

DESARROLLO DE NANOCOMPUESTOS DE PLATA COMO AGENTES  
DESINFECTANTES IN-VITRO

MARÍA CAMILA TACHA PÉREZ

FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA  
FACULTAD DE INGENIERIAS  
PROGRAMA DE INGENIERIA QUÍMICA  
BOGOTÁ D.C  
2020

DESARROLLO DE NANOCOMPUESTOS DE PLATA COMO AGENTES  
DESINFECTANTES IN-VITRO

MARÍA CAMILA TACHA PÉREZ

Proyecto integral de grado para optar al título de  
INGENIERO QUÍMICO

Director,  
JAVIER RINCÓN

FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA  
FACULTAD DE INGENIERIAS  
PROGRAMA DE INGENIERIA QUÍMICA  
BOGOTÁ D.C

2020

Nota de aceptación:

---

---

---

---

---

---

---

---

Ingeniera Angie Tatiana Ortega Ramírez

---

Ingeniero Iván Ramírez Marín

Bogotá D.C., febrero de 2020

## **DIRECTIVAS DE LA UNIVERSIDAD**

Presidente de la Universidad y Rector del Claustro

**Dr. MARIO POSADA GARCÍA**

Vicerrector de Desarrollo y Recursos Humanos

**Dr. LUIS JAIME POSADA GARCÍA PEÑA**

Vicerrectoría Académica y de Posgrados (E).

**Dra. ALEXANDRA MEJÍA GUZMÁN**

Secretaria General

**Dra. ALEXANDRA MEJÍA GUZMÁN**

Decano General de la Facultad de Ingenierías

**Ing. JULIO CESAR FUENTES ARISMENDI**

Director del Departamento de Ingeniería Química

**Ing. LEONARDO DE JESÚS HERRERA GUTIÉRREZ**

Las directivas de la Universidad de América, los jurados calificadores y el cuerpo docente no son responsables por los criterios e ideas expuestas en el presente documento. Estos corresponden únicamente a los autores.

## DEDICATORIAS

A mi motor, mi roca y mi luz, mis padres que han sido los mejores guías a lo largo del camino recorrido, limpian mis rodillas cada vez que caigo y me dan la fortaleza para levantarme riendo del dolor, la vida es un sinfín de aprendizajes y se han encargado de enseñármelo. Esto no sería posible sin ustedes, es por eso que todos mis logros siempre serán suyos. Son lo más importante de mi vida, los amo con todas las fuerzas de mi ser y un poquito más. Nunca olviden que después de la tormenta, siempre llega la calma y el cielo les queda pequeño para el paraíso que se merecen.

A la persona que, tal vez, me parezca más que cualquier en el mundo, mi hermano Steven que ha sido el mejor ejemplo a seguir, Dios les pone a sus mejores soldados las batallas más difíciles, su responsabilidad, perseverancia y el amor que entrega a cada cosa que hace, son cualidades que lo hacen de las mejores personas que existen, realmente esto es posible por usted, no me alcanzan las palabras para expresarle mi gratitud y cariño, este logro no alcanza para agradecerle, sin embargo, es por y para usted.

A mi persona favorita en el mundo, mi hermano José que día a día me enseña el verdadero significado de ser familia, es mi tesoro más grande, mi mejor consuelo en los momentos de dificultad y mi alegría en todos los demás, no imagina lo feliz que me hace verlo triunfar, el mejor compañero de vida que Dios me pudo dar, de su mano hasta la eternidad, estoy segura que nunca me va faltar ni yo a él, este logro es para ti, la vida es más bonita cuando la vivo contigo.

A mi alma gemela, confidente y cómplice, parecidas, pero no iguales, mi hermana Carol que cree en mí más de lo que yo lo haría, me llena el alma ver que aprendió lo mejor que puedo tener y dejó a un lado lo malo, convirtiéndose en mi mejor versión, sepa que nunca le voy a faltar, es mi mayor orgullo y siempre daré más de lo que tengo para verla feliz, juntas contra el mundo para toda la vida, este logro es para usted.

“A ellos por llenarme el corazón, la vida y todo lo que falte.”

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios por permitirme alcanzar este logro, llenarme de sabiduría y fortaleza en cada paso que doy. A mis padres, por todo el esfuerzo y dedicación que ponen a diario para hacerme la persona que soy, por el amor y apoyo incondicional que me brindan, por los consejos y la fortaleza que gracias a ellos nunca me hicieron falta. A mis hermanos, por ser mis mejores confidentes, por darme las herramientas a diario para seguir adelante, por sus enseñanzas y por ser el mejor regalo que la vida me pudo dar. Al semillero de investigación sobre nanomateriales perteneciente a la universidad Antonio Nariño, en especial a mi director Javier Rincón, por todo el conocimiento, apoyo y comprensión brindados a lo largo de este proyecto, sin ustedes esto no sería posible. A valita, por convertirse en una de las personas más importantes de mi vida, por su apoyo incondicional, por ser un hombro firme en el cual llorar, por los excelentes consejos, por su compañía y por hacer parte de mi familia. A mis tíos Raúl y Fabio, por ser personas claves a lo largo del camino, por darme el auxilio que siempre necesité y las palabras indicadas en cada ocasión. A Juanita, por ser la otra hermana que la vida me dio, por escucharme y estar conmigo a pesar de la distancia. A Daniel y Camilo, por ser los mejores amigos que un angelito me pudo regalar, por cuidarme como a una hermana menor, por el apoyo y compañía que siempre me brindan. A los amigos que me dejó el colegio, por perdurar al pasar de los años, por su amistad incondicional y por ser siempre buenos confidentes. A las que somos, por convertirse en excelentes amigas, por los buenos consejos y por ser tan buena compañía. A los amigos que la universidad me regaló, por enseñarme que la vida puede disfrutarse todo el tiempo, por escucharme y por su apoyo en los momentos de dificultad, por darme la alegría que todo este tiempo necesité y ser mi escape frente a los momentos de tristeza, por la excelente compañía y cariño que me brindan. A las personas que ya no se encuentran en mi vida, por ser tan importantes en cada etapa que tuve que recorrer, por el amor y apoyo que me brindaron. A todos ustedes, infinitas gracias, no me alcanzan las palabras para expresarles el amor que les guardo, aquí tienen siempre una mano con la que contar.

## CONTENIDO

	pág
INTRODUCCIÓN	21
OBJETIVOS	25
1. MARCO TEÓRICO	26
1.1 BACTERIAS	26
1.1.1 Mecanismos productores de energía.	27
1.2 RECUPERACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS	28
1.2.1 Escala McFarland.	28
1.2.2 Recuento de colonias (UFC).	29
1.2.3 Curva de crecimiento.	30
1.3 ANTIBIÓTICOS	32
1.3.1 Clasificación según farmacocinética y farmacodinamia.	33
1.3.1.1 Betalactámicos.	33
1.3.1.2 Glicopéptidos.	34
1.3.1.3 Aminoglucósidos.	35
1.3.1.4 Macrólidos.	35
1.3.1.5 Quinolonas.	36
1.4 TINCIÓN DE GRAM	37
1.4.1 Estructura de la pared de las bacterias Gram positivas.	38
1.4.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .	39
1.4.2 Estructura de la pared celular de las bacterias Gram negativas.	40
1.4.2.1 <i>Escherichia coli</i> .	41
1.5 PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD BACTERIANA	42
1.5.1 Método Kirby Bauer.	42
1.5.2 Método de dilución de caldo.	43
1.6 MÉTODO SOL-GEL	43
1.6.1 Hidrólisis y condensación.	45
1.6.1.1 Hidrólisis.	45

1.7	ULTRASONIDO DE ALTA POTENCIA	47
1.8	COPRECIPITACIÓN QUÍMICA	47
1.9	NANOMATERIALES	47
1.9.2	Nanopartículas de Plata.	48
1.9.2.1	Mecanismo de acción de las AgNPs.	48
1.10	CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES NANOESTRUCTURADOS	50
1.10.1	Microscopía electrónica de barrido.	50
1.10.2	Espectrometría de dispersión de rayos X.	50
2.	SÍNTESIS DE LOS NANOCOMPUESTOS DE PLATA IN SITU, SOPORTÁNDOLOS SOBRE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE HIERRO RECUBIERTAS POR ÓXIDO DE SILICIO	51
2.1	MATERIALES DE PARTIDA	51
2.2	EQUIPOS	55
2.3	SÍNTESIS DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE HIERRO (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ) – NPIO POR SONOQUÍMICA	58
2.4	PROTECCIÓN DE LAS NPIO DE LA CORROSIÓN MEDIANTE UN RECUBRIMIENTO BIOCOMPATIBLE DE ÓXIDO DE SILICIO ASISTIDO POR ULTRASONIDOS	59
2.4.1	Preparación del sol.	59
2.5	SÍNTESIS DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA IN SITU, SOPORTÁNDOLAS SOBRE LA SUPERFICIE DE ÓXIDO DE SILICIO – AGNCS	62
3.	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOCIDA DE LOS NANOCOMPUESTOS SINTETIZADOS EMPLEANDO COMO BACTERIAS MODELO <i>STAPHYLOCCUS AUREUS</i> Y <i>ESCHERICHIA COLI</i>	66
3.1	TINCIÓN DE GRAM	66
3.2	PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA RECUPERACIÓN DE LAS CEPAS BACTERIANAS	67
3.3	RECuento DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIA (UFC)	69

3.4	CURVAS DE CRECIMIENTO MICROBIANO	79
3.5	CARACTERIZACIÓN DE LOS NANOCOMPUESTOS DE PLATA QUE EXHIBIERON ACTIVIDAD BIOCIDA	83
3.5.1	Caracterización del Sol.	83
3.5.2.	Caracterización Morfológica y química de las NPIO.	84
3.5.3.	Caracterización cristalográfica de las nanopartículas.	88
4.	DETERMINACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE LAS BACTERIAS MODELO A LOS NANOCOMPUESTOS DE PLATA SINTETIZADOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE DIFUSIÓN EN AGAR (MÉTODO DE KIRBY – BAUER)	90
4.1	TÉCNICA DE KIRBY BAUER PARA PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD FRENTE A ANTIMICROBIANOS	90
4.2	REALIZACIÓN DE LAS MEDICIONES CORRESPONDIENTES PARA IDENTIFICAR EL HALO DE INHIBICIÓN CORRESPONDIENTE A LA DOSIS MÍNIMA BIOCIDA	91
5.	DETERMINACIÓN DE LA DOSIS MÍNIMA BIOCIDA DE LOS NANOCOMPUESTOS DE PLATA SINTETIZADOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE DILUCIÓN DE CALDO SOBRE LAS BACTERIAS MODELO	94
5.1	TÉCNICA DE DILUCIÓN DE CALDO PARA PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD FRENTE A ANTIMICROBIANOS	95
5.2	REALIZACIÓN DE LAS MEDICIONES CORRESPONDIENTES PARA IDENTIFICAR LA DOSIS MÍNIMA BIOCIDA	96
6.	CONCLUSIONES	109
7.	RECOMENDACIONES	111
	BIBLIOGRAFÍA	112



## LISTADO DE FIGURAS

	pág.
<b>Figura 1.</b> Fosforilación a nivel de sustrato	27
<b>Figura 2.</b> Fosforilación oxidativa	28
<b>Figura 3.</b> Recuento de colonias (UFC)	30
<b>Figura 4.</b> Mecanismo de acción betalactámicos	33
<b>Figura 5.</b> Mecanismo de acción glicopéptido	35
<b>Figura 6.</b> Mecanismo de acción aminoglucósidos	35
<b>Figura 7.</b> Mecanismo de acción macrólidos	36
<b>Figura 8.</b> Mecanismo de acción quinolonas	36
<b>Figura 9.</b> Tinción Gram para bacterias Gram Positivas y Gram Negativas	37
<b>Figura 10.</b> Estructura de la pared celular de las bacterias Gram Positivas	38
<b>Figura 11.</b> Staphylococcus aureus	40
<b>Figura 12.</b> Estructura de la pared celular de las bacterias Gram Negativas	41
<b>Figura 13.</b> Escherichia coli	42
<b>Figura 14.</b> Método sol-gel.	44
<b>Figura 15.</b> Mecanismo de acción de las Nanopartículas de plata.	49
<b>Figura 16.</b> Ultrasonido	55
<b>Figura 17.</b> Centrifuga	56
<b>Figura 18.</b> Horno de secado	56
<b>Figura 19.</b> Agitador digital de placa de cerámica	57
<b>Figura 20.</b> pHmetro	57
<b>Figura 21.</b> Montaje para la preparación del sol	60
<b>Figura 22.</b> Preparación del sol	61
<b>Figura 23.</b> Separación magnética	62
<b>Figura 24.</b> Síntesis de nanopartículas de plata	63
<b>Figura 25.</b> Síntesis del nanocompuesto de plata	64
<b>Figura 26.</b> Tinción Gram S. aureus	67
<b>Figura 27.</b> Tinción Gram E. coli	67
<b>Figura 28.</b> Inoculo Staphylococcus Aureus	69
<b>Figura 29.</b> Inoculo Escherichia Coli	69
<b>Figura 30.</b> Preparación de diluciones	70
<b>Figura 31.</b> Siembra en agar.	74
<b>Figura 32.</b> Dilución $10^{-1}$ para S. aureus	75
<b>Figura 33.</b> Dilución $10^{-2}$ para S. aureus	75
<b>Figura 34.</b> Dilución $10^{-3}$ para S. aureus	75
<b>Figura 35.</b> Dilución $10^{-4}$ para S. aureus	75
<b>Figura 36.</b> Dilución $10^{-5}$ para S. aureus	75
<b>Figura 37.</b> Dilución $10^{-6}$ para S. aureus	75
<b>Figura 38.</b> Dilución $10^{-7}$ para S. aureus	76

<b>Figura 39.</b> Dilución $10^{-8}$ para <i>S. aureus</i>	76
<b>Figura 40.</b> Dilución $10^{-9}$ para <i>S. aureus</i>	76
<b>Figura 41.</b> Dilución $10^{-10}$ para <i>S. aureus</i>	76
<b>Figura 42.</b> Dilución $10^{-1}$ para <i>E. coli</i> .	77
<b>Figura 43.</b> Dilución $10^{-2}$ para <i>E. coli</i> .	77
<b>Figura 44.</b> Dilución $10^{-3}$ para <i>E. coli</i> .	77
<b>Figura 45.</b> Dilución $10^{-4}$ para <i>E. coli</i> .	77
<b>Figura 46.</b> Dilución $10^{-5}$ para <i>E. coli</i> .	78
<b>Figura 47.</b> Dilución $10^{-6}$ para <i>E. coli</i> .	78
<b>Figura 48.</b> Dilución $10^{-7}$ para <i>E. coli</i> .	78
<b>Figura 49.</b> Dilución $10^{-8}$ para <i>E. coli</i> .	78
<b>Figura 50.</b> Dilución $10^{-9}$ para <i>E. coli</i> .	78
<b>Figura 51.</b> Dilución $10^{-10}$ para <i>E. coli</i> .	78
<b>Figura 52.</b> Metodología técnica Kirby Bauer.	91
<b>Figura 53.</b> Técnica Kirby Bauer para <i>Staphylococcus aureus</i> .	91
<b>Figura 54.</b> Técnica Kirby Bauer para <i>Escherichia Coli</i>	92
<b>Figura 55.</b> Metodología técnica de Dilución de caldo.	96

## LISTADO DE GRÁFICAS

	pág.
<b>Gráfica 1.</b> Curva de crecimiento bacteriano	31
<b>Gráfica 2.</b> Curva de calibración para Staphylococcus aureus	72
<b>Gráfica 3.</b> Curva de calibración para Escherichia coli.	73
<b>Gráfica 4.</b> Curva de crecimiento Staphylococcus aureus.	80
<b>Gráfica 5.</b> Curva de crecimiento Escherichia coli	82
<b>Gráfica 6.</b> Espectroscopia Raman de sol SiO <sub>2</sub> .	84
<b>Gráfica 7.</b> AFM de 5x5 µm de Fe@SiO <sub>2</sub>	85
<b>Gráfica 8.</b> Microfotografías obtenidas por MEB de nanopartículas de óxido de hierro recubiertas por SiO <sub>2</sub> y Ag	86
<b>Gráfica 9.</b> Espectro de EDS de nanopartículas de óxido de Hierro/Ag.	87
<b>Gráfica 10.</b> Refinamiento de Rietveld de Nps de óxido de Hierro/Ag aplicando el software PCW	88
<b>Gráfica 11.</b> Aplicación de agentes bactericidas Staphylococcus aureus réplica 1	98
<b>Gráfica 12.</b> Aplicación de agentes bactericidas Staphylococcus aureus réplica 2	100
<b>Gráfica 13.</b> Aplicación de agentes bactericidas Escherichia coli réplica 1	103
<b>Gráfica 14.</b> Aplicación de agentes bactericidas Escherichia coli réplica 2	105

## LISTADO DE TABLAS

	<b>pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Escala McFarland.	29
<b>Tabla 2.</b> Fases de la curva de crecimiento	31
<b>Tabla 3.</b> Reactivos para la síntesis de AgNCs	51
<b>Tabla 4.</b> Equipos para la síntesis de AgNCs	55
<b>Tabla 5.</b> Curva de calibración para Staphylococcus aureus	71
<b>Tabla 6.</b> Curva de calibración para Escherichia coli	72
<b>Tabla 7.</b> Curva de crecimiento Staphylococcus aureus	80
<b>Tabla 8.</b> Curva de crecimiento Escherichia coli	81
<b>Tabla 9.</b> Diseño experimental	94
<b>Tabla 10.</b> Aplicación de agentes bactericidas Staphylococcus aureus réplica 1	97
<b>Tabla 11.</b> Aplicación de agentes bactericidas Staphylococcus aureus réplica 2	99
<b>Tabla 12.</b> Aplicación de agentes bactericidas Escherichia coli réplica 1	102
<b>Tabla 13.</b> Aplicación de agentes bactericidas Escherichia coli réplica 2	104
<b>Tabla 14.</b> Antecedente Vs Resultado	107

## GLOSARIO

**ABSORBANCIA:** hace referencia a la medida con la que se determina el nivel en el que se atenúa la radiación en el momento en que un haz de luz incide en una muestra.

**ADN:** ácido desoxirribonucleico, se trata del biopolímero que contiene la información necesaria para la síntesis de proteínas y constituye el material genético presente en las células.

**AFM:** técnica de caracterización de microscopía de fuerza atómica.

**AGAR NUTRITIVO:** se define como el medio de cultivo empleado para propósitos generales, aislamiento y recuento de microorganismos con bajos niveles de exigencia nutricional.

**AgNC:** nanocompuesto de plata compuesto por un núcleo de óxido de hierro, recubierto de óxido de silicio y decorado con nanopartículas de plata.

**ALCÓXIDO:** es la base conjugada proveniente de un alcohol, la cual se compone de un grupo orgánico a un átomo de oxígeno con carga negativa.

**ÁNGSTROM (Å):** es una unidad de longitud usada para denotar principalmente longitudes de onda, distancias atómicas y moleculares.

**ANTIBIOGRAMA:** se define como el conjunto de procedimientos con los cuales es posible determinar la sensibilidad de un microorganismo frente a un agente antimicrobiano/antibiótico.

**ANTIBIÓTICO:** aquella sustancia capaz de eliminar o inhibir el crecimiento de diversos microorganismos patógenos.

**ÁREA SUPERFICIAL:** se define como la propiedad cuya finalidad es controlar la interacción química entre sólidos, líquidos o gases.

**ASA BACTERIOLÓGICA:** es un instrumento empleado en microbiología para la siembra de cultivos microbianos.

**ATP:** adenosín trifosfato, es una molécula orgánica que pertenece al grupo de nucleótidos la cual es vital en los procesos de generación de energía celular.

**BACTERICIDA:** hace referencia al agente que logra producir lisis celular en las bacterias.

**BACTERIOSTÁTICO:** hace referencia al agente que logra inhibir el crecimiento de las bacterias sin ocasionar lisis celular.

**BIOCOMPATIBILIDAD:** es la capacidad que posee un material de no degradar o interferir en el medio biológico en el cual son sometidos.

**CALDO NUTRITIVO:** se define como el medio de cultivo empleado para propósitos generales, en específico para el desarrollo de microorganismos con bajos niveles de exigencia nutricional.

**CAMPO ELECTROMAGNÉTICA:** reúne los campos de fuerza eléctrica y magnéticos invisibles.

**CATALIZADOR:** es aquella sustancia de carácter simple o compuesta, que logra aumentar o reducir la velocidad propia de una reacción química.

**CEPA BACTERIANA:** se refiere al conjunto de bacterias cuyas características son homogéneas, es decir, pertenecen a la misma especie.

**CONDENSACIÓN:** proceso en el cual ocurre un cambio de estado de la materia que se encuentra en estado gaseoso a estado líquido.

**COPRECIPITACIÓN:** es el proceso a través del cual una especie soluble logra separarse de la disolución en la formación del precipitado.

**DESINFECCIÓN:** es el proceso a través del cual se eliminan microorganismos patógenos limpiando un espacio o superficie.

**DILUCIÓN:** es el proceso por el cual se incrementa la proporción de disolvente respecto al soluto de una mezcla, por lo cual la concentración disminuye.

**DISPERSIÓN:** segmentar, dividir y distribuir lo que se encontraba unido.

**DMB:** dosis mínima biocida, es la dosis más baja requerida por un agente biocida para lograr lisis celular en las bacterias.

**DMI:** dosis mínima inhibitoria, es la dosis más baja requerida por un agente antimicrobiano para inhibir el crecimiento bacteriano sin generar lisis celular.

**DRX:** técnica de caracterización de difracción de rayos X.

**EDS:** técnica de caracterización de espectroscopía de energía.

**EFECTO ESTÉRICO:** es la propiedad de la estructura espacial de una molécula que pretende retardar o impedir que reaccione con otra molécula.

**ESPECTRO:** se refiere a la distribución de la intensidad de radiación con respecto a cierta magnitud, como la energía o longitud de onda.

**ESTABILIZANTE:** sustancia que al ser añadida pretende evitar la degradación de otra.

**FARMACORRESISTENCIA:** es la disminución de la eficacia que posee un medicamento específico el cual pretende curar una enfermedad.

**HALO DE INHIBICIÓN:** zona que rodea a un disco antibiótico en un antibiograma, en la cual no se presenta crecimiento bacteriano.

