determinación de la eficacia bactericida de Ag-MOR a diferentes concentraciones de inóculo inicial.



Las características fisicoquímicas adquiridas del nanocompuesto mordenita más las cualidades propias de las AgNPs confieren a Ag-MOR propiedades antimicrobianas con gran potencial para aplicaciones ambientales y de sanitización. Conocer el efecto bactericida de Ag-MOR nos permitió establecer el tiempo de acción bactericida, para con esto concluir que el tiempo de acción es inversamente proporcional a la concentración de nanomaterial utilizado. Se demostró que el efecto bactericida de Ag-MOR es dependiente de la concentración de inóculo bacteriano a la que se exponga, concluyendo que a una mayor concentración de bacterias es necesario incrementar también la concentración de nanocompuesto. Ag-MOR posee la capacidad de ser reutilizado debido a su estabilidad fisicoquímica y térmica, se demostró que la capacidad de reuso se prolonga a medida que se incrementa la concentración del nanocompuesto. En conjunto el análisis de estos parámetros permite esclarecer las características primordiales de Ag-MOR para ser considerado un agente antimicrobiano de uso potencial.

Este proyecto finaliza con la propuesta de establecer un protocolo para la caracterización completa de nanocompuestos con actividad antimicrobiana, el cual incluya todos los parámetros evaluados en este trabajo. Esta caracterización proporcionará la información necesaria para establecer la eficacia y competitividad de los nanocompuestos propuestos como potenciales agentes antimicrobianos.

CONCLUSIONES

- El nanocompuesto Ag-MOR tiene propiedades bactericidas en *E. coli*, cuyos parámetros nos indican que es un nanomaterial competitivo para su uso en diferentes aplicaciones.
- El nanocompuesto Ag-MOR tiene una CMB de $3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, una CMI de $2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y una CI_{50} de $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ para *E. coli*.
- Ag-MOR presenta un efecto bactericida y no bacteriostático en *E. coli*.
- El efecto bactericida de Ag-MOR es mediado por las AgNPs incrustadas en la matriz de mordenita.
- El tiempo de acción bactericida de Ag-MOR es inversamente proporcional a la concentración del nanomaterial utilizado.
- Ag-MOR tiene la capacidad de ser reutilizado. El número de veces de reutilización depende de la concentración del nanomaterial.
- El efecto bactericida de Ag-MOR es dependiente del inóculo inicial bacteriano.
- El nanocompuesto Ag-MOR presenta las características y propiedades potenciales para su aplicación como agente antimicrobiano.

PERSPECTIVAS

- Realizar un análisis ultraestructural del efecto de Ag-MOR en *E. coli*.
- Determinar si el efecto bactericida de Ag-MOR se debe únicamente a los iones liberados, o bien a un efecto sinérgico de dichos iones y el contacto directo del nanomaterial y las células bacterianas.
- Complementar los estudios de tiempo de acción y capacidad de reúso con la determinación de la cinética de liberación de iones de Ag-MOR.
- Evaluar el efecto de Ag-MOR en diferentes condiciones de crecimiento bacteriano.
- Evaluar la eficacia bactericida de Ag-MOR en microbiomas de ambientes contaminados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Jaime-Acuña, O. E., Villavicencio, H., Díaz-Hernández, J. A., Petranovskii, V., Herrera, M. Raymond-Herrera, O. 2014. “Atomic and Electronic Structure of Quaternary Cd x Zn y SδOγ Nanoparticles Grown on Mordenite”. *Chemistry of Materials*, 26(21), 6152-6159.
- 2 Agnihotri S., Soumyo M., Suparna M. 2013. “Immobilized Silver Nanoparticles Enhance Contact Killing y Show Highest Efficacy: Elucidation of the Mechanism of Bactericidal Action of Silver.” *Nanoscale* 5: 7328–40. doi:10.1039/c3nr00024a.
- 3 Baerlocher Ch., McCusker L.B. Database of Zeolite Structures: <http://www.iza-structure.org/databases/>
- 4 Beer C., Foldbjerg F., Hayashi Y., Sutherland D.S., Autrup H. 2012. “Toxicity of Silver Nanoparticles - Nanoparticle or Silver Ion?” *Toxicology Letters* 208 (3). Elsevier Ireland Ltd: 286–92. doi:10.1016/j.toxlet.2011.11.002.
- 5 Bosch P., I Schifter. 2003. “La Zeolita: Una Piedra Que Hierve.” <http://www.eteka.info/140000/0e29941b42ce404ee6711dc42dc2f41d.pdf>.
- 6 Breck D.W. 1974. "Zeolite Molecular Sieves", Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, New York.
- 7 Buzea C., Pacheco II., Robbie K. 2007. “Nanomaterials y Nanoparticles: Sources y Toxicity.” *Biointerphases* 2 (4): 1–103. <http://scitation.aip.org/content/avs/journal/bip/2/4/10.1116/1.2815690>.
- 8 Campoccia D., Montanaro L., Arciola C.R. 2013. “A Review of the Biomaterials Technologies for Infection-Resistant Surfaces.” *Biomaterials* 34 (34). Elsevier Ltd: 8533–54. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.07.089.