**HIDRÓLISIS:** reacción química en la cual las moléculas de agua se dividen en sus átomos componentes, permitiendo la formación de enlaces con otras sustancias.

**INORGÁNICO:** compuesto que carece de estructuras biológicas.

**IN-SITU:** se refiere a la aplicación de un fenómeno en un sitio determinado.

**IN-VITRO:** hace referencia al fenómeno biológico que se estudia a escala laboratorio, es decir, en un medio artificial fuera del organismo.

**IÓN:** átomo que se presenta tras la descomposición del mismo, de modo que aparece en cada uno de los polos del electrólito.

**MEB:** técnica de caracterización de microscopía electrónica de barrido.

**MICROORGANISMO:** se refiere a organismos de tamaño microscópico que poseen una organización biológica característica.

**MULTIRRESISTENCIA:** es la resistencia que presenta una bacteria a varios antimicrobianos destinados a eliminarlas o controlarlas.

**NANOMATERIAL:** es aquel material que tiene propiedades morfológicas inferiores a una décima de micrómetro por lo menos en una dimensión.

**NANOTECNOLOGÍA:** es la tecnología que se enfoca en aquellos materiales o estructuras con magnitudes de nanómetros.

**NPIO:** nanopartícula de óxido de hierro.

**ORGÁNICO:** compuesto que posee principalmente en su estructura estable al carbono con otros componentes (oxígeno, nitrógeno e hidrógeno).

**OXIDACIÓN:** hace referencia al proceso de generación de un óxido el cual se obtiene a partir de la combinación del oxígeno con un metal o metaloides.

**PARAMAGNETISMO:** es la tendencia propia de los momentos magnéticos libres de un material, a alinearse paralelamente frente a un campo magnético.

**PATÓGENO:** es un agente biológico capaz de desarrollar algún tipo de enfermedad o afectación en el cuerpo de un animal o vegetal.

**PEPTIDOGLICANO:** son cadenas de aminoazúcares unidas entre sí por péptidos que poseen bajo número de aminoácidos.

**pH:** es la unidad de medida que determina el nivel de acidez o alcalinidad que presenta una solución.

**POLÍMERO:** macromoléculas que se componen por una o varias unidades químicas a lo largo de una cadena.

**PRECURSOR:** sustancia requerida para la producción de otra por medio de una reacción química.

**PRESIÓN OSMÓTICA:** se refiere al nivel de fuerza requerida para que una solución logre retener el flujo de disolvente a través de una membrana semipermeable.

**RAYOS X:** ondas de carácter electromagnético que se caracterizan por ser emitidas por los electrones internos de un átomo.

**SÍNTESIS:** formación de una sustancia compuesta gracias a la combinación de sustancias más sencillas.

**SOL:** coloide que posee partículas sólidas que se encuentran suspendidas en un líquido.

**SURFACTANTE:** sustancia que busca reducir la tensión superficial existente en un fluido, de manera que actúa como detergente o emulsionante.

**TRANSESTERIFICACIÓN:** reacción en la cual los ésteres logran reaccionar con alcoholes en medios ácidos o básicos, produciendo nuevos ésteres que carecen del grupo carboxílico.

**TURBIDEZ:** es la medida que indica el grado de ausencia en la transparencia de un líquido gracias a la presencia de otras partículas en el mismo.

**ULTRASONIDO:** se define como la vibración mecánica con una frecuencia superior a la que puede ser percibida por el oído.

## RESUMEN

El presente trabajo evalúa la aplicación de compuestos nanoestructurados de plata (AgNCs) como agentes bactericidas. Los ensayos fueron adelantados sobre dos cepas de bacterias una Gram Negativa y otra Gram Positiva como referente, la *Escherichia coli* y el *Staphylococcus aureus* respectivamente. El nanocompuesto sintetizado empleó como sustrato nanopartículas de hierro (NPIO), recubiertas por óxido de hierro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$  - NPIO). Con el fin de controlar procesos de oxidación posteriores, así como aumentar el área superficial y biocompatibilidad de las nanopartículas, las NPIO fueron recubiertas con un sol precursor de óxido de silicio ( $\text{SiO}_2$ ), para finalmente decorarlas con nanopartículas de plata (AgNPs). Las NPIO fueron producidas por un proceso de coprecipitación, al igual que las AgNPs. El sol de  $\text{SiO}_2$  se sintetizó por metodología sol-gel asistida por ultrasonidos. Los ensayos para determinar la dosis mínima biocida (DMB) fueron adelantados *in-vitro*. Los ensayos sobre la DMB evidenciaron que la totalidad de AgNCs sintetizadas exhibían un comportamiento bacteriostático y bactericida, según la dosis de AgNPs empleada, siendo ésta una alternativa viable para la desinfección de materiales contaminados con microorganismos patógenos, amable con el medio, toda vez que las AgNCs tienen propiedades paramagnéticas y pueden ser recuperadas por interacción con un campo electromagnético.

**Palabras clave:** Nanocompuesto, bactericidas, multiresistencia, AgNPs, desinfección

## INTRODUCCIÓN

La actividad microbiana exhibida por las bacterias es causal de diferentes afectaciones en el humano, con altas tasas de morbilidad y mortalidad, en detrimento de la calidad de vida y con un fuerte impacto sobre los sistemas de salud pública. Además, estos microorganismos suelen ser nocivos en otros campos toda vez que están en capacidad de afectar la naturaleza de un material, contaminar un alimento al producir potentes toxinas que producen enfermedades en el tracto gastrointestinal<sup>1</sup>. Para el control de estos agentes patógenos, se han desarrollado sustancias que controlan su crecimiento (bacteriostáticos) o que directamente las destruyen (bactericidas); infortunadamente, algunas bacterias han desarrollado resistencia a los agentes antibióticos convencionales con el paso de los años<sup>2</sup>. Según la OMS la actividad bacteriana es un fenómeno con impacto mundial y su gravedad se potencializa ya que se ha podido identificar las propiedades farmacorresistentes de las mismas, por lo que la preocupación que esta problemática genera ha traído consigo la necesidad de desarrollar nuevas alternativas viables y eficaces, ya que el desarrollo de genes de resistencia imposibilita el control de las bacterias patógenas mediante la implementación de agentes antibióticos tradicionales<sup>3</sup>.

En la actualidad, se han presentado una serie de avances en el campo de la nanotecnología que brindan alternativas eficaces en diferentes campos de la ciencia. Las nanopartículas (NPs) han logrado posicionarse como materiales multifacéticos con un amplio rango de propiedades sinérgicas en comparación con partículas que poseen un tamaño submicrométrico o micrométrico. Los materiales nanoestructurados están constituidos por partículas que se encuentran en una escala nanométrica, con tamaños que rondan los  $100 \times 10^{-9}\text{m}$  o menos<sup>4</sup>. Éstos materiales exhiben una mayor eficiencia gracias a la relación existente entre el tamaño de la partícula y su área superficial, en tanto que, al ser partículas de tamaño nanométrico, el área superficial de las mismas aumenta ocasionando una

---

<sup>1</sup> CONSEJERÍA DE EMPLEO Y DESARROLLO TECNOLÓGICO. Manipulación de alimentos. En: *Servicio Andaluz de Empleo* [en línea]. [Consultado: 17 de marzo de 2019]. Disponible en [http://www.juntadeandalucia.es/empleo/recursos2/material\\_didactico/especialidades/materialdidactico\\_manipulacion\\_alimentos/PDF/Manual\\_Comun.pdf](http://www.juntadeandalucia.es/empleo/recursos2/material_didactico/especialidades/materialdidactico_manipulacion_alimentos/PDF/Manual_Comun.pdf)

<sup>2</sup> KWON, Ae.; JUNG, Huh & YOUNG, Jik. "Nanoantibioticos": Un nuevo paradigma para el tratamiento de enfermedades infecciosas utilizando nanomateriales. En: *Elsevier* [en línea]. 06 de julio de 2011. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.07.002>

<sup>3</sup> OMS. Datos recientes revelan los altos niveles de resistencia a los antibióticos en todo el mundo. En: *Organización Mundial de la Salud* [en línea]. 29 de enero de 2018. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2018/antibiotic-resistance-found/es/>

<sup>4</sup> ENFERMERÍA DEL TRABAJO. Nanotecnología, nanopartículas y toxicidad. 05 de febrero de 2015. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/5213017.pdf>

potencialización de sus propiedades<sup>5</sup>, característica fundamental en aplicaciones como catalizadores, conductores térmicos y actividad antimicrobiana<sup>6</sup>

Las AgNPs se aprovechan cada vez más en diferentes campos como consecuencia de sus propiedades químicas y físicas particulares<sup>7</sup>, hecho que ha suscitado un gran interés, sobre todo su aplicación en medicina donde han sido utilizadas en apósitos para heridas, instrumental quirúrgico; en sistemas de purificación de agua, en la industria cosmética y el sector alimenticio, todo esto gracias a sus propiedades que evitan el crecimiento bacteriano<sup>8</sup>.

De esta manera, se ha comprobado que las bacterias pueden ser controladas a través de nanopartículas (NPs) en tanto que nanocompuestos de plata (AgNCs) funcionan como agentes antimicrobianos que inhiben la actividad de las mismas

<sup>7</sup>. El mecanismo propio de dichos nanomateriales, que según Guadarrama se basa en la atracción electrostática entre la carga negativa de las bacterias y la carga positiva de las AgNCs, además, su afinidad por los grupos sulfuro o fosforilados presentes en la membrana de las bacterias, son aspectos clave para su función biocida. Las nanopartículas de plata (AgNPs) interfieren en las principales actividades del microorganismo: procesos de respiración celular, producción de especies activas de oxígeno (ROS) que envejecen prematuramente al organismo, sin dejar de lado el cambio en la permeabilidad de la membrana, aspectos que sumados causan la destrucción de los microorganismos y para los cuales, no se evidencia que el mismo genere resistencia<sup>9</sup>.

---

<sup>5</sup> SHEKHAR, Agnihotri; SOUMYO, Mukherji & SUPARNA, Mukherji. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. En: *Royal Society Of Chemistry* [en línea]. 01 de noviembre de 2013. [Consultado: 22 de febrero de 2019]. Disponible en [www.rsc.org/advances](http://www.rsc.org/advances)

<sup>6</sup> PATEL Vijay, BERTHOLD David, PURANIK Pravin & GANTAR Miroslav. Proyección de las cianobacterias y microalgas por su capacidad para sintetizar nanopartículas de plata con actividad antibacteriana. En: *Elsevier* [en línea]. 05 de diciembre de 2014. [Consultado: 17 de marzo de 2019]. Disponible en <https://mail.google.com/mail/u/1/?pli=1#inbox/FFNDWNXhcFbLvKsQkDHfTTgVXqbdKBCT?projector=1&messagePartId=0.7>

<sup>7</sup> ZHANG Xi-Feng, ZHI-GHUO Liu, WEI Shen y GURUNATHAN Sangiliyandi. Las nanopartículas de plata: síntesis, caracterización, propiedades, aplicaciones y enfoques terapéuticos. En: *Revista Internacional de Molecular Sciences* [en línea]. 13 de septiembre de 2016. [Consultado: 17 de marzo de 2019]. Disponible en <https://mail.google.com/mail/u/1/?pli=1#inbox/FFNDWNXhcFbLvKsQkDHfTTgVXqbdKBCT?projector=1&messagePartId=0.7>

<sup>8</sup> ÁVALOS, A.; HAZA, A.; MATEO, D. y MORALES, P. Nanopartículas de plata: aplicaciones y riesgos tóxicos para la salud humana y el medio ambiente. En: *Dpto. Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. UCM* [en línea]. 2013. [Consultado: 23 de agosto de 2019]. Disponible en <https://revistas.ucm.es/index.php/RCCV/article/download/43408/41203>.

<sup>9</sup> REYES, Sarai Carmina Guadarrama. Efecto antibacteriano de las nanopartículas de plata versus clorhexidina sobre streptococcus mutans y lactobacillus casei. En: *Universidad Autónoma del Estado de México* [en línea]. 18 de enero de 2013. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en <http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/49169/TESIS%20FINAL%20SARAI.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Es por todo esto que la presente investigación se enfoca en el desarrollo de AgNCs con actividad antimicrobiana, misma que será ensayada en dos cepas de bacterias, una Gram Positiva, como el *Staphylococcus aureus*, y otra Gram Negativa, en específico la *Escherichia coli* considerada un patógeno predominante en la flora intestinal humana. El *Staphylococcus aureus*, es considerado un patógeno con gran capacidad de generar un amplio espectro de enfermedades toda vez que produce alrededor de 11 serotipos y otras toxinas de gran virulencia para los mamíferos, las cuales ocasionan intoxicaciones alimentarias al ingerir productos contaminados<sup>10</sup>; el impacto que esta cepa bacteriana tiene sobre la salud se basa principalmente en la potente resistencia que este microorganismo presenta a los antibióticos, en especial a la meticilina<sup>11</sup>, razones por las cuales se desea estudiar el comportamiento biocida de las nanopartículas de plata sobre esta cepa con el fin de comprobar que estas son una alternativa eficiente en comparación con los agentes antimicrobianos tradicionales. Respecto a la *Escherichia coli*, ésta se encuentra de manera inocua en el tracto gastrointestinal, pero cuando las barreras gastrointestinales son sobrepasadas esta genera infecciones graves y enfermedades entéricas<sup>12</sup>, además, la presencia de esta bacteria en el agua se considera una fuerte indicación de una reciente contaminación proporcionada por aguas residuales o residuos animales<sup>13</sup>.

Finalmente, se propone la implementación de un nanocompuesto que consta de tres etapas: un núcleo de hierro, recubierto por un sistema multicapa de óxido de hierro con el fin de aprovechar sus propiedades paramagnéticas que permite su posible recuperación con un campo electromagnético, toda vez que las nanopartículas de plata presentan alta toxicidad para el ambiente, y recubrimiento de óxido de silicio para evitar la oxidación del hierro, nanocompuesto que servirá de soporte para las AgNPs., siendo una alternativa viable en la desinfección de aguas residuales, aunque el alcance de la presente investigación sólo probará la solución a escala laboratorio.

---

<sup>10</sup> INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. Evaluación de riesgos de staphylococcus aureus enterotoxigénico en alimentos preparados no industriales en Colombia. 2010. [Consultado: 23 de agosto de 2019]. Disponible en <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/Er-staphylococcus.pdf>

<sup>11</sup> CERVANTES GARCÍA, Estrella.; GARCÍA GONZÁLEZ, Rafael. & SALAZAR SCHETTINO, Paz María. Características generales del Staphylococcus. En: *Revista Latinoamericana de Patología Clínica* [en línea]. 24 de febrero de 2014. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en <http://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2014/pt141e.pdf>

<sup>12</sup> CANATA, María Gabriela; NAVARRO, Rodrigo; VELÁZQUEZ, Gladys & otros. Caracterización molecular de factores de virulencia de aislados Escherichia coli obtenidas de heces de niños con gastroenteritis del Hospital Central de Instituto de Previsión Social en el 2012. En: *Pediatría (Asunción)* [en línea]. 01 de abril de 2016. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en <http://dx.doi.org/10.18004/ped.2016.abril.13-17>

<sup>13</sup> RIVERA, Channah Rock and BERENISE. La Calidad del Agua, E. coli y su Salud. En: *college of agriculture and life sciences* [en línea]. Marzo de 2014. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en <https://extension.arizona.edu/sites/extension.arizona.edu/files/pubs/az1624s.pdf>

Por consiguiente, la finalidad de este proyecto se fundamenta en evaluar la dosis mínima biocida de AgNPs que sea capaz de controlar de manera efectiva la actividad microbiana que presenta afectaciones negativas, en las cepas bacterianas seleccionadas Gram Positivas y Gram Negativas *in-vitro*, trabajo desarrollado en el Semillero de Investigación en Nanotecnología, perteneciente a la Universidad Antonio Nariño que busca potencializar la implementación de nanomateriales como respuesta positiva al ambiente y la sociedad.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Evaluar el uso de nanocompuestos de plata como agentes biocidas sobre algunas bacterias resistentes a antibióticos comunes *in-vitro*, producidos por metodología sol - gel asistida por ultrasonidos.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar los nanocompuestos de plata *in situ*, soportándolos sobre nanopartículas de óxido de hierro recubiertas por óxido de silicio.
- Determinar la actividad biocida de los nanocompuestos sintetizados empleando como bacterias modelo *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.
- Determinar la susceptibilidad de las bacterias modelo a los nanocompuestos de plata sintetizados mediante la técnica de difusión en agar (Método de Kirby – Bauer).
- Determinar la Dosis Mínima Biocida de los nanocompuestos de plata sintetizados mediante la técnica de dilución de caldo sobre las bacterias modelo.

## 1. MARCO TEÓRICO

Actualmente, la multirresistencia que presentan las bacterias frente a las alternativas de control tradicionales como lo son los antibióticos<sup>3</sup>, ha afectado en gran medida a la calidad de vida de los mamíferos, en tanto que estas desarrollan ciertas actividades microbianas que las cataloga como microorganismos patógenos, fenómeno global que altera la economía por lo que surge la necesidad de hallar un agente capaz de controlar a estos microorganismos.

En los últimos años, los nanomateriales han logrado posicionarse gracias a sus propiedades, su reducido tamaño y amplia área superficial que los potencializa. Las nanopartículas de plata han sido estudiadas a fondo por lo que se destacan por sus propiedades biocidas capaces de controlar el crecimiento bacteriano siendo una alternativa viable<sup>7</sup>.

A continuación, el presente documento expondrá los procesos de síntesis del nanocompuesto de plata propuesto como agente biocida sobre dos cepas bacterianas: *Staphylococcus aureus* patógeno que desarrolla un amplio espectro de enfermedades en los mamíferos gracias a las toxinas y serotipos que desencadena<sup>11</sup>, y *Escherichia coli* patógeno que logra estar inocuo en la flora intestinal y cuando se potencializa, trae consigo graves enfermedades en su huésped, además es un indicador de la contaminación del agua<sup>13</sup>; al ser cepas bacterianas tan agresivas, se pretende evaluar el comportamiento biocida de este nanocompuesto de plata sobre las mismas, con el fin de encontrar la dosis mínima biocida que logre la lisis celular de estos microorganismos, a través de pruebas de susceptibilidad como la técnica de dilución de caldo y el método Kirby Bauer que nos otorga un halo de inhibición en el que actúan.

### 1.1 BACTERIAS

Son organismos microscópicos que, por lo general, tiene un tamaño de 0,5 a 5 micrómetros de largo y puede acoger distintas formas tales como barras curvas, esferas, barras y espirales. Estos microorganismos poseen la estructura necesaria para su correcto crecimiento y propagación. Las bacterias se reproducen de forma asexual, pero hay casos en los que el material genético que se emplea para su propagación, es transmitido de una bacteria a otra<sup>14</sup>. Las bacterias son microorganismos unicelulares que integran el reino procariota (pro de primitivo y cariota de núcleo)<sup>15</sup>.

---

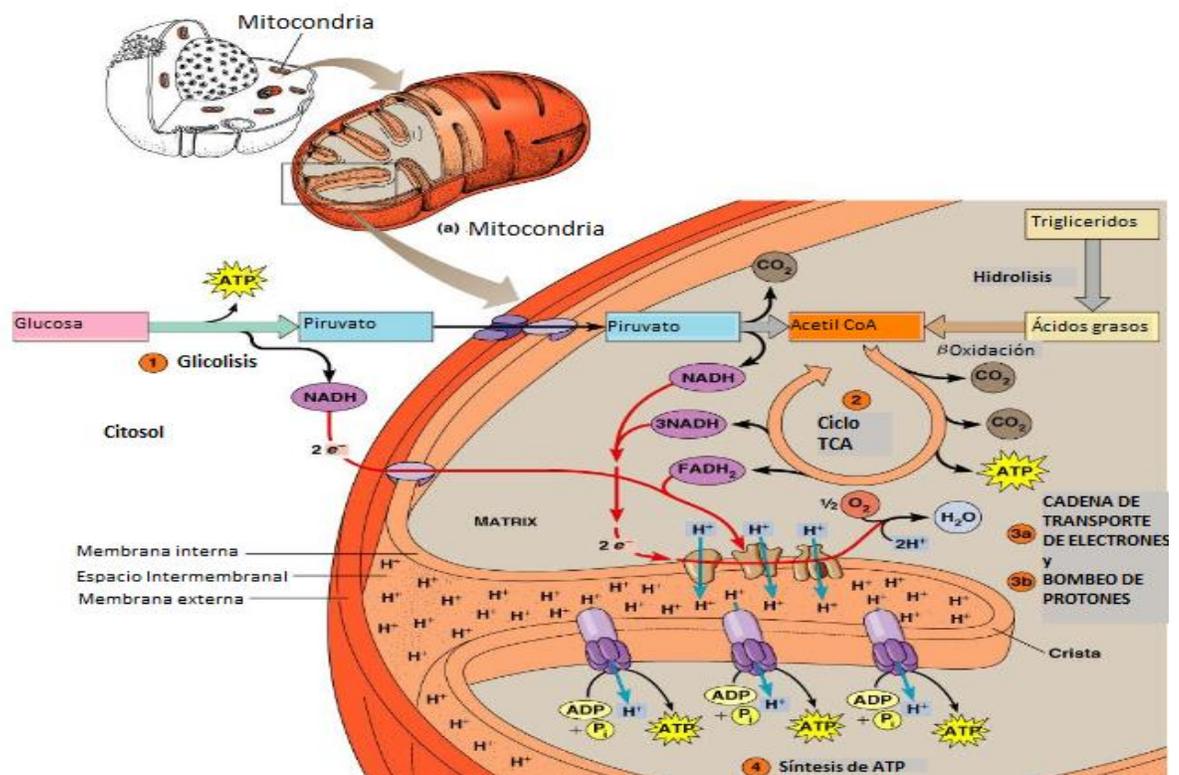
<sup>14</sup> FERNÁNDEZ, T. Diferencias entre virus y bacterias. 26 de agosto de 2010. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en <http://www.batanga.com/curiosidades/2010/08/26/diferencias-entre-virus-y-bacterias>

<sup>15</sup> PÍREZ, M. & MOTA, M. Morfología y estructura bacteriana. 2008. [Consultado: 17 de marzo de 2019]. Disponible en <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/MorfologiayEstructuraBacteriana.pdf>