- 9 Okkyoung C., Deng K., Kim N., Ross L., Rao Y., Surampalli, Zhiqiang Hu. 2008. "The Inhibitory Effects of Silver Nanoparticles, Silver Ions, and Silver Chloride Colloids on Microbial Growth." *Water Research* 42 (12): 3066–74. doi:10.1016/j.watres.2008.02.021.
- 10 Dong, B., S. Belkhair, M. Zaarour, L. Fisher, J. Verran, L. Tosheva, R. Retoux, J.-P. Gilson, y S. Mintova. 2014. "Silver Confined within Zeolite EMT Nanoparticles: Preparation y Antibacterial Properties." *Nanoscale* 6. Royal Society of Chemistry: 10859. doi: 10.1039/C4NR03169E.
- 11 Ferreira L., Fonseca A.M., Botelho G., Almeida-Aguiar C., Neves I.C.. 2012. "Antimicrobial Activity of Faujasite Zeolites Doped with Silver." *Microporous and Mesoporous Materials* 160. Elsevier Inc.: 126–32. doi:10.1016/j.micromeso.2012.05.006.
- 12 Greulich C., Braun D., Peetsch A., Diendorf J., Siebers B, Eppe M., Köller M. 2012. "The Toxic Effect of Silver Ions and Silver Nanoparticles towards Bacteria and Human Cells Occurs in the Same Concentration Range." *RSC Advances* 2: 6981. doi: 10.1039/c2ra20684f.
- 13 Ghosh, S., Kaushik K., Nagalakshmi K., Hoti S.L., Menezes G., Harish B.N., Vasan H.N. 2010. "Antimicrobial Activity of Highly Stable Silver Nanoparticles Embedded in Agar-Agar Matrix as a Thin Film." *Carbohydrate Research* 345 (15). Elsevier Ltd: 2220–27. doi: 10.1016/j.carres.2010.08.001.
- 14 Gu H, Ho PL, Tong E,Wang L, Xu B. Presenting vancomycin on nanoparticles to enhance antimicrobial activities. *Nano Lett* 2003;3(9):1261–3.
- 15 Guerra R., Lima E., Guzmán A. 2013. "Antimicrobial Supported Nanoparticles: Gold versus Silver for the Cases of Escherichia coli and Salmonella Typhi." *Microporous and Mesoporous Materials* 170 (April): 62–66. doi: 10.1016/j.micromeso.2012.11.036.
- 16 Guerra R., Lima E., Guzmán A. Viniegra M., Lara V. 2012. "Growth of Escherichia coli and Salmonella Typhi Inhibited by Fractal Silver Nanoparticles Supported on Zeolites." *Microporous and Mesoporous Materials* 147 (1).

Elsevier Inc.: 267–73. doi: 10.1016/j.micromeso.2011.06.031.