**1.1.1 Mecanismos productores de energía.** Con ayuda de la síntesis de adenosin trifosfato (ATP), la conservación intracelular de energía es posible. Los mecanismos usados por las bacterias en la generación de ATP son principalmente:

- **Fosforilación a nivel de sustrato:** La fosforilación a nivel de sustrato consiste en un sistema empleado por ciertas bacterias quimiorganotrofas. El sustrato orgánico, aquel encargado de donar electrones, pasa por una ruta catabólica, y uno de los agentes intermediarios de esta ruta procede a ser oxidado por una coenzima, de manera que se origina un intermediario no fosforilado. Dicho intermediario es sometido posteriormente a una sustitución con un fosfato, para dar como resultado la correspondiente forma acilfosfato. Finalmente, este acilfosfato dona su fosfato con altos niveles de energía al ADP, que pasa a ATP<sup>16</sup>. A continuación se muestra este mecanismo en la **Figura 1**:

**Figura 1.** Fosforilación a nivel de sustrato

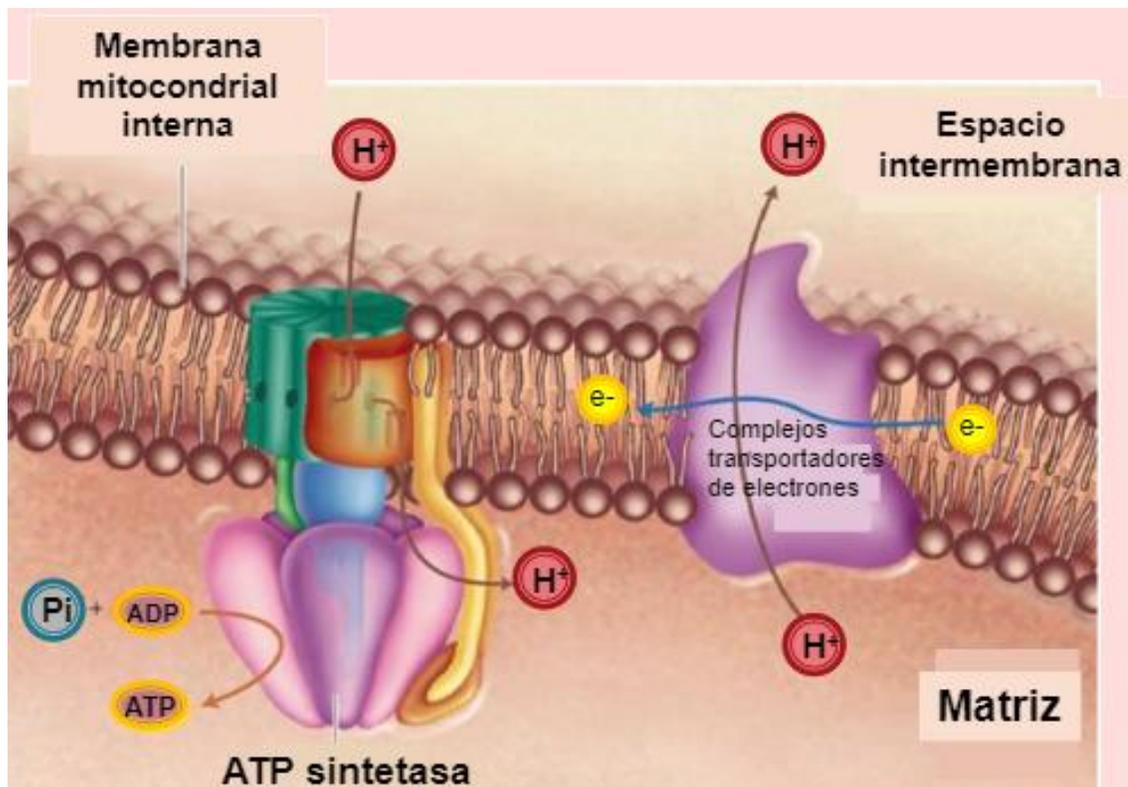


**Fuente:** SÁNCHEZ CRUZ, Ramona. Fosforilación a nivel de sustrato. Fosforilación Oxidativa (Fosforilación a nivel de Cadena Respiratoria). 2016. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <https://docplayer.es/24087262-Fosforilacion-a-nivel-de-sustrato-fosforilacion-oxidativa-fosforilacion-a-nivel-de-cadena-respiratoria.html>

<sup>16</sup> UAM. Principios del metabolismo microbiano. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en [http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/aura/Principios\\_Metabolismo\\_microbiano.pdf](http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/aura/Principios_Metabolismo_microbiano.pdf)

- **Fosforilación oxidativa.** La fosforilación oxidativa se trata del proceso por el que se forma ATP resultante de la transferencia de electrones proveniente del NADH o del FADH<sub>2</sub> al O<sub>2</sub> por medio de una serie de transportadores de electrones. El flujo de electrones desde el NADH o el FADH<sub>2</sub> al O<sub>2</sub> a través de complejos proteicos que se encuentran localizados en la membrana interna mitocondrial, esto genera el bombeo de protones hacia el exterior de la matriz mitocondrial. A partir de esto, es generada una fuerza protomotriz que está formada por un gradiente de pH y por un potencial eléctrico transmembranal. En el momento en que los protones retornan a la matriz mitocondrial por medio de un complejo enzimático, se da la síntesis de ATP<sup>16</sup>. En la **Figura 2** se presenta con mayor claridad este proceso:

**Figura 2.** Fosforilación oxidativa



**Fuente:** SÁNCHEZ CRUZ, Ramona. Fosforilación a nivel de sustrato. Fosforilación Oxidativa (Fosforilación a nivel de Cadena Respiratoria). 2016. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <https://docplayer.es/24087262-Fosforilacion-a-nivel-de-sustrato-fosforilacion-oxidativa-fosforilacion-a-nivel-de-cadena-respiratoria.html>

## 1.2 RECUPERACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS

**1.2.1 Escala McFarland.** Los estándares de McFarland se emplean en microbiología como un patrón para ajustar la turbidez de suspensiones bacterianas, con el fin de alcanzar el número de bacterias dentro del rango establecido para la

aplicación de pruebas de susceptibilidad. Se obtienen con cantidades específicas de cloruro de bario y ácido sulfúrico, ya que la mezcla de las dos sustancias origina un precipitado de sulfato de bario el cual manifiesta una turbidez en la solución. La función de estos estándares se basa en la comparación visual con una suspensión de bacterias en un medio, ya sea caldo nutritivo o disolución salina<sup>17</sup>. Los valores mostrados a continuación en la **Tabla 1** se refieren al número de células cuantificado para cada tubo dentro de la escala de McFarland los cuales varían según las cantidades con las cuales se realizan:

**Tabla 1.** Escala McFarland.

<b>Nº</b>	<b>BaCl<sub>2</sub> 0,048M ml</b>	<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,36M ml</b>	<b>Vf ml</b>	<b>Nº Células</b>
0,5	0,05	9,95	10	$1,5 \cdot 10^8$
1	0,1	9,9	10	$3 \cdot 10^8$
2	0,2	9,8	10	$6 \cdot 10^8$
3	0,3	9,7	10	$9 \cdot 10^8$
4	0,4	9,6	10	$12 \cdot 10^8$
5	0,5	9,5	10	$15 \cdot 10^8$
6	0,6	9,4	10	$18 \cdot 10^8$
7	0,7	9,3	10	$21 \cdot 10^8$
8	0,8	9,2	10	$24 \cdot 10^8$
9	0,9	9,1	10	$27 \cdot 10^8$
10	1	9	10	$30 \cdot 10^8$

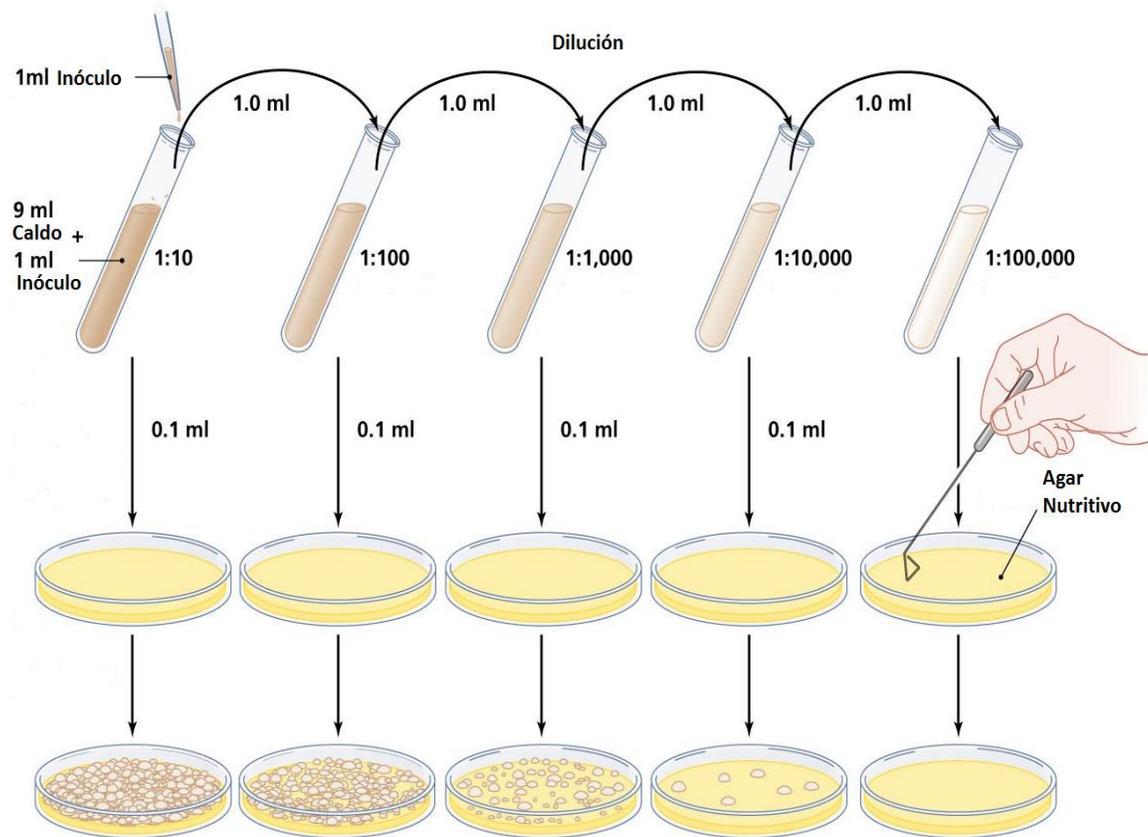
**Fuente:** PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA. Práctica 23 – Escala McFarland. 02 de marzo de 2017. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <https://fiestadelosmicroorganismos.wordpress.com/2017/03/02/practica-23-escala-mcfarland/>

**1.2.2 Recuento de colonias (UFC).** La técnica se fundamenta en el conteo de las “unidades formadoras de colonias” o UFC presentes en un gramo o mililitro de muestra. Se considera que cada colonia, que es desarrollada en el medio de cultivo de preferencia posterior a un periodo de tiempo de incubación a la temperatura adecuada, es proveniente de un microorganismo o de un agregado de ellos, de la muestra bajo estudio; ese microorganismo o microorganismos son capaces de formar la colonia, es decir una UFC. Con el fin de que las colonias puedan contarse de manera confiable, se hacen las diluciones decimales necesarias de la muestra,

<sup>17</sup> MDM CIENTÍFICA S.A.S. Inseto Patrón McFarland. 05 de julio de 2017. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <http://mdmcientifica.com/wp-content/uploads/2017/07/Patr%C3%B3n-McFarland-05072017-O-P.PD-311-INSERTO-05072017-MDM-cient%C3%ADfica.pdf>

antes de ponerla en el medio de cultivo<sup>18</sup>. Es posible realizar el recuento de colonias para una cepa tras realizar el procedimiento que se muestra en la **Figura 3**:

**Figura 3.** Recuento de colonias (UFC)



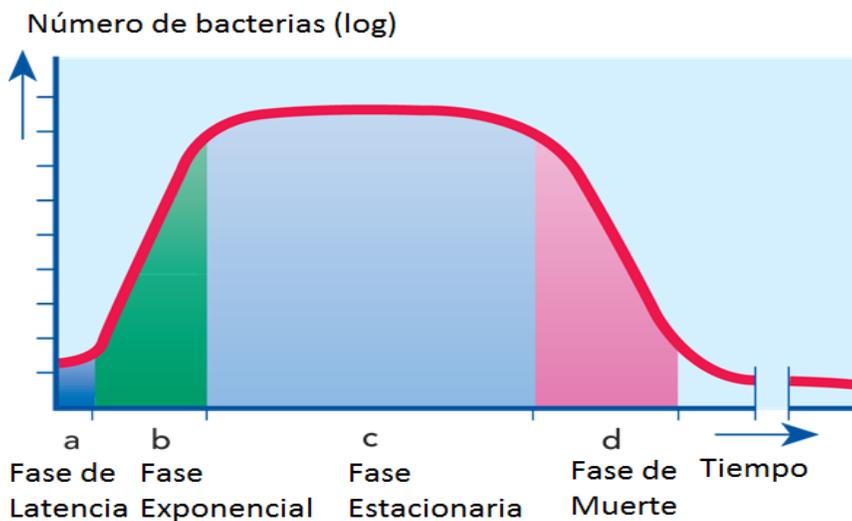
**Fuente:** CUMMING, Benjamin. Direct Methods. En: *Pearson Education* [en línea]. 2016. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <http://academic.pgcc.edu/~kroberts/Lecture/Chapter%206/counting.html>

**1.2.3 Curva de crecimiento.** Con el fin de entender y definir el crecimiento de microorganismos específicos, se colocan en un medio de cultivo de preferencia, en este caso, el medio de cultivo se trata de caldo nutritivo, con el cual se pretende suministrar los nutrientes requeridos y se controlan las condiciones ambientales. De tal manera que, si el medio líquido logra proporcionar todos los nutrientes necesarios para el crecimiento y parámetros ambientales propicios para el

<sup>18</sup> CAMACHO, A., M. GILES, A. ORTEGÓN, M. Palao, B. SERRANO y O. Velázquez. Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. En: *UNAM México* [en línea]. 2009. [Consultado: 17 de marzo de 2019]. Disponible en [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasicas-Cuenta-en-placa\\_6527.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasicas-Cuenta-en-placa_6527.pdf)

crecimiento, el aumento del número de células viables puede medirse como una función del tiempo para obtener una curva de crecimiento. Se observan varias fases de crecimiento distintas dentro de una curva de crecimiento. Se trata de la fase de latencia, fase exponencial, fase estacionaria y la fase de muerte, cada uno de los cuales se asocian con cambios fisiológicos específicos<sup>19</sup>. En la **Gráfica 1** se pueden observar con claridad dichas fases propias de cada microorganismo y en la **Tabla 2** se describen respectivamente:

**Gráfica 1.** Curva de crecimiento bacteriano



**Fuente:** TETRA PAK. Microbiología. En: *Manual de procesamiento de lácteos* [en línea]. 2019 [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <https://dairyprocessinghandbook.tetrapak.com/chapter/microbiology>

**Tabla 2.** Fases de la curva de crecimiento

Fase	Descripción
<b>Fase de latencia</b>	Crecimiento lento o falta de crecimiento generado por la adaptación fisiológica de las células a condiciones de cultivo o dilución de exoenzimas debido a la densidad celular inicial.

<sup>19</sup> IKNER, Luisa. Análisis de la curva de crecimiento bacteriano y sus aplicaciones ambientales. En: *Universidad de Arizona* [en línea]. 2019. [Consultado: 17 de marzo de 2019]. Disponible en <https://www.jove.com/science-education/10100/anlisis-de-la-curva-de-crecimiento-bacteriano-y-sus-aplicaciones?language=Spanish>

**Tabla 2.** (Continuación)

<b>Fase</b>	<b>Descripción</b>
<b>Fase exponencial</b>	Tasas de crecimiento óptimo, durante que números de celular doble en intervalos de tiempo discretos.
<b>Fase estacionaria</b>	Crecimiento y la muerte de las células de contrapeso entre sí dando por resultado ningún aumento neto en número de células. La tasa de crecimiento reducida es generalmente debido a una falta de nutrientes o acumulación de constituyentes de residuos tóxicos.
<b>Fase de muerte</b>	Tasa de mortalidad supera la tasa de crecimiento lo que resulta en una pérdida neta de células viables.

---

**Fuente:** IKNER, Luisa. Análisis de la curva de crecimiento bacteriano y sus aplicaciones ambientales. En: Universidad de Arizona [en línea]. 2019. [Consultado: 17 de marzo de 2019]. Disponible en <https://www.jove.com/science-education/10100/anlisis-de-la-curva-de-crecimiento-bacteriano-y-sus-aplicaciones?language=Spanish>

### 1.3 ANTIBIÓTICOS

Grupo heterogéneo de sustancias que se caracterizan por poseer diferente comportamiento farmacodinámico y farmacocinético, tienen como objetivo ejercer una acción específica dentro de alguna función o estructura de un microorganismo. De esta manera, su finalidad consiste en controlar y disminuir la cantidad de microorganismos viables, permitiéndole al sistema inmunológico eliminar la totalidad de estos. Pueden dividirse en: bactericidas, son aquellos fármacos capaces de general lisis celular gracias a su acción letal; y bacteriostáticos, los que logran inhibir el crecimiento y multiplicación de las bacterias sin destruir la célula<sup>20</sup>.

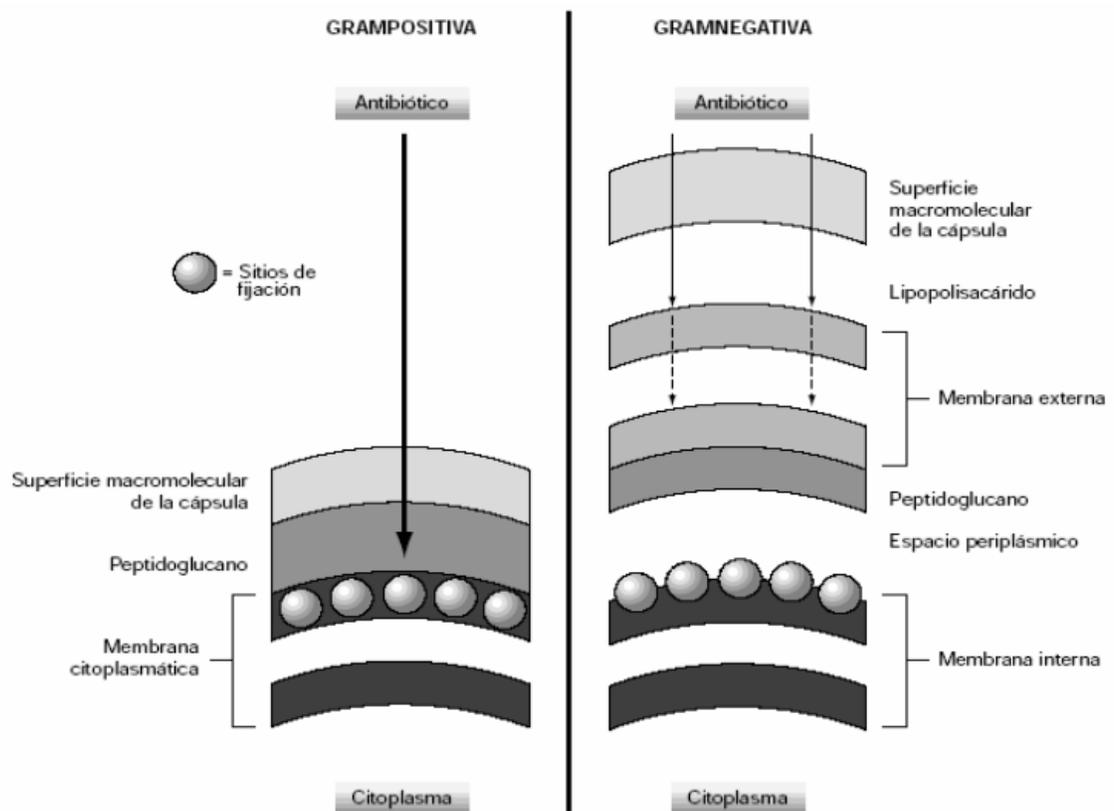
---

<sup>20</sup> VIGNOLI, R.; SEIJA, V. Principales grupos de antibióticos. 2008. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA34.pdf>

**1.3.1 Clasificación según farmacocinética y farmacodinamia.** La farmacocinética hace referencia a la absorción, distribución y eliminación características del antibiótico; por otro lado, la farmacodinamia que pretende comprender las relaciones existentes entre las drogas y sus efectos ya sean deseables o indeseables<sup>20</sup>.

**1.3.1.1 Betalactámicos.** Son un grupo de antibióticos de procedencia natural y semisintética, cuya característica principal consiste en poseer en su estructura un anillo betalactámico. Su mecanismo de acción bactericida es lento, y, actúan inhibiendo la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana. Pertenecen a la familia más numerosa de antimicrobianos y la más empleada en la práctica clínica<sup>20</sup>, el mecanismo de acción de los antibióticos betalactámicos se describe a continuación en la **Figura 4**:

**Figura 4.** Mecanismo de acción betalactámicos



**Fuente:** FAJARDO. Antimicrobianos betalactámicos. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <http://uvsfajardo.sld.cu/sites/uvsfajardo.sld.cu/files/betalactamicos.pdf>

El espectro de los betalactámicos abarca a bacterias Gram negativas, Gram positivas. Pueden ser clasificados en cuatro grupos: cefalosporinas, monobactámicos, penicilinas y carbapenemes<sup>20</sup>:

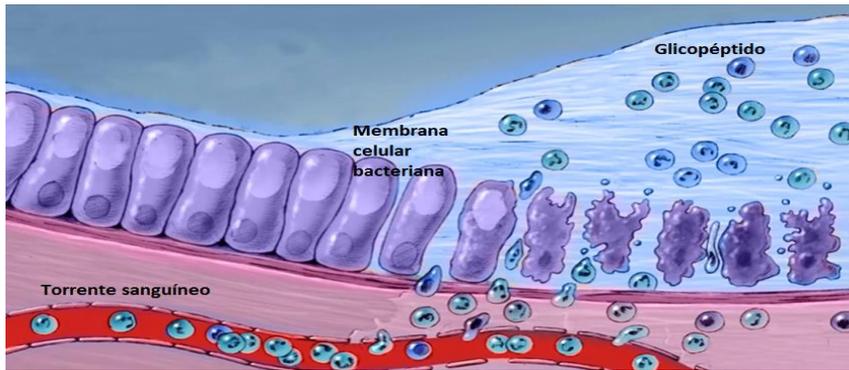
- **Cefalosporinas:** son un grupo de antibióticos de origen natural derivados de ciertos productos de la fermentación del *Cephalosporium acremonium*. Poseen un núcleo que se encuentra constituido por ácido 7-aminocefalosporánico formado por un anillo betalactámico unido a un anillo de dihidrotiazino. La alteración en su actividad antibacteriana es consecuencia de las modificaciones en la posición 7 del ácido 7-aminocefalosporánico y, por otro lado, los parámetros metabólicos del agente y su farmacocinética se ven afectados por sustituciones en la posición 3. Las cefalosporinas se definen en cuatro generaciones: la primera de ellas abarca cefadroxil, cefazolina, cefalexina y cefradina; la segunda se trata de cefuroxime; la tercera contiene cefotaxime, ceftriaxona, ceftazidime y cefoperazona; y finalmente, la cuarta incluye cefepime y ceftiprome<sup>20</sup>.
- **Monobactámicos:** para uso clínico, el monobactámico empleado se trata del Aztreonam, el cual se caracteriza por su excelente actividad sobre bacterias Gram negativas aerobias y facultativas, y no actúa frente a Gram positivos y bacterias anaerobias<sup>20</sup>.
- **Penicilinas:** son un grupo de antibióticos de procedencia natural y semisintético caracterizados por un núcleo de ácido 6-aminopenicilánico, el cual hace referencia a un anillo betalactámico unido a un anillo tiazolidínico. Las penicilinas se diferencian unas de otras gracias a sustituciones en la posición 6 del anillo, induciendo a modificaciones en la actividad antibacteriana<sup>20</sup>.
- **Carbapenemes:** son un grupo de antibióticos caracterizados por poseer un anillo azobicilo formado por la condensación de un anillo betalactámico unido a un anillo pirrolidínico de 5 miembros e insaturado. Los carbapenemes se diferencian por las sustituciones presentadas en las posiciones 1 y 2<sup>21</sup>.

**1.3.1.2 Glicopéptidos.** Son un grupo de antibióticos que inhiben la síntesis y el ensamblaje de la segunda etapa del peptidoglicano presente en la pared celular. En adición, tienen la capacidad de dañar los protoplastos generando alteraciones en la permeabilidad de la membrana citoplasmática y logran alterar la síntesis de ARN. Se caracterizan por su rápida y firme unión sobre las bacterias, ejerciendo su efecto bactericida sin necesidad de un periodo de incubación previo, este mecanismo solo se desarrolla en microorganismos que presenten multiplicación activa<sup>20</sup>, en la **Figura 5** se observa el mecanismo de acción:

---

<sup>21</sup> FRESNADILLO MARTÍNEZ, María José.; GARCÍA GARCÍA, María Inmaculada.; GARCÍA SÁNCHEZ, Enrique. & GARCÍA SÁNCHEZ, José Elías. Los carbapenems disponibles: propiedades y diferencias. En: *Facultad de Medicina, Universidad de Salamanca* [en línea]. 2010. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <https://www.elsevier.es/index.php?p=revista&pRevista=pdf-simple&pii=S0213005X10700318>

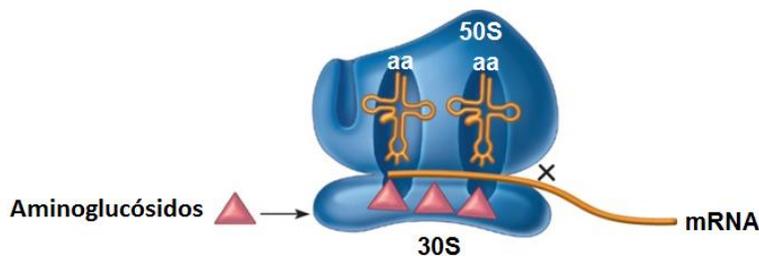
**Figura 5.** Mecanismo de acción glicopéptido



**Fuente:** URBAEZ, Gabriela. Glucopéptidos. 21 de abril de 2018. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <https://prezi.com/iqecjk0p8rxh/glucopeptidos/>

**1.3.1.3 Aminoglucósidos.** Son un grupo de antibióticos caracterizados por la presencia de dos o más aminoazúcares unidos por enlaces glucosídicos a un anillo aminociclitol. Se unen irreversiblemente a la subunidad 30S del ribosoma de la célula, por lo que logran interferir en la correcta lectura del código genético y, como consecuencia, generan el bloqueo de la síntesis proteica de la bacteria<sup>20</sup>, en la **Figura 6** se describe el mecanismo de acción de los antibióticos aminoglucósidos:

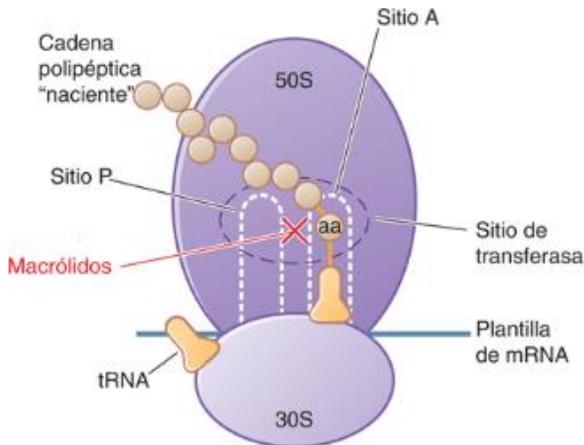
**Figura 6.** Mecanismo de acción aminoglucósidos



**Fuente:** RAYHAN, Asraful islam. Aminoglycosides Antibiotic's. 03 de junio de 2017. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <https://www.slideshare.net/RayhanPharmacy/aminoglycosides-antibiotics-76614521>

**1.3.1.4 Macrólidos.** Son un grupo de antibióticos cuyo mecanismo de acción se basa en la unión sobre la subunidad 50S del ARN ribosómico reversiblemente. Esta unión se da gracias a la generación de puentes de hidrógeno entre diferentes radicales hidroxilo del mismo y determinadas bases del ARNr, lo cual provoca el bloqueo en las reacciones de traslocación y transpeptidación<sup>20</sup>. La **Figura 7** muestra el mecanismo de acción de estos antibióticos:

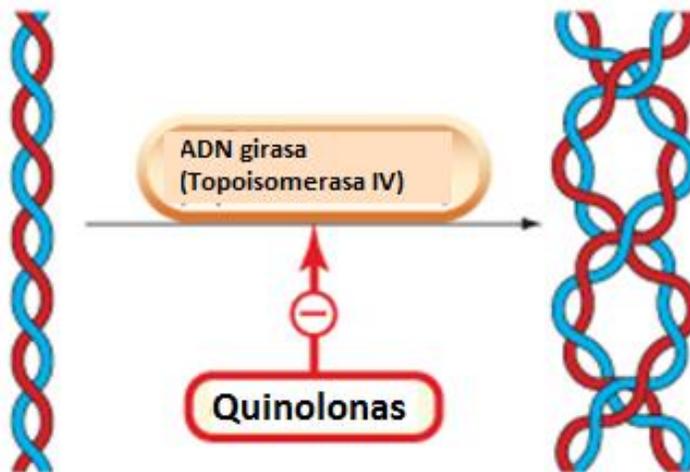
**Figura 7.** Mecanismo de acción macrólidos



**Fuente:** MACDOUGALL, C.; CHAMBERS, H. F. Capítulo 55: Inhibidores de la síntesis de proteínas y diversos antibacterianos. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1882&sectionid=138617077>

**1.3.1.5 Quinolonas.** Son un grupo de antibióticos bactericidas que interactúan con dos sitios diferentes que se relacionan entre sí al interior de la célula bacteriana: el ADN girasa, es la enzima clave que cataliza el superenrollamiento del ADN cromosómico asegurando la división celular de la bacteria, en el caso de Gram negativos; por otro lado, para Gram positivos, se trata de la topoisomerasa IV<sup>20</sup>.. a continuación, en la **Figura 8** se muestra el mecanismo de acción de las quinolonas:

**Figura 8.** Mecanismo de acción quinolonas

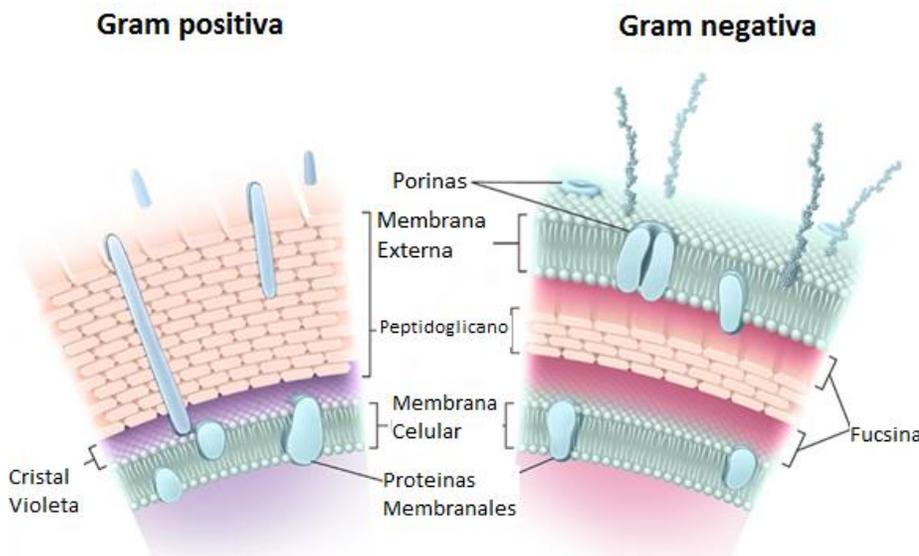


**Fuente:** EXAM. Quinolonas. En: *Farmacología del sistema nervioso vegetativo* [en línea]. 08 de junio de 2015. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <http://l.exam-10.com/biolog/2627/index.html?page=19>

## 1.4 TINCIÓN DE GRAM

La técnica de la tinción Gram consiste en un tipo de tinción diferencial que es empleado en microbiología, permite la diferenciación rápida y fácil de las bacterias según sus características morfológicas<sup>22</sup>. Gracias a las características estructurales de la pared celular que posea un organismo, se puede determinar si es Gram negativo o Gram positivo. Cuando el colorante cristal violeta logra penetrar la membrana celular para ambos casos, proporciona una coloración púrpura la cual perdura frente a la acción del decolorante (alcohol/acetona) para Gram positivos, en el caso de Gram negativos se decoloran gracias a que la capa delgada de peptidoglicano que estos poseen, en la cual difieren, no permite que los mismos retengan el complejo. Por el contrario, los Gram positivos poseen una multicapa de peptidoglicano en la cual el complejo queda adherido manteniendo la coloración púrpura. Finalmente, la coloración rosada que presentan los organismos Gram negativos se da gracias a la adición de fucsina con carga positiva<sup>23</sup>. Este fenómeno se describe con mayor claridad en la **Figura 9**:

**Figura 9.** Tinción Gram para bacterias Gram Positivas y Gram Negativas



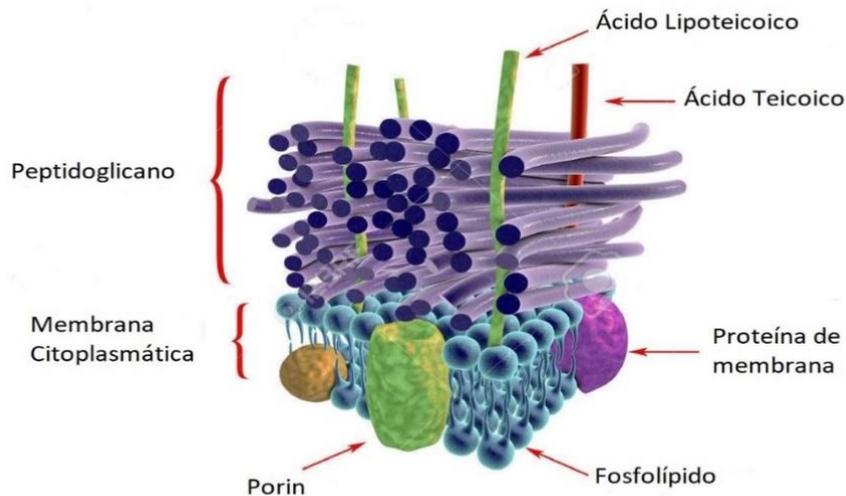
**Fuente:** LOGIES, Melissa. Gram positive vs. gram negative. En: *Scientific and Medical Illustration* [en línea]. 2017. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <https://www.melissalogies.com/scientific?lightbox=datapitem-j0g2ulps>

<sup>22</sup> MORA, Xavier. Diferenciando bacterias gram+ y gram -. En: *Selecciones Avícolas* [en línea]. Febrero 2012. [Consultado: 17 de marzo de 2019]. Disponible en <https://seleccionesavicolas.com/pdf-files/2012/2/6536-diferenciando-bacterias-gran-y-gram.pdf>

<sup>23</sup> LABORATORYINFO.COM. Tinción de Gram: Principio, Procedimiento, Interpretación y Animación. 19 de enero de 2019. [Consultado: 17 de marzo de 2019]. Disponible en <https://laboratoryinfo.com/gram-staining-principle-procedure-interpretation-and-animation/>

**1.4.1 Estructura de la pared de las bacterias Gram positivas.** Las bacterias Gram positivas se caracterizan por poseer una gruesa pared celular, esta se encuentra constituida principalmente por peptidoglicano, cubierta de proteínas. Además, estas células contienen también una gran cantidad de ácido teicoico: polisacáridos que se unen al ácido N-acetilmurámico o a los lípidos de la membrana plasmática. En este último caso, se denomina ácido lipoteicoico. De la misma manera, los ácidos teicoicos como los lipoteicoicos son responsables de la estabilización de la pared celular. En adición, los ácidos teicoicos poseen un rol en la virulencia de estos microorganismos, ya que actúan como antígenos de superficie que se unen a receptores específicos en las células del huésped<sup>15</sup>. Estas bacterias presentan resistencia frente a los antibióticos en tanto que han generado una variación genética que modifica la estructura de las proteínas propias de su pared celular, impidiendo que estos agentes antimicrobianos logren ligarse y, por lo tanto, actuar sobre estas bacterias, y logran alterar los sitios de acción propios del antibiótico que se emplea<sup>24</sup>. En la **Figura 10** se describe la estructura de una bacteria Gram positiva:

**Figura 10.** Estructura de la pared celular de las bacterias Gram Positivas



**Fuente:** KON, Kateryna. Structure of Gram-negative bacteria cell wall. En: *Dreamstime* [en línea]. 2000-2019. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en <https://www.dreamstime.com/stock-illustration-structure-gram-negative-bacteria-cell-wall-labeled-d-illustration-image84181743>

<sup>24</sup> ECHEVARRIA ZARATE, Juan; IGLESIAS QUILCA, David. Estafilococo Meticilino resistente, un problema actual en la emergencia de resistencia entre los Gram positivos. En: *Revista Médica Herediana* [en línea]. Octubre de 2003. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en [http://scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1018-130X2003000400008&script=sci\\_arttext](http://scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1018-130X2003000400008&script=sci_arttext)

**1.4.1.1 Staphylococcus aureus.** El género *Staphylococcus* está constituido por cocos Gram positivos, poseen un diámetro de 0,5 a 1,5  $\mu\text{m}$ , se encuentran agrupados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas. Se caracterizan por ser bacterias no móviles, no esporuladas, no poseen capsula, aunque existen algunas cepas que desarrollan una capsula de limo, son anaerobias facultativas. En su mayoría, los estafilococos producen catalasa: enzima capaz de descomponer el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) en agua ( $\text{H}_2\text{O}$ ) y oxígeno, así, las bacterias logran protegerse del efecto tóxico del  $\text{H}_2\text{O}_2$ , el cual se presenta como un producto final del metabolismo aerobio de los azúcares<sup>25</sup>; esta característica es utilizada para diferenciar el género *Staphylococcus* de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* que son catalogados como catalasa negativos<sup>11</sup>.

Se trata de una bacteria con capacidad de sobrevivir en condiciones adversas, logra colonizar fácilmente las superficies cutáneas e invade los tejidos, por esta razón, los cuadros clínicos que es posible encontrar más frecuentemente son ocasionados por este microorganismo y se resume en infecciones de piel, anexos cutáneos y tejidos blandos, otitis, osteomielitis, artritis, neumonía y sepsis; en el estudio realizado por Orjuela, se encontró que la infección más frecuente manifestada por este patógeno se presenta en piel y tejidos blandos (39,06%), seguida de osteomielitis (20,31%) y finalmente, bacteriemia (17%)<sup>26</sup>.

El pronóstico de las infecciones generadas por *Staphylococcus aureus* logró una variación sustancial con la introducción de la penicilina, pero pronto se aislaron cepas productoras de penicilinasas: su propagación se vio favorecida por la transmisión por plásmidos de esta resistencia, siendo actualmente, más del 90% de las cepas, tanto extra como intrahospitalarias, presentando resistencia a este mecanismo. La aparición de meticilina y otras penicilinas y cefalosporinas resistentes a penicilinasas, logró resolver el problema temporalmente, posteriormente, empezaron a aparecer cepas meticilin-resistentes, que, a nivel clínico, son asociadas también con resistencia a múltiples antibióticos (penicilinas, cefalosporinas, macrólidos, lincosamidas, aminoglucósidos y fluoroquinolonas), lo cual permite escasas alternativas terapéuticas<sup>27</sup>. A continuación, se puede observar la morfología de esta cepa bacteriana a través de la **Figura 11**:

---

<sup>25</sup> SEIJA, Verónica. Cocos gram positivos: Aspectos prácticos. En: *Higiene.edu* [en línea]. 2002. [Consultado: 30 de septiembre de 2019]. Disponible en <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2019.pdf>

<sup>26</sup> ORJUELA MATEUS, Laura. Caracterización de la infección por staphylococcus aureus en población pediátrica en infantes. En: *universidad colegio mayor de nuestra señora del rosario* [en línea]. Octubre de 2016. [Consultado: 30 de septiembre de 2019]. Disponible en <https://repository.urosario.edu.co/bitstream/handle/10336/12876/OrjuelaMateus-Laura-2017.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

<sup>27</sup> DAZA PÉREZ, R.M. Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. En: *Información terapéutica del Sistema Nacional de Salud* [en línea].

**Figura 11.** *Staphylococcus aureus*



**Fuente:** BROWER, Melissa. Staph. Aureus foodborne. En: *EcoLab* [en línea]. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en <https://www.ecolab.com/expertise-and-innovation/resources/microbial-risks/staph-aureus-foodborne>

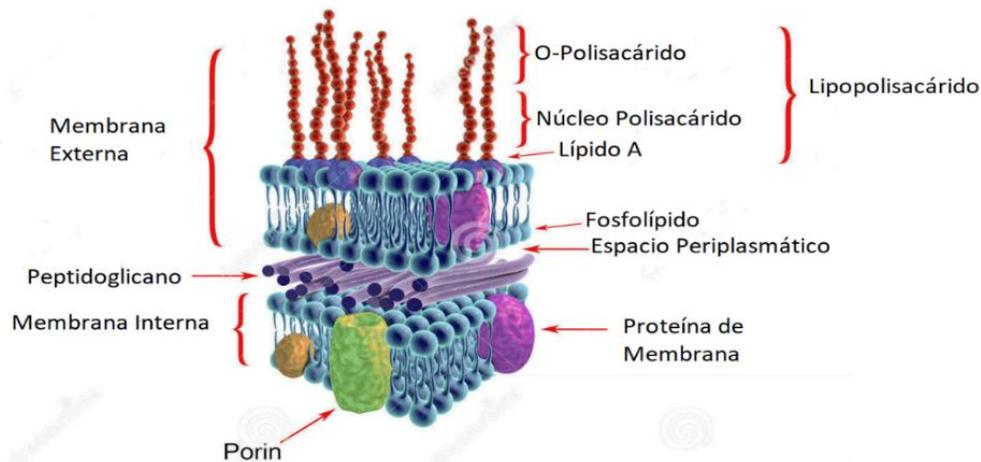
**1.4.2 Estructura de la pared celular de las bacterias Gram negativas.** La pared de las bacterias Gram negativas posee tres zonas: la membrana plasmática, el espacio periplásmico que incluye una fina capa de peptidoglicano y la membrana externa. Esta última, es característica exclusiva de las bacterias Gram negativas, se trata de una bicapa lipídica que se diferencia de otras membranas por su capa externa, que se encuentra conformada por una molécula anfipática: el lipopolisacárido (LPS) o endotoxina. Además del LPS, la membrana externa se constituye de fosfolípidos y proteínas que la unen al peptidoglicano. El LPS se encuentra dividido en tres partes: el lípido A, el polisacárido central y la cadena lateral O. Una de las funciones más importantes propias de la membrana externa, consiste en servir como barrera protectora. Además, evita o logra disminuir la entrada de sales biliares, antibióticos y otras sustancias tóxicas que podrían destruir o solo lesionar la bacteria. La membrana externa se caracteriza por ser más permeable que la plasmática y permite el pasaje de pequeñas moléculas como glucosa y otros monosacáridos, gracias a la presencia de proteínas transmembranales<sup>15</sup>. Las bacterias Gram negativas presentan resistencia frente a los antibióticos por medio de mecanismos como: modificación enzimática del antibiótico, generación de bombas de expulsión a través de las cuales captan el antibiótico y lo expulsan fuera de la célula, y, cambios en la permeabilidad de la membrana externa<sup>28</sup>. La **Figura 12** describe la estructura de la pared celular de las bacterias Gram negativas:

---

2001. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en <https://www.mscbs.gob.es/biblioPublic/publicaciones/docs/bacterias.pdf>

<sup>28</sup> TAFUR, José; TORRES, Julián; VILLEGAS, María Virginia. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias gram negativas. En: *Centro Internacional de Investigaciones Médicas* [en línea]. 15 de abril de 2008. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en [http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/apua-cuba/mecanismos\\_de\\_resistencia\\_a\\_los\\_antibioticos\\_en\\_bacterias\\_gram\\_negativas.pdf](http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/apua-cuba/mecanismos_de_resistencia_a_los_antibioticos_en_bacterias_gram_negativas.pdf)

**Figura 12.** Estructura de la pared celular de las bacterias Gram Negativas



**Fuente:** KON, Kateryna. Structure of Gram-negative bacteria cell wall. En: *Dreamstime* [en línea]. 2000-2019. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en <https://www.dreamstime.com/stock-illustration-structure-gram-negative-bacteria-cell-wall-labeled-d-illustration-image84181743>

**1.4.2.1** ***Escherichia coli***. se trata de un bacilo con forma de bastón que mide aproximadamente 2  $\mu\text{m}$  de largo y 0,5  $\mu\text{m}$  de diámetro. Esta bacteria pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, género *Escherichia*. Es una bacteria Gram negativa caracterizada por ser anaerobia facultativa, y generalmente, móvil gracias a la presencia de flagelos peritricos. No logra la formación de esporas<sup>29</sup>.