- 17 Nikawa H., Yamamoto, Hamada T., Rahardjo B., Murata H., y Nakanoda S. 1997. "Antifungal effect of zeolite-incorporated tissue conditioner againsts *Candida albicans* growth and/or acid production. *J. Oral Rehabil.*
- 18 Hotts M., Nakajima H., Yamamoto K. y M. Aono. 1998. "Antibacterial temporary filling materials: the effect of adding various ratios of Ag-Zn-zeolite". *J. Oral Rehabil* 485-489
- 19 Im K., Takasaki Y., Endo A. y Kuriyama M. 1996. "Antibacterial activity of A'tipe zeolite supporting silver ions in deionized distilled water. *J. Antibacterial Antifungal Agents* 24, 269-274.
- 20 Inoue Y., Hoshino M., Takahashi H., Noguschi T., Mutara T., Kanzaki Y., Hamashima H. y Sasatsu M. 2002. "Bactericidal activity of Ag-zeolite mediated by reactive oxygen species under aerated contition. *J.Inorg. Biochem.* 93 37-42.
- 21 Jiraroj, Duangkamon, Sukkaneste Tungasmita, y Duangamol N. Tungasmita. 2014. "Silver Ions and Silver Nanoparticles in Zeolite A Composites for Antibacterial Activity." *Powder Technology* 264. Elsevier B.V.: 418–22. doi: 10.1016/j.powtec.2014.05.049.
- 22 Kawahara K., Tsuruda K., Morishita M. y Uchida M. 2000. "Antibacterial effect of dilver-zeolite on oral bacteria under anaerobic condition". *Dent. Mater,* 16 452-455
- 23 Khin M.M., Nair S., Babu J., Murugan R., Ramakrishna S. 2012. "A Review on Nanomaterials for Environmental Remediation." *Energy & Environmental Science* 5: 8075. doi: 10.1039/c2ee21818f.
- 24 Lalueza P., Monzón M., Arruebo M., Santamaría J. 2011. "Bactericidal Effects of Different Silver-Containing Materials." *Materials Research Bulletin* 46 (11): 2070–76. doi: 10.1016/materresbull.2011.06.041
- 25 Loza, K., J. Diendorf, C. Sengstock, L. Ruiz-Gonzalez, J. M. Gonzalez-Calbet, M. Vallet-Regi, M. Köller, y M. Epple. 2014. "The Dissolution and Biological Effects of Silver Nanoparticles in Biological Media." *Journal of Materials*

Chemistry B 2: 1634. doi:10.1039/c3tb21569e.

- 26 Madigan M.T., Martinko J.M., y Parker J. “Biología De Los Microorganismos.” 10a Ed.
- 27 Matsumura, Yoshinobu, Kuniaki Yoshikata, Shin-ichi Kunisaki, y Tetsuaki Tsuchido. 2003. “Mode of Bactericidal Action of Silver Zeolite and Its Comparison with that of Silver Nitrate Mode of Bactericidal Action of Silver Zeolite and Its Comparison with that of Silver Nitrate.” *Applied and Environmental Microbiology* 69 (7): 4278–81. doi:10.1128/AEM.69.7.4278.
- 28 Mocanu, Aurora, Gabriel Furtos, Sorin Rapuntean, Ossi Horovitz, Chirila Flore, Corina Garbo, Ancuta Danisteanu, Gheorghe Rapuntean, Cristina Prejmerean, y Maria Tomoaia-Cotisel. 2014. “Synthesis; Characterization and Antimicrobial Effects of Composites Based on Multi-Substituted Hydroxyapatite and Silver Nanoparticles.” *Applied Surface Science* 298 (April). Elsevier B.V.: 225–35. doi:10.1016/j.apsusc.2014.01.166.
- 29 Morones, Jose Ruben, Jose Luis Elechiguerra, Alejandra Camacho, Katherine Holt, Juan B Kouri, Jose Tapia Ram, y Miguel Jose Yacaman. 2005. “The Bactericidal Effect of Silver Nanoparticles” 2346. doi:10.1088/0957-4484/16/10/059.
- 30 Murray, Patrick R, K E N S Rosenthal, y Michael A Pfaller. MICROBIOLOGÍA.
- 31 Pankey, G a, y L D Sabath. 2004. “Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections.” *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 38: 864–70. doi:10.1086/381972.
- 32 Rai, Mahendra, Alka Yadav, y Aniket Gade. 2009. “Silver Nanoparticles as a New Generation of Antimicrobials.” *Biotechnology Advances* 27 (1). Elsevier Inc.: 76–83. doi:10.1016/j.biotechadv.2008.09.002.