Esta bacteria logra colonizar el intestino del hombre al cabo de pocas horas de su nacimiento y es considerada como un microorganismo de flora normal, pero hay cepas que pueden ser catalogadas como patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, aquellas cepas de *Escherichia coli* causantes de diarrea son clasificadas en seis grupos: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica también conocidas como productoras de toxina Vero o toxina semejante a Shiga (EHEC o VTEC o STEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y adherencia difusa (DAEC)<sup>30</sup>.

<sup>29</sup> SUÁREZ ÁLVAREZ, María Elena. Caracterización de tipos patógenos de *Escherichia coli* y otros peligros biológicos asociados a la leche de cabra y productos derivados. En: *Universidad de León* [en línea]. 2014. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en [https://buleria.unileon.es/bitstream/handle/10612/3607/tesis\\_8d55c0.PDF?sequence=1](https://buleria.unileon.es/bitstream/handle/10612/3607/tesis_8d55c0.PDF?sequence=1)

<sup>30</sup> RODRÍGUEZ-ANGELES, Guadalupe M. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. 17 de abril de 2002. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en [http://www.adiveter.com/ftp\\_public/E.coli.pdf](http://www.adiveter.com/ftp_public/E.coli.pdf)

Sánchez, J., et al., exponen la resistencia in vitro de este patógeno a diversos antibióticos de uso frecuente: fosfomicina, nitrofurantoína, tobramicina, cefuroxima, cefixima, amoxicilina-clavulánico, cotrimoxazol, ciprofloxacino, norfloxacino y ampicilina<sup>31</sup>. En la **Figura 13** se muestra la morfología propia de la *Escherichia coli*:

**Figura 13.** *Escherichia coli*



**Fuente:** GRUPO BIOCOTE. Five Facts about E. coli. En: *Biocote* [en línea]. 27 de julio de 2017. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en <https://www.biocote.com/blog/five-facts-e-coli/>

## 1.5 PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD BACTERIANA

**1.5.1 Método Kirby Bauer.** El antibiograma consiste en depositar en la superficie de una caja de Petri que posee el agar Müeller Hinton previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes agentes bactericidas. En el momento en que el disco impregnado con el agente se pone en contacto con la superficie del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico se difunde en el agar, 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 interfase entre bacterias en crecimiento y bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se aproxima a la concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenida por métodos de dilución<sup>32</sup>.

---

<sup>31</sup> SÁNCHEZ MERINO José María, GUILLÁN MAQUIEIRA Cristina, FUSTER FOZ Carlos, LÓPEZ Ramiro, et al. Evolución de la resistencia a antibióticos de escherichia coli en muestras de orina procedentes de la comunidad. 2008. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en <http://scielo.isciii.es/pdf/urol/v61n7/02.pdf>

<sup>32</sup> PICAZO, Juan J. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. En: *Procedimientos en Microbiología Química* [en línea]. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia11.pdf>

**1.5.2 Método de dilución de caldo.** Este método consiste en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo (caldo o agar). La aparición de un sistema de inoculación múltiple para placas de agar popularizó el método de dilución en agar, en el que cada placa, con una respectiva concentración de antimicrobiano, permite inocular simultáneamente un gran número de microorganismos. La implementación de micropipetas y de placas de microtitulación facilitó la utilización del método de micro dilución con caldo; actualmente se han popularizado los métodos automatizados comerciales de micro dilución en caldo, fácilmente integrables en sistemas semi automáticos de lectura e interpretación de resultados, pero con el grave inconveniente del incremento en el coste. Comúnmente estos métodos se han venido empleando para la determinación de la CMI y la concentración mínima bactericida (CMB) de los antimicrobianos<sup>32</sup>.

## 1.6 MÉTODO SOL-GEL

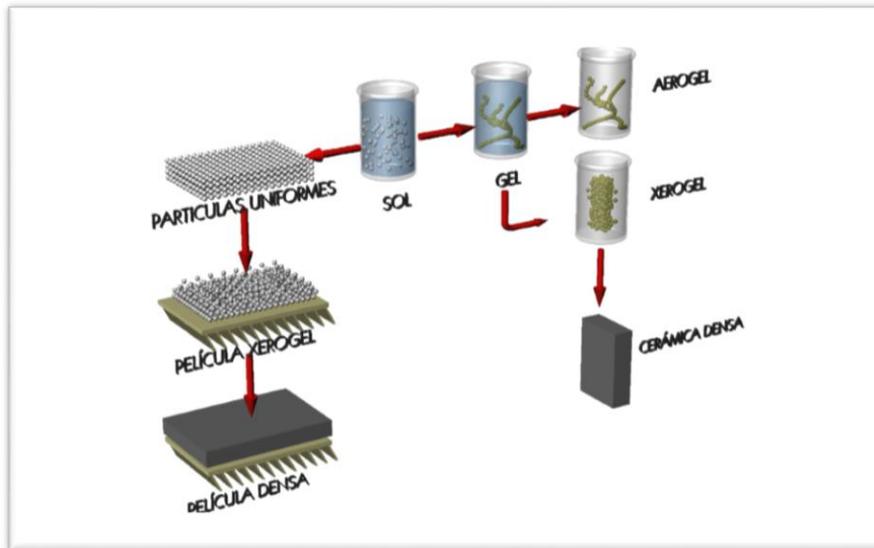
El método sol-gel se basa en un proceso químico que hace parte de la química húmeda, es ampliamente utilizado en ciencia de materiales para el desarrollo de materiales a medida. El método parte de una suspensión coloidal o sol que actúa como precursor de una red integrada, ya sea de partículas discretas o de una red polimérica. Los reactivos de partida más empleados son alcóxidos metálicos y cloruros, Los mismos pasan por reacciones sucesivas de hidrólisis y condensación en la cual se va generando la red 3D homogénea de los componentes que van generando la dispersión coloidal, la cual y luego de un proceso de envejecimiento de lugar a un gel. En general, los alcóxidos son muy sensibles a la humedad (se hidrolizan con facilidad), es por esta razón que la hidrólisis para la formación del gel es conducida en medio alcohólico de forma controlada, éste medio actúa como un disolvente común como lo es el alcohol es empleado generalmente como un agente homogeneizante<sup>33</sup>. El gel se produce cuando la concentración de la especie dispersa aumenta. El disolvente es atrapado en la red de partículas y así la red polimérica no permite que el disolvente se separe, y a su vez el disolvente previene que el colapso en una masa compacta. Al retirar el disolvente de la dispersión coloidal se genera un xerogel. Si el proceso de secado continua, se obtiene el material nanoestructurado final<sup>34</sup>. La **Figura 14** describe los principios básicos de esta metodología:

---

<sup>33</sup> RINCÓN O., R. J. Síntesis de cordierita mediante el método sol-gel. En: *Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia* [en línea]. 2002.

<sup>34</sup> ZANELLA, Rodolfo. Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño. En: *MundoNano* [en línea]. Junio de 2012. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en [https://www.researchgate.net/publication/325305624\\_Metodologias\\_para\\_la\\_sintesis\\_de\\_nanopartículas\\_controlando\\_forma\\_y\\_tamaño](https://www.researchgate.net/publication/325305624_Metodologias_para_la_sintesis_de_nanopartículas_controlando_forma_y_tamaño)

**Figura 14.** Método sol-gel.



**Fuente:** RINCÓN O., R. J. Síntesis de cordierita mediante el método sol-gel. En: *Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia* [en línea]. 2002.

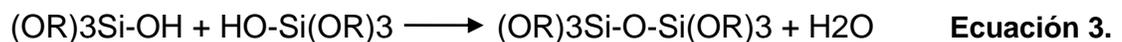
El TEOS (Tetraetoxisilano) y el MTES (metiltrietoxisilano), precursores de carácter orgánico e inorgánico respectivamente, permiten la formación de la red polimérica propia del sol de interés. Los procesos de hidrólisis, en los que se hidroxila al núcleo metaloide se muestra a continuación<sup>33</sup> en la **Ecuación 1**:



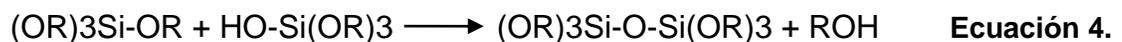
Como se puede observar en la **Ecuación 2**, dependiendo de la cantidad de agua y tipo de catalizador presente (toda vez que la hidrólisis puede ser catalizada por un medio ácido o uno básico), la hidrólisis puede completarse (todos los grupos OR s reemplazan por OH),



o detenerse, aun cuando el metaloide está parcialmente hidrolizado,  $\text{Si(OR)}_{4-n}(\text{OH})_n$ . De acuerdo con este mecanismo, dos moléculas hidrolizadas parcialmente pueden unirse en una reacción de condensación, como sigue:



Ó



La condensación libera una molécula pequeña, generalmente agua (**Ecuación 3**) o alcohol (**Ecuación 4**). De esta manera, a través de un proceso de polimerización este tipo de reacción prosigue con el fin de construir moléculas cada vez más grandes. Un *polímero* se trata de una molécula enorme formada a partir de cientos o miles de unidades denominadas monómeros, moléculas capaces de formar al menos dos enlaces. Un *oligómero* consiste en una molécula de tamaño intermedio, es decir, una molécula mucho más grande que un monómero, pero mucho más pequeña que un polímero<sup>33</sup>.

En el momento en que se encuentre una unidad polifuncional, las cadenas tienen la posibilidad de entrelazarse con el fin de formar una estructura tridimensional. Dado el caso en que un monómero pueda hacer más de dos enlaces, no habrá límite para el tamaño de molécula que se puede formar. Cuando un polímero alcanza un tamaño macroscópico, la sustancia es denominada “gel”<sup>33</sup>.

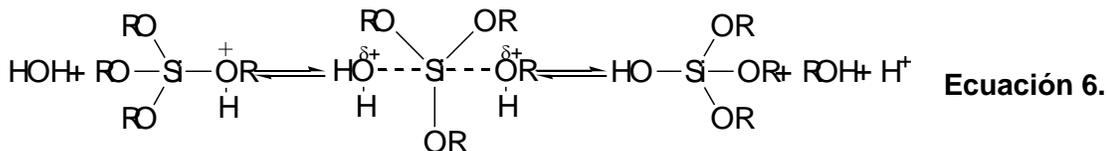
### 1.6.1 Hidrólisis y condensación.

**1.6.1.1 Hidrólisis.** La hidrólisis se da por el ataque nucleofílico del oxígeno contenido en el agua al átomo de silicio lo cual se evidencia en la reacción de agua isotópicamente marcada con teos, en la cual R son grupos etileno, la cual sólo es capaz de producir alcohol en sistemas catalizados por ácidos o por bases<sup>33</sup>, mecanismo descrito en la **Ecuación 5**:



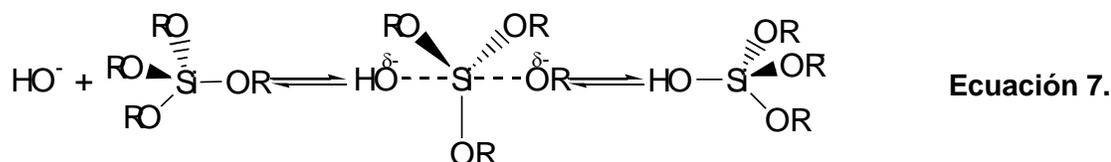
La hidrólisis se presenta con facilidad en presencia de agentes homogenizantes como lo son alcoholes, dioxano, THF, acetona, etc.

➤ **Hidrólisis catalizada por ácidos.** En primer lugar, un grupo alcóxido es protonado rápidamente al ser sometido a condiciones ácidas. El silicio se torna más electrofílico debido a que la densidad electrónica es apartada, por lo tanto, se hace más susceptible a un ataque por agua. Esta molécula de agua es atacada desde atrás adquiriendo una carga parcial positiva, y así, la carga positiva del alcóxido protonado se reduce otorgando al alcohol las características de un mejor grupo saliente. El desplazamiento del alcohol acompañado de una proporción del tetraedro de silicio ocasiona la descomposición del estado de transición<sup>33</sup>(ver **Ecuación 6**).



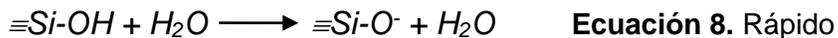
A través de este mecanismo, es posible obtener un incremento en la velocidad de hidrólisis con ayuda de sustituyentes cuya función se basa en reducir el efecto estérico alrededor del átomo de silicio, en adición, proveer electrones que proporcionen la estabilización de la carga positiva<sup>33</sup>.

➤ **Hidrólisis catalizada por bases.** En primer lugar, el agua logra disociarse produciendo aniones nucleofílicos hidroxilo de forma rápida. De esta manera, el hidroxilo ataca al átomo de silicio provocando una sustitución nucleofílica de orden dos en el momento en que el HO es capaz de desplazar a un grupo RO acompañado de una porción del tetraedro de silicio<sup>33</sup>, como se observa en la **Ecuación 7**.



Como ocurre en la hidrólisis catalizada por ácidos, se presentan efectos estéricos e inductivos que afectan la ocurrencia de este mecanismo; sin embargo, el efecto estérico se hace más importante ya que el silicio, en el estado de transición, adquiere una pequeña carga<sup>33</sup>.

➤ **Polimerización arriba de pH 7.** Arriba de pH 7, la polimerización ocurre por el mecanismo nucleofílico:



Sin embargo, gracias a que todas las especies condensadas se encuentran probablemente ionizadas y se repelen mutuamente, el crecimiento se da como consecuencia principalmente de la adición de monómeros a partículas más condensadas que por agregación de partículas. Dichas partículas poseen un diámetro 1 – 2 nm, son producidas en pocos minutos arriba de pH 7, el crecimiento de partículas primarias prosigue gracias al envejecimiento de Ostwald. Las partículas crecen rápidamente a un tamaño dependiente principalmente de la temperatura, ya que a mayores temperaturas se producen partículas de mayor tamaño debido a la mayor solubilidad de la sílica. De manera que, si el crecimiento ocurre por la disolución de partículas más pequeñas y deposición de sílica soluble

en partículas más grandes, la velocidad de crecimiento depende de la distribución de tamaño de partícula<sup>33</sup>.

## 1.7 ULTRASONIDO DE ALTA POTENCIA

El ultrasonido de alta potencia y baja frecuencia ofrece un alto potencial para los procesos químicos. Cuando son introducidas ondas ultrasónicas intensas sobre un medio líquido, se producen ciclos alternos de alta presión y baja presión con velocidades dependientes de la frecuencia. Los ciclos de alta presión significan compresión, mientras que los ciclos de baja presión significan la rarefacción del medio. A lo largo del ciclo de baja presión, el ultrasonido de alta potencia genera pequeñas burbujas de vacío en el líquido. Estas burbujas de vacío crecen durante varios ciclos. De acuerdo con la intensidad del ultrasonido, el líquido se comprime y estira en diversos grados<sup>35</sup>.

## 1.8 COPRECIPITACIÓN QUÍMICA

Método de síntesis de magnetita basado en el mezclado de sales  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  en una disolución acuosa, con un pH básico preferiblemente y una atmósfera inerte con temperatura elevada. Las características propias de las nanopartículas obtenidas por este método dependen en gran medida de las sales seleccionadas, la relación  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ , la fuerza iónica del medio, el pH de la disolución y finalmente, la temperatura de reacción<sup>36</sup>.

## 1.9 NANOMATERIALES

Son aquellos materiales originados de forma natural, accidental o fabricados que contenga partículas sueltas o una aglomeración generada por las mismas; en el cual, el 50% ó más de las partículas dentro de su estructura granulométrica, presente una o más dimensiones externas en el rango de tamaños que oscilan entre

---

<sup>35</sup> HIELSCHER. Efectos sonoquímicos en los procesos sol-gel. En: *Ultrasound Technology* [en línea]. 2019. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en <https://www.hielscher.com/es/sonochemical-effects-on-sol-gel-processes.htm>

<sup>36</sup> RODRÍGUEZ LÓPEZ, Aarón. Estudio de la síntesis y caracterización de nanopartículas de magnetita por métodos electroquímicos. En: *Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica* [en línea]. Noviembre de 2012. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <https://cideteq.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1021/91/1/Estudio%20de%20la%20s%C3%ADntesis%20y%20caracterizaci%C3%B3n%20de%20nanopart%C3%ADculas%20de%20magnetita%20por%20m%C3%A9todos%20electroqu%C3%ADmicos.pdf>

un nanómetro y 100 nanómetros<sup>37</sup>. Los materiales a escala nanométrica han sido reportados como excelentes materiales con propiedades particulares que no exhiben cuando se encuentran a escala micrométrica, como ejemplo de ello un metal noble como la plata ha mostrado propiedades tan particulares e importantes como la actividad microbicida<sup>38</sup>.

**1.9.1 Nanopartículas de Óxido de hierro.** Las partículas de óxidos de hierro han ganado un creciente interés en los campos de la nanociencia y nanotecnología debido a las propiedades fisicoquímicas nuevas y únicas que se obtienen de acuerdo a su tamaño de partícula (efecto de tamaño cuántico), morfología (esférica, cilíndrica, elipsoidales, etc) y forma ingenieril (película, nanocristales auto ensamblados, ferrofluidos, etc). Los óxidos presentan especial importancia debido a sus aplicaciones en pigmentos, mecanismos magnéticos, como agentes anticorrosivos, catalizadores y en procesos de tratamiento de aguas residuales; asimismo, son ampliamente estudiados debido a su bajo costo, color (se usan como colorantes en pigmentos y en pinturas), se emplean como materiales de pulido y no son tóxicos<sup>39</sup>.

**1.9.2 Nanopartículas de Plata.** La plata en un rango de tamaño nanométrico ha sido empleada en muchos productos de consumo como la industria cosmética, de textiles, de suplementos dietarios, alimentos empacados, etc, y desde hace varios años, el interés en esta tipología de materiales ha sido mayor debido a que exhiben propiedades importantes como la conductividad óptica, actividad catalítica y la propiedad relevante para la presente propuesta, su acción microbicida<sup>40</sup>.

**1.9.2.1 Mecanismo de acción de las AgNPs.** Se han reportado varios mecanismos moleculares que pueden ser los responsables de causar el daño a los

---

<sup>37</sup> INSHT. Seguridad y salud en el trabajo con nanomateriales. En: *Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo* [en línea]. Abril de 2015. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <https://www.icms.us-csic.es/sites/icms.us-csic.es/files/SST%20con%20nanomateriales.pdf>

<sup>38</sup> DURÁN, Nelsón; DURÁN, Marcela; BISPO DE JESÚS, Marcelo; SEABRA, Amedea B.; FÁVARO, Wagner J. & NAKAZATO, Gerson. Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. 16 de noviembre de 2015. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.11.016>

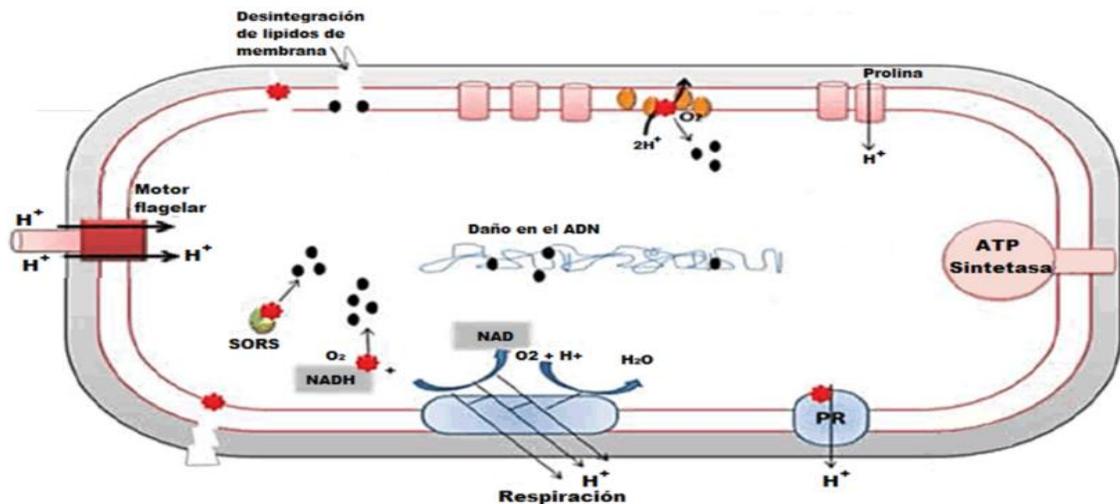
<sup>39</sup> ECHEVERRÍA, Jacqueline. CORREDOR Acuña & ECHEVERRÍA Félix. Síntesis de óxidos de hierro nanoparticulados. En: *Universidad Tecnológica de Pereira* [en línea]. Septiembre de 2007. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en [file:///C:/Users/Usuario/Downloads/Dialnet-SintesisDeOxidosDeHierroNanoparticulados-4802708%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Usuario/Downloads/Dialnet-SintesisDeOxidosDeHierroNanoparticulados-4802708%20(1).pdf)

<sup>40</sup> SIIM Küünal, SANDER Kutti, PROTIMA Rauwel, MITHU Guha, WRAGG David & ERWAN Rauwel. Biocidal properties study of silver nanoparticles used for application in green housing. En: *Springer* [en línea]. 07 de julio de 2016. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en <http://www.Springerlink.com>

microorganismos de manera directa produciendo captación de iones de plata libres por la célula microbiana gracias al daño directo en la permeabilidad de la membrana celular debido a la interacción que presentan las nanopartículas de plata con las proteínas presentes la cual logra inactivar sus funciones alterando su morfología.

Este fenómeno logra la interrupción de la producción de ATP en tanto que irrumpe los procesos vitales de la célula y, en adición, afecta en el proceso de replicación del ADN ya que este agente logra adherirse al mismo provocando la desnaturalización del ARN lo cual obstaculiza la replicación de las bacterias; por otro lado, como consecuencia del daño en la permeabilidad de la membrana celular se presentan fugas del contenido intracelular, debido al desacoplamiento del transporte de electrones dentro de la cadena respiratoria de la célula; además, la pérdida masiva de potasio intracelular gracias a la acción de estos agentes, origina la pérdida en la viabilidad de la célula; la generación de especies de oxígeno reactivo (ROS) que trae consigo el envejecimiento prematuro del microorganismo y las modificaciones morfológicas posterior a la exposición frente a las nanopartículas de plata son causales de muerte celular; afectando la actividad energética y procesos respiratorios de la célula bacteriana y generando una alteración directa de la membrana celular<sup>38</sup>. La **Figura 15** muestra el mecanismo de acción anteriormente descrito propio de las Nanopartículas de plata:

**Figura 15.** Mecanismo de acción de las Nanopartículas de plata.



**Fuente:** XU, Chen; XIAOQUAN, Huang; CHUPING, Zheng; YANAN, Liu; TAOYUAN, Xua; JIE, Liu. Preparation of different sized nano-silver loaded on functionalized graphene oxide with highly effective antibacterial properties. En: *Journal of Materials Chemistry B* [en línea]. 2015. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2015/tb/c5tb00280j/unauth#ldivAbstract>

## 1.10 CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES NANOESTRUCTURADOS

**1.10.1 Microscopía electrónica de barrido.** Es una técnica basada en el análisis superficial, que consiste en enfocar sobre una muestra un fino haz de electrones, acelerado con energías de excitación desde 0.1kV hasta 30kV y que permite la obtención de información morfológica, topográfica y composicional de las muestras produciendo imágenes de alta resolución (de hasta 3 nm). El haz de electrones es desplazado sobre la superficie de la muestra realizando un barrido que obedece a una trayectoria de líneas paralelas. La interacción del haz de electrones con la muestra genera diversas señales (electrones secundarios, electrones retrodispersados, emisión de rayos X, Getc.), que son recogidas por distintos detectores; los cuales permiten la observación, caracterización y microanálisis superficial de materiales tanto orgánicos como inorgánicos<sup>41</sup>.

**1.10.2 Espectrometría de dispersión de rayos X.** Los rayos X son producidos comúnmente a través del bombardeo con electrones de un blanco metálico dentro de un tubo al vacío. Cuando los electrones impactan en el ánodo, casi la totalidad de la energía cinética se disipa como calor, pero una pequeña proporción ocasiona fotones altamente energéticos o rayos X. La distribución energética de los fotones generados por frenado resulta ser continua, sin embargo, también son producidas unas líneas espectrales características del metal que constituye el ánodo. Estas líneas corresponden a transiciones o saltos de energía de los electrones dentro de las capas atómicas. De esta manera, al elegir convenientemente el elemento químico que compone el ánodo es posible obtener un fuerte flujo de fotones X a una energía específica, aun cuando el continuo de fondo se encuentre presente llegando hasta una energía máxima equivalente al voltaje aplicado al tubo<sup>42</sup>.

---

<sup>41</sup> UNIVERSIDAD DE LOS ANDES. Microscopía de Barrido de Electrones (MEB). [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en <https://investigaciones.uniandes.edu.co/microscopio-electronico-de-barrido-meb/>

<sup>42</sup> BAETTIG Ricardo, PERRÉ Patrick, RÉMOND Romain. Aplicación de espectrometría de rayos x para el estudio de la madera: algunos resultados iniciales. Enero de 2007. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en [https://www.researchgate.net/publication/242687615\\_APLICACION\\_DE\\_ESPECTROMETRIA\\_DE\\_RAYOS\\_X\\_PARA\\_EL\\_ESTUDIO\\_DE\\_LA\\_MADERA\\_ALGUNOS\\_RESULTADOS\\_INICIALES\\_X-RAYS\\_SPECTROMETRIC\\_METHODS\\_FOR\\_WOOD\\_PROPERTIES\\_DETERMINATION\\_SOME\\_INITIAL\\_RESULTS](https://www.researchgate.net/publication/242687615_APLICACION_DE_ESPECTROMETRIA_DE_RAYOS_X_PARA_EL_ESTUDIO_DE_LA_MADERA_ALGUNOS_RESULTADOS_INICIALES_X-RAYS_SPECTROMETRIC_METHODS_FOR_WOOD_PROPERTIES_DETERMINATION_SOME_INITIAL_RESULTS)

## 2. SÍNTESIS DE LOS NANOCOMPUESTOS DE PLATA IN SITU, SOPORTÁNDOLOS SOBRE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE HIERRO RECUBIERTAS POR ÓXIDO DE SILICIO

En este capítulo se van a describir los procesos necesarios para llevar a cabo la síntesis del nanocompuesto de plata que va a ser evaluado como agente biocida sobre las bacterias modelo *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Estos procesos se dividen en la síntesis de las nanopartículas de óxido de hierro (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) – NPIO por sonoquímica, la preparación del sol biocompatible de óxido de silicio encargado del recubrimiento de las NPIO asistido por ultrasonidos y síntesis de las nanopartículas de plata *in situ*, soportándolas sobre la superficie de óxido de silicio – AgNCs.

### 2.1 MATERIALES DE PARTIDA

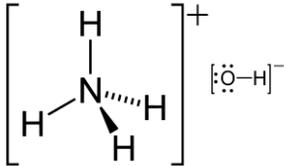
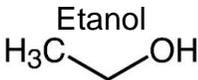
**Tabla 3.** Reactivos para la síntesis de AgNCs

Sustancia	Propiedades	Funcionalidad
<p>Cloruro Ferroso</p>	<p>El cloruro ferroso o cloruro de hierro (II), es un polvo o cristal parecido a la sal, de color pálido y verdoso. Punto de ebullición: 1023°C, Punto de fusión: 674°C, Densidad: 3162 kg/m<sup>3</sup>, Masa molar: 126,75 g/mol<sup>43</sup>.</p>	<p>Precursor de hierro para la síntesis de nanopartículas de óxido de hierro (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)</p>
<p>Cloruro Férrico</p>	<p>El cloruro de hierro III, es considerablemente volátil debido a que su enlace es covalente. Conforman cristales de tipo molecular laminar, por lo que se presenta en forma de escamas con brillo y coloración verdosa o púrpura según el ángulo desde el cual se mire. Punto de ebullición: 315°C, Punto de fusión: 37°C, Densidad: 2800 kg/m<sup>344</sup></p>	<p>Precursor de hierro para la síntesis de nanopartículas de óxido de hierro (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)</p>

<sup>43</sup> DCNE. Hoja informativa sobre sustancias peligrosas. En: *Departamento de salud y servicios con personas mayores de New Jersey* [en línea]. Marzo de 1998. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en <http://www.dcne.ugto.mx/Contenido/CCESH/Fichas%20Seguridad/Cloruro%20Ferroso.pdf>

<sup>44</sup> MÉNDEZ, Ángeles. Cloruro Férrico. En: *La guía Química* [en línea]. 27 de enero de 2014. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en <https://quimica.laguia2000.com/elementos-quimicos/cloruro-ferrico>

**Tabla 3.** (Continuación).

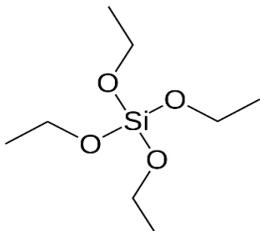
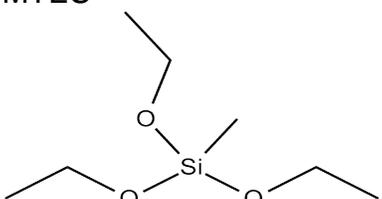
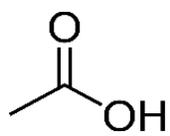
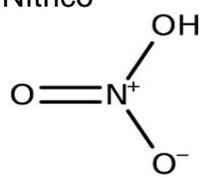
Sustancia	Propiedades	Funcionalidad
<p>Hidróxido de Amonio</p> 	<p>El hidróxido de amonio se trata de un líquido incoloro y de un olor muy intenso y agudo, que no es aislable. Punto de ebullición: 38°C, Peso molecular: 35,046 g/mol, Densidad: 0,90 g/cm<sup>345</sup></p> <p>MilliQ: Agua ultra pura, con grado de laboratorio que ha sido filtrada y purificada por ósmosis inversa, cuyo nombre se debe al tratamiento comercial patentado, parámetro 18,2 MΩ·cm<sup>46</sup>.</p>	<p>Agente estabilizante y de control de proceso de la síntesis de nanopartículas de óxido de hierro (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), regula el pH.</p> <p>Garantiza que las reacciones dentro de la síntesis se lleven a cabo, elimina residuos indeseados.</p>
<p>Agua</p>	<p>Destilada: es un tipo de agua tratada que carece de iones, como el cloro abundante en el agua de grifo. Además, está libre de impurezas, de sustancias disueltas, de microorganismos, y de otros elementos como barro y tierra<sup>45</sup>.</p>	<p>Agente estabilizante y de control de proceso de la síntesis del sol biocompatible de óxido de silicio</p>
<p>Etanol</p> 	<p>El alcohol etílico o etanol, es un compuesto químico orgánico de la clase de los alcoholes, se trata de un líquido incoloro, inflamable y además de ser una sustancia psicoactiva, como desinfectante y antiséptico, como fuente de combustible de combustión limpia, en la industria manufacturera o como solvente químico<sup>47</sup>.</p>	<p>Actúa como disolvente en la síntesis del sol biocompatible de óxido de silicio, forma parte de las reacciones de transesterificación al condensar el gel.</p>

<sup>45</sup> BOLÍVAR, Gabriel. Hidróxido de amonio: estructura, propiedades y usos. En: *Lifeder.com* [en línea]. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en [https://www.lifeder.com/hidroxido-de-amonio/#Peso\\_molecular](https://www.lifeder.com/hidroxido-de-amonio/#Peso_molecular)

<sup>46</sup> DEI. Agua Milli-Q. En: *Real Academia de Ingeniería* [en línea]. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en <http://diccionario.raing.es/es/lema/agua-milli-q>

<sup>47</sup> DÍAZ, Rafael. Alcohol Etílico: Fórmula, Propiedades, Riesgos y Usos. En: *Lifeder* [en línea]. Agosto de 2019. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en <https://www.lifeder.com/alcohol-etilico/>

**Tabla 3.** (Continuación).

Sustancia	Propiedades	Funcionalidad
<p>TEOS</p> 	<p>Tetraetoxisilano. Líquido incoloro con débil olor característico. Inflamable. Punto de ebullición: 165 – 166 °C, prácticamente insoluble en agua y miscible con alcohol<sup>48</sup>.</p>	<p>Precursor inorgánico necesario para formar la red polimérica del sol biocompatible de óxido de silicio.</p>
<p>MTES</p> 	<p>Trietoximetilsilano. Líquido incoloro de olor débil, reactivo de síntesis. Punto de ebullición: 142°C, Punto de inflamación: 33°C, Densidad: 0,89 g/cm<sup>3</sup>, Masa molar: 178,30 g/mol<sup>49</sup>.</p>	<p>Precursor orgánico necesario para formar la red polimérica del sol biocompatible de óxido de silicio.</p>
<p>Ácido Acético</p> 	<p>La apariencia del ácido acético es cristalina. Posee un punto de fusión de 16,6 °C y un punto de ebullición de 117,9 °C. Tiene además una densidad de 1049 kg/m<sup>3</sup>. Es un material inflamable y corrosivo a la vez<sup>50</sup>.</p>	<p>Cataliza al compuesto orgánico dentro de la síntesis del sol biocompatible de óxido de silicio.</p>
<p>Ácido Nítrico</p> 	<p>El Ácido Nítrico es un ácido fuerte, corrosivo y de vapores sofocantes. Es un líquido incoloro o amarillento, posee un olor irritante muy fuerte en concentraciones altas. Es completamente soluble en el agua<sup>51</sup>.</p>	<p>Acumulación del agua necesaria para el proceso de hidrólisis de la síntesis del sol biocompatible de óxido de silicio.</p>

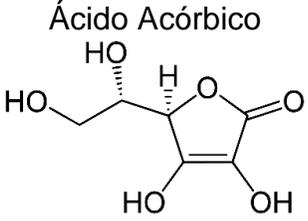
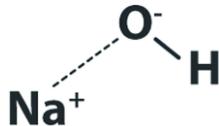
<sup>48</sup> PEÑA, Juan; CARDONA, Eliana; RIOS, Luis. Síntesis de óxidos de silicio de altas área superficial y porosidad. Noviembre de 2008. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en <http://www.scielo.org.co/pdf/dyna/v75n156/a20v75n156.pdf>

<sup>49</sup> MERCK. Trietoximetilsilano. 2019. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en [http://www.merckmillipore.com/CO/es/product/Triethoxymethylsilane,MDA\\_CHEM-818819](http://www.merckmillipore.com/CO/es/product/Triethoxymethylsilane,MDA_CHEM-818819)

<sup>50</sup> RAFFINO, María Estela. Concepto de Ácido Acético. 29 de agosto de 2019. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <https://concepto.de/acido-acetico/>

<sup>51</sup> UAB. Ácido Nítrico. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en [https://www.uab.cat/doc/DOC\\_RiscosLab13\\_DF\\_Guia\\_us\\_Acid\\_Nitric](https://www.uab.cat/doc/DOC_RiscosLab13_DF_Guia_us_Acid_Nitric)

**Tabla 3.** (Continuación).

Sustancia	Propiedades	Funcionalidad
<p>Citrato de Sodio</p> 	<p>El citrato de sodio dihidratado es inodoro y tiene un sabor fresco y salino. Un gramo es soluble en 1.5 ml de agua a 25°C y en 0.6 ml de agua hirviendo. Es insoluble en alcohol. La solución acuosa es ligeramente alcalina con un pH alrededor de 8.2<sup>52</sup>.</p>	<p>Agente estabilizante y de control de proceso en la síntesis de nanopartículas de plata.</p>
<p>Ácido Ascórbico</p> 	<p>El ácido ascórbico es un ácido de azúcar con propiedades antioxidantes. Su aspecto es de polvo o cristales de color blanco-amarillento. Es soluble en agua<sup>53</sup>.</p>	<p>Agente estabilizante y de control de proceso en la síntesis de nanopartículas de plata.</p>
<p>Hidróxido de Sodio</p> 	<p>El Hidróxido de Sodio es un sólido cristalino, blanco, sin olor. Es una sustancia muy corrosiva. Cuando se disuelve en agua o cuando se neutraliza con algún ácido libera gran cantidad de calor<sup>54</sup>.</p>	<p>Estabilizador de pH en la síntesis de nanopartículas de plata.</p>

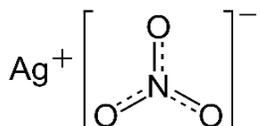
<sup>52</sup> QUIMINET. Usos y aplicaciones del citrato de sodio. En: *QuimiNet.com* [en línea]. 02 de mayo de 2012. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en <https://www.quiminet.com/articulos/usos-y-aplicaciones-del-citrato-de-sodio-2722645.htm>

<sup>53</sup> PÉREZ, G. Ácido Ascórbico. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en <https://www.acidoascorbico.com/>

<sup>54</sup> UAB. Hidróxido de Sodio. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <http://documentacion.ideam.gov.co/openbiblio/bvirtual/018903/Links/Guia17.pdf>

**Tabla 3.** (Continuación).

Sustancia	Propiedades	Funcionalidad
Nitrato de Plata	El nitrato de plata sólido incoloro e inoloro, Densidad: 4,35 gr/ml, Punto de descomposición: 212 °C, Solubilidad en agua: 2160 g/l (20 °C), Masa molar: 169.87 g/mol <sup>55</sup> .	Precursor de plata en la síntesis de nanopartículas de plata.



**Fuente:** elaboración propia.

## 2.2 EQUIPOS

**Tabla 4.** Equipos para la síntesis de AgNCs

Nombre	Función
Ultrasonido <b>Figura 16.</b> Ultrasonido	La energía eléctrica de alta frecuencia es proporcionada por un generador de ultrasonidos y convertida en energía mecánica con ayuda de unos sistemas oscilantes piezoeléctricos para transferirse al líquido del baño de limpieza. A lo largo de este proceso, se forman flujos de líquido altamente energéticos cuyo fin es eliminar las partículas de suciedad de las piezas que se deben limpiar <sup>56</sup> .



**Fuente:** ELMA. Elmasonic S 30 H. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en [https://www.elma-ultrasonic.com/fileadmin/downloads/Produktprofile/Produktprofile\\_ES/Ultraschallgeraete/Elmasonic\\_S/PP\\_Elmasonic\\_S30H\\_ES.pdf](https://www.elma-ultrasonic.com/fileadmin/downloads/Produktprofile/Produktprofile_ES/Ultraschallgeraete/Elmasonic_S/PP_Elmasonic_S30H_ES.pdf)

<sup>55</sup> SALUDCAPITAL. Nitrato de Plata. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en [http://biblioteca.saludcapital.gov.co/img\\_upload/57c59a889ca266ee6533c26f970cb14a/Nitrato\\_de\\_Plata.pdf](http://biblioteca.saludcapital.gov.co/img_upload/57c59a889ca266ee6533c26f970cb14a/Nitrato_de_Plata.pdf)

<sup>56</sup> KOLPINGSTR., Elma GmbH & Co KG. Elmasonic P. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en [https://www.dt-shop.com/fileadmin/media/ga/51805\\_ga\\_esp.pdf](https://www.dt-shop.com/fileadmin/media/ga/51805_ga_esp.pdf)

**Tabla 4.** (Continuación)

Nombre	Función
<p>Centrifuga</p> <p><b>Figura 17.</b> Centrifuga</p>  <p><b>Fuente:</b> elaboración propia.</p>	<p>La Centrifugación permite separar sólidos de líquidos (o diferentes líquidos de densidades distintas) mediante la aplicación de una fuerza centrífuga sostenida. Esto es, una fuerza producida por rotación para impeler la materia hacia afuera del centro de rotación. Obliga a la mezcla a experimentar un movimiento rotatorio con una fuerza de mayor intensidad que la fuerza gravitacional, provocando la sedimentación del sólido o de las partículas de mayor densidad<sup>57</sup>.</p>

Horno de secado

**Figura 18.** Horno de secado



**Fuente:** THERMO SCIENTIFIC. Horno de secado / de calor / tratamiento térmico / de cámara. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <https://www.directindustry.es/prod/thermo-scientific-laboratory-equipment/product-21327-567979.html>

Horno de secado, tratamiento térmico por calor, fuente de calor: eléctrica, configuración: de cámara<sup>58</sup>.

---

<sup>57</sup> DITECSA. Funcionamiento de la centrifugación y aplicación en limpiezas de tanques de crudo. En: *Soluciones industriales y medioambientales* [en línea]. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <http://www.grupoditecsa.com/es/funcionamiento-de-la-centrifugacion-y-aplicacion-en-limpiezas-de-tanques-de-crudo/>

<sup>58</sup> THERMO SCIENTIFIC. Horno de secado / de calor / tratamiento térmico / de cámara. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <https://www.directindustry.es/prod/thermo-scientific-laboratory-equipment/product-21327-567979.html>

**Tabla 4.** (Continuación)

Nombre	Función
Agitador digital de placa de cerámica	

**Figura 19.** Agitador digital de placa de cerámica



**Fuente:** FISHER SCIENTIFIC. Thermo Scientific™ Serie de placas calefactoras SuperNuova+™. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <https://www.fishersci.es/shop/products/supernuova-hotplate-series/p-6367017>

El agitador digital de placa cerámica consiste en un mecanismo magnético capaz de agitar líquidos. El cual puede usarse de manera simultánea o por separado con el sistema de calentamiento<sup>59</sup>.

## pHmetro

**Figura 20.** pHmetro



**Fuente:** CH-SISTEMAS. pH-Metro de Alta Precisión – Termómetro – Kit, CHP-810. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <https://chsisistemas.com/producto/ph-metro-de-alta-precision/>

Un pHmetro o medidor de pH es un instrumento científico que mide la actividad del ion hidrógeno en soluciones acuosas, indicando su grado de acidez o alcalinidad expresada como pH<sup>60</sup>.

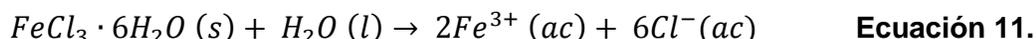
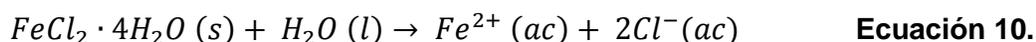
**Fuente:** elaboración propia.

<sup>59</sup> OVALLE, William. ¿Para qué sirve la Plancha de Calentamiento? En: *Acequilabs* [en línea]. 2019. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <https://acequilabs.com.co/blog/guias-de-uso/para-que-sirve-la-plancha-de-calentamiento/>

<sup>60</sup> TP. pHmetro (Medidor de pH). En: *Portal de Contenidos Educativos de Química General y Laboratorio Químico* [en línea]. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <https://www.tplaboratorioquimico.com/laboratorio-quimico/materiales-e-instrumentos-de-un-laboratorio-quimico/phmetro.html>

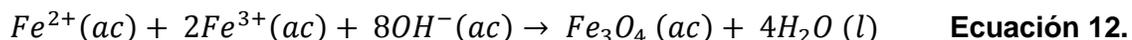
### 2.3 SÍNTESIS DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE HIERRO (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) – NPIO POR SONOQUÍMICA

En un reactor con cuatro bocas de 250 ml, se adicionan cloruro ferroso (FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O) y cloruro férrico (FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O) en proporción 1:2 respectivamente. Se lleva a cabo el proceso de coprecipitación química en una disolución en agua Milli-Q, con el fin de homogeneizar completamente la mezcla y permitir la disociación de los iones Fe<sup>2+</sup> y Fe<sup>3+</sup>, reacciones químicas de disociación en las cuales se logran obtener los iones férrico y ferroso deseados, y, en adición, iones de cloro libres, mecanismo que se describen a continuación (ver **Ecuación 10** y **Ecuación 11**):

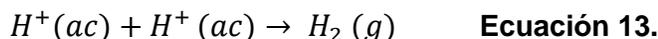


Se emplea agua milliQ buscando que los compuestos anteriormente mencionados precipiten, logrando la disociación deseada y, en adición, se someten a ultrasonidos a 20 kHz con el fin de garantizar una dispersión total de los mismos y con ayuda del burbujeo que este procedimiento genera, se garantiza el tamaño nano que es requerido para esta metodología.

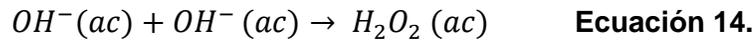
El proceso de coprecipitación química que se presenta, tiene como objetivo precipitar las sales variando algún parámetro, en este caso, el parámetro seleccionado fue el pH, ya que el óptimo para la síntesis debe oscilar entre los 10, es decir, un pH básico. De esta manera, el reactivo empleado para regular el pH se trata del hidróxido de amonio (NH<sub>4</sub>OH) al 30%, el cual es adicionado gota a gota en tanto que se busca una variación regulada en vez de una drástica; además, del mismo se aprovechan los iones OH<sup>-</sup> que posee con el fin de obtener el óxido de hierro mixto que se desea (ver **Ecuación 12**):



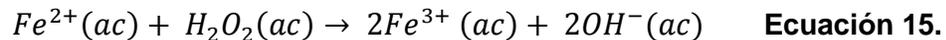
El proceso de coprecipitación se caracteriza por presentar un bajo rendimiento al obtener el producto de interés, por lo cual fue necesario asistirlo con ultrasonidos a 20 kHz gracias a que este procedimiento ayuda a que el agua presente en el hidróxido de amonio correspondiente al 70%, sea capaz de disociarse en iones H<sup>+</sup> y OH<sup>-</sup>. Asimismo, por esta disociación se presentan dos reacciones, la primera de ellas no resulta de interés, en la cual los iones libres de hidrógeno reaccionan entre si generando hidrógeno en su estado molecular, como se puede observar en la **Ecuación 13**:



Por el contrario, como se evidencia en la **Ecuación 14**, se presenta la formación de peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) a partir de la reacción entre los iones de hidróxido:



El cual facilita la oxidación de los iones  $Fe^{2+}$  en iones  $Fe^{3+}$  requeridos en la producción del óxido de hierro mixto de interés, evidente en la **Ecuación 12**. De esta manera se presenta la oxidación anteriormente descrita en la **Ecuación 15**:



Como se puede observar, el proceso se lleva a cabo en medio acuoso por lo que es posible realizar el correspondiente lavado con el fin de obtener las nanopartículas de hierro libres de sales y otros iones indeseados dentro de la disolución. Para este lavado se emplea agua milli-Q, siendo ideal para completar el proceso de síntesis; se realiza una centrifugación a 10.000 rpm durante 15 minutos, se retira el sobrenadante y se adiciona agua milli-Q, este procedimiento se repite una vez más para garantizar el cumplimiento del propósito deseado: lavar correctamente las nanopartículas de hierro.

## 2.4 PROTECCIÓN DE LAS NPIO DE LA CORROSIÓN MEDIANTE UN RECUBRIMIENTO BIOCOMPATIBLE DE ÓXIDO DE SILICIO ASISTIDO POR ULTRASONIDOS

A partir de la síntesis de las nanopartículas de óxido de hierro ( $Fe_3O_4$ ) – NPIO por sonoquímica se procede a realizar la preparación del sol biocompatible de óxido de silicio encargado de proteger las nanopartículas mencionadas de la corrosión por lo cual se describe el procedimiento necesario asistido por ultrasonidos.

**2.4.1 Preparación del sol.** Se tienen etanol ( $C_2H_5OH$ ), TEOS ( $SiC_8H_{20}O_4$ ), MTES ( $(C_2H_5O)_3SiCH_3$ ), ácido acético ( $CH_3COOH$ ) y agua acidulada compuesta por ácido nítrico ( $HNO_3$ ) y agua ( $H_2O$ ): Estos reactivos son adicionados gota a gota en un reactor con cuatro bocas de 250 ml en un baño de ultrasonidos a 20 kHz. El montaje requerido para llevar a cabo este proceso se muestra a continuación en la **Figura 21**:

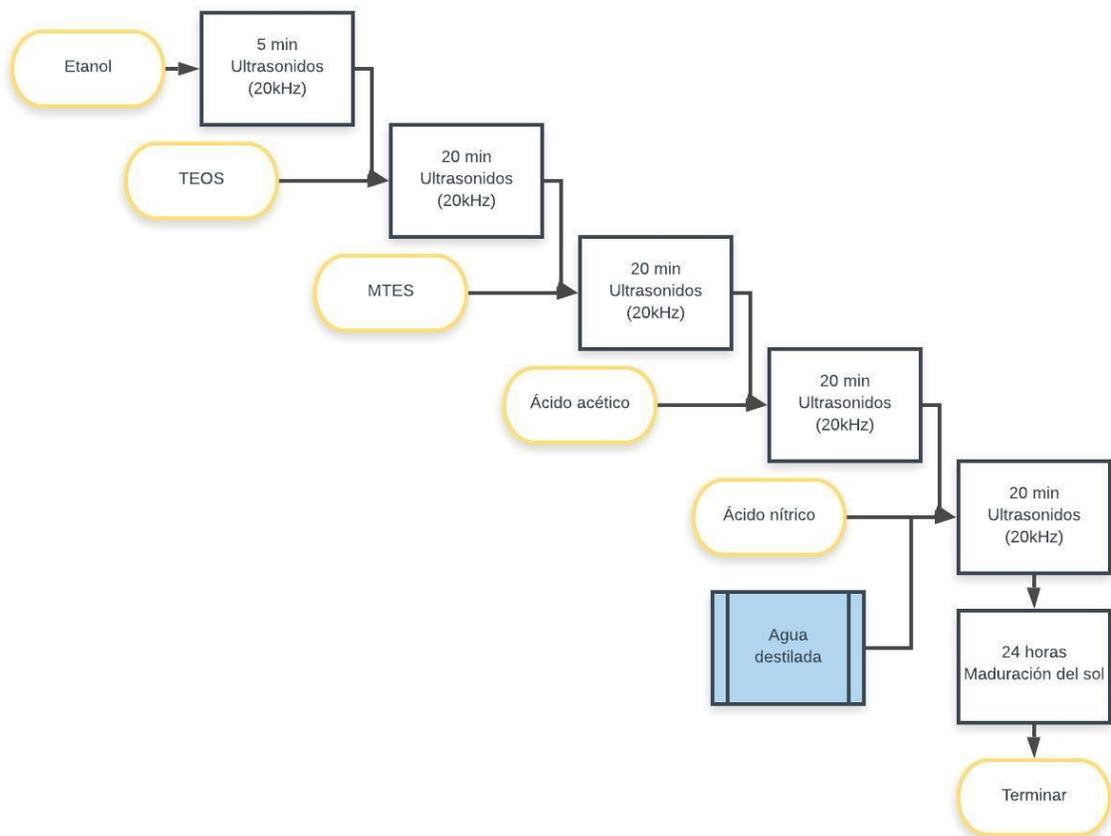
**Figura 21.** Montaje para la preparación del sol



**Fuente:** elaboración propia.

Inicialmente, se adiciona el etanol y se somete a ultrasonidos durante 2 min., de modo que se sature la atmosfera con el alcohol para continuar con el proceso de preparación del sol. Posteriormente, se adiciona el TEOS ( $\text{SiC}_8\text{H}_{20}\text{O}_4$ ) gota a gota y es sometido junto con el etanol a ultrasonidos durante 20 minutos; de la misma manera, se procede con los demás reactivos hasta obtener una mezcla totalmente homogénea. Este proceso emplea un precursor inorgánico y uno orgánico para el  $\text{SiO}_2$  con los cuales es posible la formación de una red intercalada del polímero, el cual va a ser empleado como precursor del óxido de silicio que recubrirá las nanopartículas de hierro sintetizadas previamente, de esta manera, se obtiene el mismo en una suspensión coloidal denominada sol. La modificación superficial tiene lugar en el horno de secado a una presión reducida durante 60 minutos a  $55^\circ\text{C}$  para luego someterle a un proceso de maduración durante 24 horas con el fin de garantizar un proceso de policondensación extensivo (ver **Figura 22**):

**Figura 22.** Preparación del sol



**Fuente:** elaboración propia.

El sol preparado previamente, como se describe anteriormente en la sección 1.6 del marco teórico, es susceptible a la humedad, por tal razón se cambia el disolvente acuoso de las nanopartículas de hierro a uno alcohólico, con el fin de evitar la precipitación del óxido de silicio ( $\text{SiO}_2$ ); de esta manera, es necesario repetir el proceso de lavado realizado previamente para las nanopartículas de hierro pero esta vez se emplea alcohol isopropílico (IPA) como agente de limpieza en el cual las nanopartículas van a estar posteriormente disueltas, de igual forma, el proceso se lleva a cabo dos veces para garantizar el correcto cambio de medio en las mismas.

Posteriormente, se adicionan las nanopartículas de plata junto con 60 ml de alcohol isopropílico en un reactor con cuatro bocas de 250 ml en un baño de ultrasonidos a 20 kHz durante 5 minutos, se adiciona el surfactante cuya finalidad es reducir la tensión superficial presente en la suspensión, estabilizando la misma y finalmente, son adicionados 60 ml del sol preparado previamente asistido por ultrasonidos a 20 kHz durante 15 minutos, luego llevado al horno de secado a una presión reducida durante 60 minutos a  $55^\circ\text{C}$ , proceso que garantiza la formación de la capa de óxido

de silicio ( $\text{SiO}_2$ ) biocompatible que tiene como función recubrir las NPIO protegiéndoles de procesos de oxidación posteriores.

Finalmente, las partículas obtenidas son separadas de la dispersión madre por la interacción de ésta con un campo magnético (ver **Figura 23**):

**Figura 23.** Separación magnética



**Fuente:** elaboración propia.

## 2.5 SÍNTESIS DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA IN SITU, SOPORTÁNDOLAS SOBRE LA SUPERFICIE DE ÓXIDO DE SILICIO – AGNCS

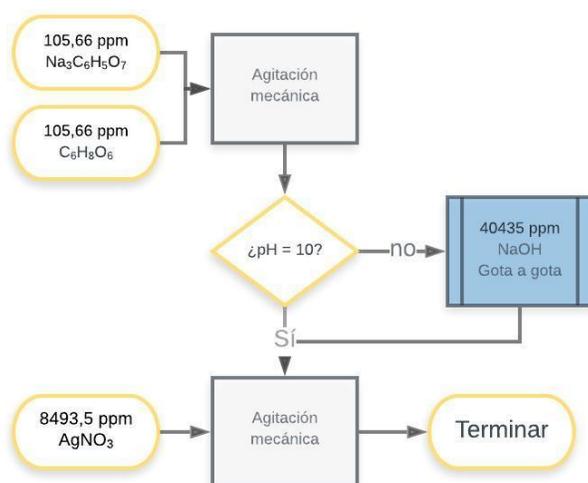
La síntesis de las nanopartículas de plata requiere la dilución de los reactivos empleados como lo son citrato de sodio ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ), ácido ascórbico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ), hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ) y nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ), por lo cual para cada caso se lleva el respectivo reactivo a un balón aforado y con ayuda de un embudo, el mismo es adicionado en estado sólido y se lleva al aforo con agua destilada.

Posteriormente, sobre una plancha de calentamiento y agitación es llevado un vaso precipitado de 250 ml, sobre el cual se adicionan el citrato de sodio ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) y el ácido ascórbico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ), de esta manera, se realiza la medición del pH de la mezcla ya que, para poder adicionar el nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ), es necesario un pH cercano a 11.

El pH resultante al adicionar estos reactivos oscila entre 5-6 por lo que es necesario adicionar un regulador del mismo, en este caso se emplea hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ) con una concentración de 0,1M y se adiciona gota a gota hasta alcanzar un pH de 11. Se procede a adicionar el nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ): El nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) posee iones  $\text{Ag}^+$ , razón por la cual se emplea un agente reductor

( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ). En adición, el ácido ascórbico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ) funciona como un estabilizante del proceso. De esta manera, se obtienen las nanopartículas de plata que van a ser empleadas en la síntesis del nanocompuesto. El proceso anteriormente descrito se evidencia con mayor claridad en la **Figura 24**:

**Figura 24.** Síntesis de nanopartículas de plata



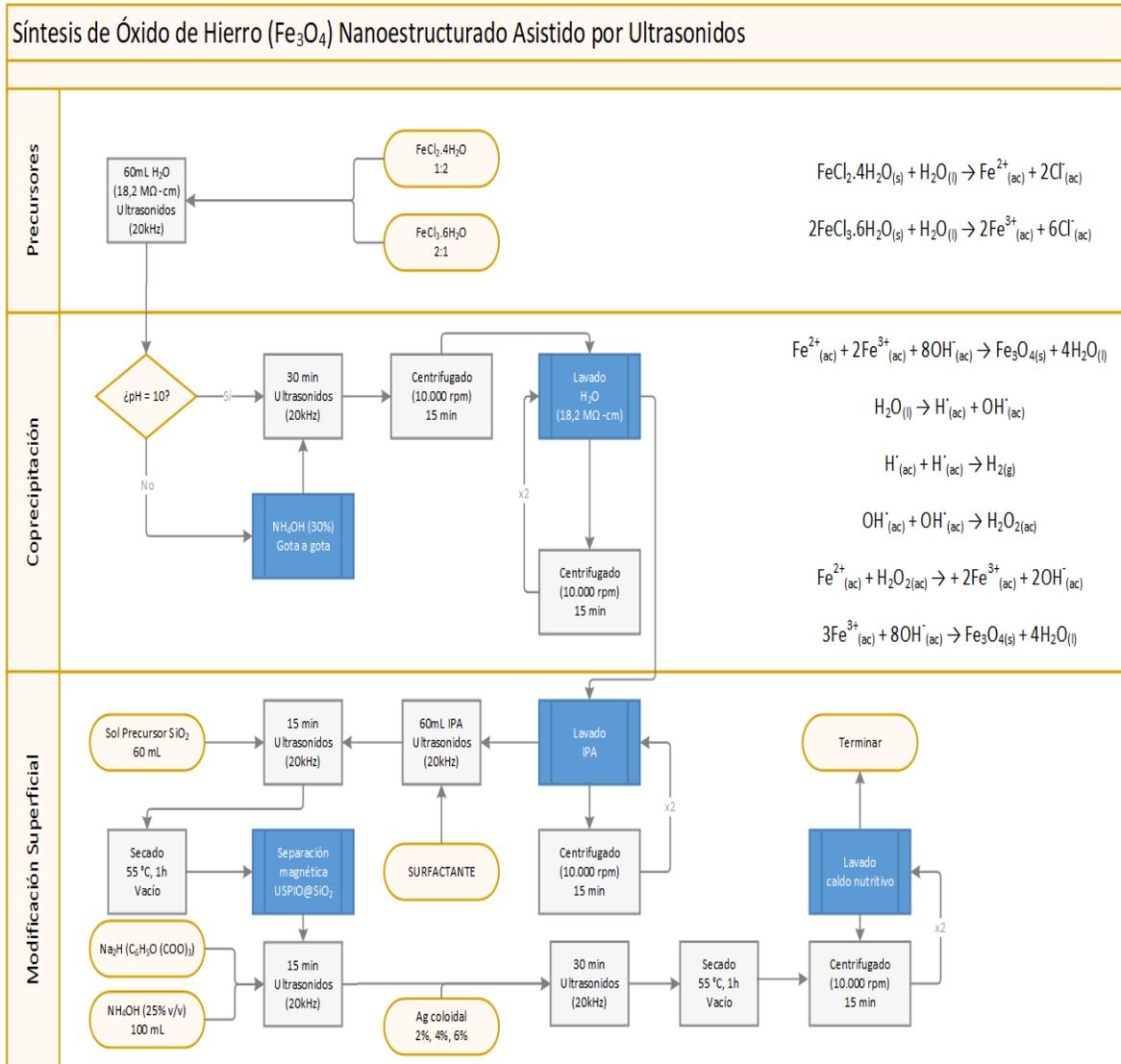
**Fuente:** elaboración propia.

Finalmente, se toman las nanopartículas de hierro recubiertas por óxido de silicio y se suspenden en 100 ml de hidróxido de amonio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) para que en su superficie halla la mayor cantidad de grupos hidroxilo disponibles, posteriormente se toman 324 mg de citrato de sodio, se somete a ultrasonidos a 20 kHz durante 15 minutos con el fin de dispersar bien la dispersión previo a la adición de las AgNPs cuya carga oscilará de 2%, 4% y 6% con base en las NPIO. Con el fin de ligar las AgNPs a la superficie hidroxilada de las NPIO funcionalizadas con  $\text{SiO}_2$ , se somete la mezcla a ultrasonidos a 20 kHz durante 15 minutos para finalmente llevarlas al horno de secado durante 30 minutos a  $55^\circ\text{C}$  a presión reducida.

Por otro lado, ya que las cepas bacterianas a estudiar se encuentran en caldo nutritivo, y se pretende no alterar dicho sistema para evitar estrés sobre las células bacterianas, se hace necesario un último lavado del AgNC para preparar una dilución con el caldo nutritivo en el que la concentración de las AgNCs, con base en las NPIO sea del 0,63% (m/v). Luego de cada lavado con agua milliQ, se retira el sobrenadante por centrifugación a 10.000 rpm durante 15 minutos, para finalmente tener el nanocompuesto diluido en caldo nutritivo.

La **Figura 25** reúne en su totalidad el proceso de síntesis del nanocompuesto de plata que se va a evaluar como agente biocida frente a las cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*:

**Figura 25.** Síntesis del nanocompuesto de plata



**Fuente:** elaboración propia.

La cantidad de plata adicionada para alcanzar los respectivos porcentajes (2%, 4% y 6%) a evaluar, depende directamente de la cantidad de nanopartículas de óxido de hierro empleada, esta ha sido evaluada con anterioridad por el Semillero de investigación de nanomateriales de la Universidad Antonio Nariño, y se establece que el valor límite corresponde a 0,63g, cantidad que las cepas bacterianas a estudiar logran tolerar en tanto que el estrés que este les genera no logra afectar procesos vitales para estos microorganismos. Asimismo, se identifica la concentración a la cual se encuentran las nanopartículas (ver **Ecuación 16**):

$$\frac{0,63g \text{ de NPIO}}{100 \text{ mL de disolución}} \times 100\% = 0,63\% \quad \text{Ecuación 16.}$$

De esta manera, esta cantidad establecida se asume como la totalidad del nanocompuesto a partir del cual se van a determinar los porcentajes requeridos, como se muestra en las **Ecuaciones 17, 18 y 19**:

- Para el 2% de plata:

$$0,63g \text{ de NPIO} \times 0,02 = 12,6 \text{ mg de Ag} \quad \text{Ecuación 17.}$$

- Para el 4% de plata:

$$0,63g \text{ de NPIO} \times 0,04 = 25,2 \text{ mg de Ag} \quad \text{Ecuación 18.}$$

- Para el 6% de plata:

$$0,63g \text{ de NPIO} \times 0,06 = 37,8 \text{ mg de Ag} \quad \text{Ecuación 19.}$$

Estas cantidades hacen referencia a 0,126 mg/mL, 0,252 mg/mL y 0,378 mg/mL respectivamente, cantidades límite que no logran generar presión osmótica en estos microorganismos.

De esta manera, como resultado, se obtiene el AgNC a evaluar sobre las cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, ya que se alcanzaron los parámetros requeridos para llevar a cabo las reacciones dentro de la misma y las operaciones unitarias en su totalidad bajo las condiciones descritas ideales para la síntesis, descartando la formación de otros compuestos indeseados gracias a la implementación de sonoquímica, proceso que garantiza la correcta eliminación de los mismos y, en adición, mantiene el tamaño de partícula dentro de la escala nanométrica por la formación de burbujas logrando dispersar en su totalidad las sustancias empleadas en cada etapa del proceso, reduciendo al mínimo el nivel de agregación que se podría presentar en los nanocompuestos. Además, el proceso de secado es la operación clave para asegurar el correcto desarrollo de los procesos anteriormente descritos por lo cual, cada uno finaliza con esta etapa. Finalmente, para alcanzar las concentraciones esperadas de plata dentro del nanocompuesto, fue necesario tener en cuenta la equivalencia que tiene el peso de las nanopartículas de hierro dentro de la totalidad del mismo y, así, determinar la cantidad de plata para un 2%, 4% y 6% respectivamente.

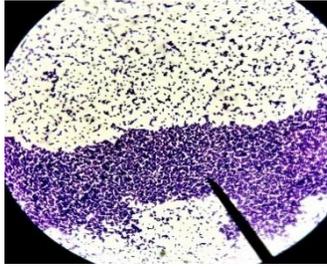
### **3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOCIDA DE LOS NANOCOMPUESTOS SINTETIZADOS EMPLEANDO COMO BACTERIAS MODELO *STAPHYLOCCUS AUREUS* Y *ESCHERICHIA COLI***

En este capítulo se pretende comprobar la actividad biocida que poseen los nanocompuestos de plata previamente sintetizados, de manera que se requiere una experimentación basada en la microbiología de las cepas bacterianas a evaluar que se divide en tres etapas: la recuperación de estos microorganismos, el recuento en placa superficie y finalmente, la curva de crecimiento propia para cada cepa. Las cepas bacterianas que se estudian son *Staphylococcus aureus* que se caracteriza por el amplio rango de enfermedades que desencadena gracias a los diferentes serotipos y toxinas que presenta en los mamíferos<sup>11</sup>, y *Escherichia coli* que es un patógeno generalmente presente inocuo en el tracto gastrointestinal pero puede desarrollar grandes enfermedades, además, es un indicador de la contaminación del agua<sup>13</sup>; estas cepas bacterianas se consideran agresivas, razón por la cual se desea evaluar el comportamiento biocida de los nanocompuestos de plata sobre las mismas.

#### **3.1 TINCIÓN DE GRAM**

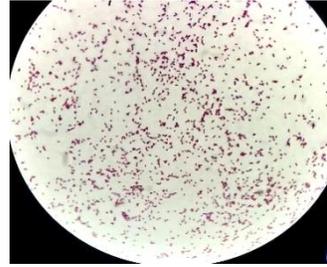
En primer lugar y con el fin de descartar la presencia de microorganismos diferentes a los de interés para este proyecto, se procedió a realizar una tinción de Gram. De esta manera, se toma una muestra de cada cepa con ayuda de un asa estéril y mediante un frotis se lleva a una lámina portaobjetos para realizar la lectura, se adiciona una gota de solución salina de modo que la muestra se encuentre diluida en una suspensión y se procede a realizar una distribución de las bacterias lo más homogénea posible alrededor de la lámina. Cuando esta se encuentra totalmente seca, se debe fijar al calor y se adicionan los respectivos colorantes: el primero de ellos se trata del cristal violeta el cual permea e ingresa a la pared y membrana de la célula a estudiar, luego se adiciona el lugol que gracias a su afinidad se ancla a los componentes sacáridos de la pared, seguido del alcohol/acetona que funciona como decolorante ya que pretende eliminar los excesos de los anteriores colorantes dentro de la bacteria que no pudieron adherirse y finalmente, la fucsina de Gram que sirve como colorante contraste ya que ingresa y permea a la bacteria por medio del método de difusión simple anclándose a la misma en el espacio restante.

**Figura 26.** Tinción Gram *S. aureus*



**Fuente:** elaboración propia.

**Figura 27.** Tinción Gram *E. coli*



**Fuente:** elaboración propia.

Como se puede observar en la **Figura 26**, *Staphylococcus Aureus*, al ser una bacteria Gram positiva, presenta una coloración violeta gracias a la gran cantidad de peptidoglicano presente en su pared celular a través del cual se logra la adherencia del complejo Cristal Violeta/Lugol el cual es responsable de esta tonalidad, esto se da gracias a la afinidad por los disacáridos propios de la pared de esta cepa, generando un complejo difícil de eliminar con el decolorante, de manera que, no posee espacio restante para los demás colorantes, en adición, es posible identificar su morfología característica la cual se trata de bacterias de forma esféricas denominadas cocos.

Por otro lado, *Escherichia coli*, es una bacteria Gram negativa, presenta una tonalidad fucsia (ver **Figura 27**) ya que posee poco contenido de peptidoglicano en su pared celular, razón por la cual el complejo de colorantes Cristal Violeta/Lugol no logran adherirse y se presenta una fácil remoción con ayuda del decolorante, en este caso, al adicionar la fucsina de Gram, aún se encuentra un espacio restante dentro de la bacteria para que esta logre anclarse y así, esta cepa manifieste esta tonalidad, su morfología características es de cocobacilos.

Gracias a esta prueba, es posible establecer correctamente las cepas bacterianas de interés, ya que a través de estos resultados se descarta la presencia de microorganismos diferentes a los de interés.

### **3.2 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA RECUPERACIÓN DE LAS CEPAS BACTERIANAS**

Para la preparación de los medios de cultivo respectivos para las cepas *Staphylococcus Aureus* y *Escherichia Coli* fue necesario la recuperación de las mismas a través de dos técnicas:

La primera de ellas se basa en la siembra de la cepa correspondiente desde un medio líquido el cual consiste en la cepa bacteriana diluida en glicerol, a caldo nutritivo como medio de recuperación ya que posee las exigencias nutricionales

para que la cepa sea capaz de crecer después de un periodo de incubación definido de 18 a 24 horas a 37°C. En principio, se tiene la cepa en la suspensión con glicerol, y se procede a realizar la recuperación en un medio totalmente estéril de caldo nutritivo con asas bacteriológicas previamente esterilizadas mediante un proceso de incineración en llama en donde como indicador de esterilización el asa se torna roja. Esta técnica fue utilizada específicamente para preparar las respectivas diluciones del inóculo para cada cepa, con el fin de encontrar aquella dilución ideal que permitiera un recuento de unidades formadoras de colonia viable brindando la posibilidad de identificar con facilidad la actividad biocida exhibida por los nanocompuestos de plata sobre el número de colonias preliminar.

La segunda técnica se basa en la recuperación de la cepa bacteriana a través de la siembra denominada siembra por aislamiento en una placa con agar nutritivo dispuesto sobre una caja de Petri; se trata de una técnica de traslado de la cepa de un medio líquido a un medio sólido, este agar posee las exigencias nutricionales para que la cepa sea capaz de crecer después de un periodo de incubación definido de 18 a 24 horas a 37°C y posteriormente, sea conservada en este medio. De la misma manera descrita anteriormente, se toma la cepa suspendida en un medio líquido, a diferencia de la anterior técnica, esta recuperación tiene como base el inóculo preparado previamente en el caldo nutritivo, de modo que se toma una pequeña muestra del mismo y se deposita en las cajas de Petri con el agar nutritivo totalmente estéril, la finalidad de este proceso se fundamenta en observar las unidades formadoras de colonia en tanto que en el momento en que el crecimiento se da sobre la superficie, es posible identificar visualmente las colonias de la cepa correspondiente.

Como se puede observar, las dos técnicas van de la mano, en tanto que es necesario desarrollar la primera para llevar a cabo la segunda. De esta manera, se prepararon los medios necesarios para realizar la siembra por medio de cada una de las técnicas; en primer lugar, se pesaron las cantidades necesarias para un volumen específico de caldo nutritivo y agar nutritivo los cuales se encuentran a concentraciones de 8 g/L y 23 g/L respectivamente.

Posteriormente, los medios sólidos son diluidos en agua destilada y llevados a una plancha de calentamiento y agitación con el fin de garantizar la homogenización de la mezcla descartando material sólido por lo que se requiere de agitación mecánica acompañada de calentamiento.

Al tener los medios homogéneos, estos son llevados a esterilización junto con todo el material requerido para llevar a cabo todo el proceso de siembra, por lo cual se someten a una autoclave cuyo funcionamiento se basa en emplear vapor a altas presiones y temperaturas con el fin de eliminar por completo la presencia de microorganismos indeseados, el proceso de esterilización toma 2 horas y media aproximadamente.

Finalmente, los medios son servidos, en el caso del agar nutritivo se emplean cajas de Petri con dimensiones de 100x15mm, como se mencionó anteriormente, y para el caldo nutritivo tubos tapa rosca con el fin de prolongar el proceso de esterilización al momento de realizar la recuperación de cepas bacterianas necesarias.

### 3.3 RECuento DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIA (UFC)

Para lograr un recuento de unidades formadoras de colonia (UFC), es necesario desarrollar las técnicas descritas anteriormente para la recuperación de cepas bacterianas, además, todo proceso microbiológico requiere un factor que garantice el menor grado de contaminación por presencia de otros microorganismos, en este caso se trata de la implementación de un mechero de gas que disminuya este riesgo y mantenga un área estéril cercana al sitio de trabajo.

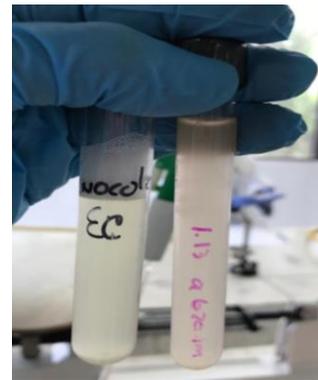
En primer lugar, se procede a la preparación del inoculo para cada cepa escogida a evaluar, para llevar a cabo este proceso se toma como base la técnica líquido-líquido que incluye el medio estéril de caldo nutritivo, este inoculo tiene como requerimiento la comparación con la escala de McFarland, en tanto que esta es empleada como estándar de turbidez en microbiología y en la búsqueda de una visualización contable de las unidades formadoras de colonia, que corresponden a  $1,5 \times 10^8$  UFC:

**Figura 28.** Inoculo *Staphylococcus Aureus*



**Fuente:** elaboración propia.

**Figura 29.** Inoculo *Escherichia Coli*

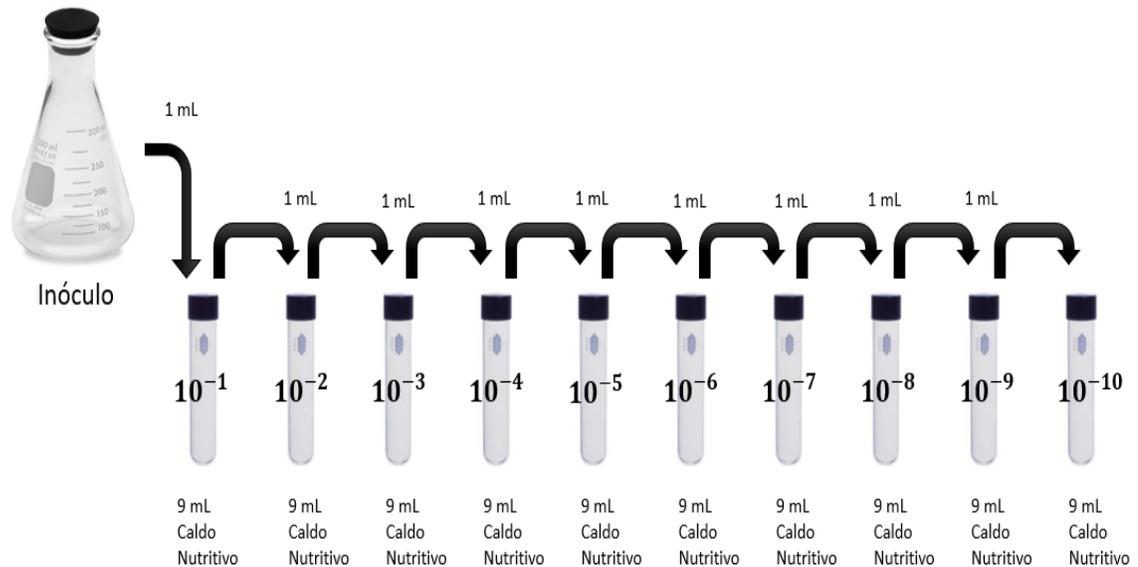


**Fuente:** elaboración propia.

Como se puede observar en la **Figura 28** y la **Figura 29**, el inoculo para cada cepa bacteriana es semejante al tubo 5 de la escala de McFarland, estándar requerido en microbiología con el cual se estima el número de colonias contables en esta escala, esto es cercano a  $1,5 \times 10^8$  unidades formadoras de colonia aproximadamente.

Posteriormente, mediante la técnica líquido-líquido se obtienen las diluciones correspondientes para cada cepa:

**Figura 30.** Preparación de diluciones



**Fuente:** elaboración propia.

Como se observa en la **Figura 30**, para cada cepa bacteriana a estudiar se preparan 10 diluciones con el fin de obtener la dilución ideal que permita el recuento de unidades de colonia ideal. En primer lugar, se toma un mililitro del inóculo preparado previamente y se diluye en 9 mililitros de caldo nutritivo, de manera que la dilución queda con la siguiente concentración (ver **Ecuación 20**):

$$\frac{1 \text{ ml inóculo}}{10 \text{ ml solución total}} = 0,1 \quad \text{Ecuación 20.}$$

Esta hace referencia a la primera dilución " $10^{-1}$ ", la cual se caracteriza por ser la más concentrada, partiendo de esta se procede a realizar la siguiente dilución, tomando un mililitro de la misma y realizando la dilución idéntica en la base de 9 mililitros de caldo nutritivo, de manera que esta va a disminuir en un orden de magnitud y así sucesivamente hasta alcanzar una última dilución " $10^{-10}$ ".

Al tener listas las diluciones, es posible continuar con la siembra de las mismas para cada cepa bacteriana, para este caso particular el método de siembra se denomina siembra masiva, de modo que se implementa la técnica de recuperación líquido-

sólido descrita con anterioridad; con ayuda de una micropipeta y puntas previamente esterilizadas, se toma una alícuota de 100 µl y se lleva al agar nutritivo dispuesto en las cajas de Petri, paso seguido se toma un rastrillo de vidrio estéril con el fin de garantizar una siembra homogénea, con el mismo se realizan movimientos uniformes sobre todos los espacios disponibles en el medio. Posteriormente, las diluciones preparadas en caldo nutritivo y sembradas en agar nutritivo son llevadas a incubación durante 48 horas a una temperatura de 37°C con el fin de permitir el crecimiento de las cepas bacterianas.

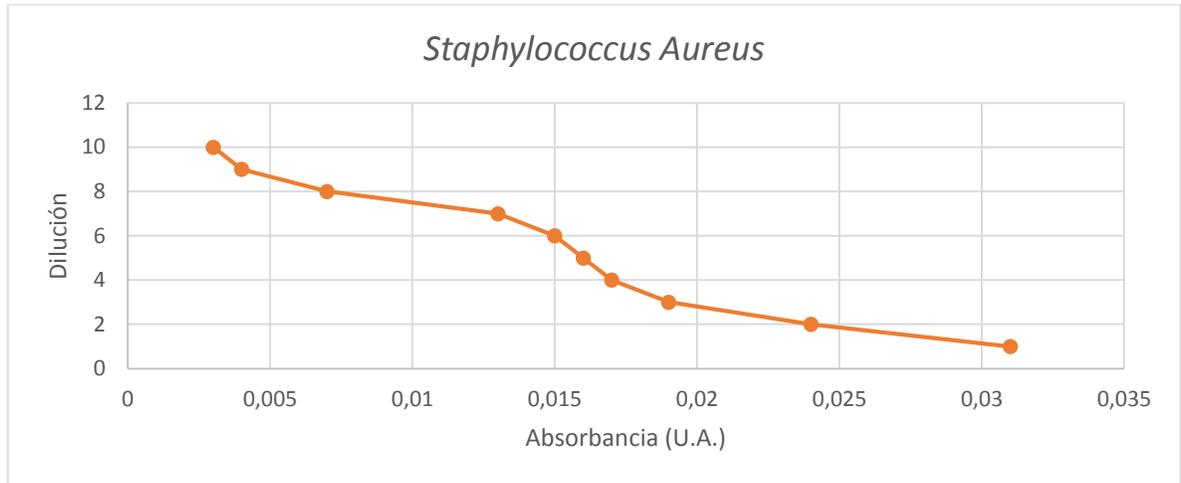
Al cabo del tiempo estimado de incubación, en primer lugar, se realiza la lectura de la absorbancia con ayuda del espectrofotómetro a una longitud de onda de 560 µm para las diluciones dispuestas en caldo nutritivo, dando como resultado las siguientes gráficas para cada cepa (ver **Gráfica 2** y **Gráfica 3**):

**Tabla 5.** Curva de calibración para *Staphylococcus aureus*

Dilución		Absorbancia
0,1	1	0,031
0,01	2	0,024
0,001	3	0,019
0,0001	4	0,017
0,00001	5	0,016
0,000001	6	0,015
0,0000001	7	0,013
1E-08	8	0,007
1,00E-09	9	0,004
1,00E-10	10	0,003

**Fuente:** elaboración propia.

**Gráfica 2.** Curva de calibración para *Staphylococcus aureus*



**Fuente:** elaboración propia.

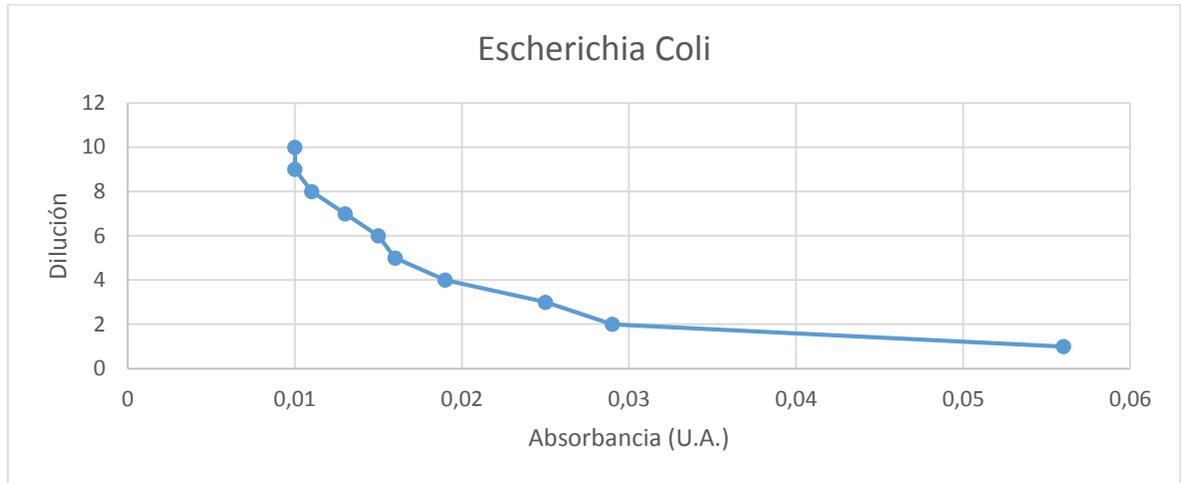
Los resultados obtenidos en la **Gráfica 2**, evidencian que para *Staphylococcus aureus* se obtiene una curva de calibración con la tendencia esperada, en tanto que al diluir las muestras evaluadas, decrece la concentración de bacterias presentes en las mismas, de esta manera, la absorbancia disminuye gracias a la reducción del factor de turbidez que se presenta como consecuencia.

**Tabla 6.** Curva de calibración para *Escherichia coli*

Dilución		Absorbancia
0,1	1	0,056
0,01	2	0,029
0,001	3	0,025
0,0001	4	0,019
0,00001	5	0,016
0,000001	6	0,015
0,0000001	7	0,013
0,00000001	8	0,011
1,00E-09	9	0,01
1,00E-10	10	0,01

**Fuente:** elaboración propia.

**Gráfica 3.** Curva de calibración para *Escherichia coli*.



**Fuente:** elaboración propia.

En la **Gráfica 3** se evidencia un comportamiento similar, en tanto que para *Escherichia coli* se presenta la misma relación con respecto a la tendencia que presentan las diluciones al disminuir la concentración de bacterias que se encuentran en cada una de ellas, ya que como se menciona, cuando esta es menor, se reduce la absorbancia gracias a una menor turbidez.

Como se puede observar, al tomar el inóculo de cada cepa en una fase de crecimiento similar, fue posible relacionar una magnitud física que en este caso es la absorbancia de la luz con la concentración de cada dilución realizada para estos microorganismos. Con ayuda del espectrofotómetro que basa su funcionamiento en atravesar un haz de luz por el tubo que contiene el cultivo de bacterias, el cambio manifestado entre la intensidad de luz que es capaz de incidir en el cultivo “I<sub>0</sub>” y la transmitida “I” se cuantifica como absorbancia (U.A.), valor que se deriva del logaritmo de la relación entre las variables descritas anteriormente<sup>61</sup> (ver **Ecuación 21**):

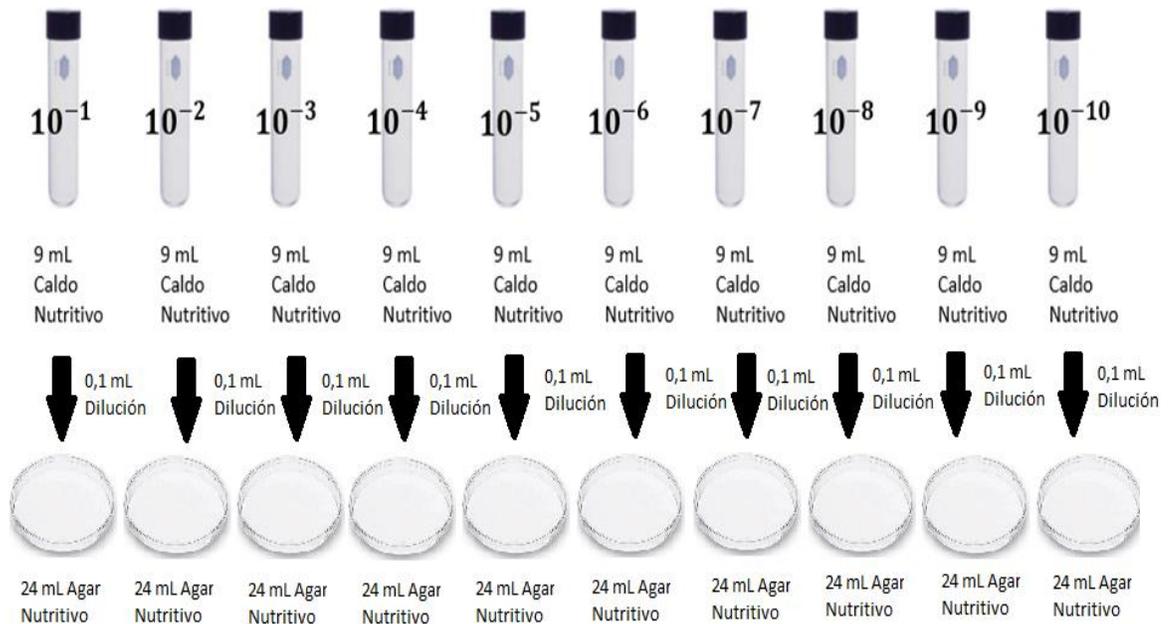
$$A = \log \frac{I_0}{I} \quad \text{Ecuación 21.}$$

De esta manera, se evidencia que, al presentarse una disminución de la concentración de estas, se reduce consigo el nivel de turbidez que la dilución contiene y aumenta la cantidad de luz que es capaz de transmitir la celda; el incremento anteriormente descrito da como resultado un descenso en la absorbancia.

<sup>61</sup> MAFU, A. A., ROY, D., GOULET, J., Y SAVOIE, L. Characterization of physicochemical forces involved in adhesion of *Listeria monocytogenes* to surfaces. En: *Appl Environ Microbiol* 57. [Consultado: 12 de octubre de 2019]

Sin embargo, la absorbancia no es una medida que logre determinar directamente el número de colonias presentes en una respectiva dilución, de manera que la cantidad de colonias que se pretende relacionar varía dependiendo de la cepa bacteriana a evaluar y así, esta medición carece de la exactitud requerida, razón por la cual es necesario realizar un recuento de colonias en placa superficial (UFC), proceso que se describe en la **Figura 31**:

**Figura 31.** Siembra en agar.



**Fuente:** elaboración propia.

De este modo, en segundo lugar, se realiza el recuento descrito previamente para las diluciones sembradas de las cepas bacterianas, al cabo del tiempo de incubación se puede observar:

- ***Staphylococcus aureus***:

**Figura 32.** Dilución  $10^{-1}$  para *S. aureus*



**Fuente:** elaboración propia.

**Figura 33.** Dilución  $10^{-2}$  para *S. aureus*



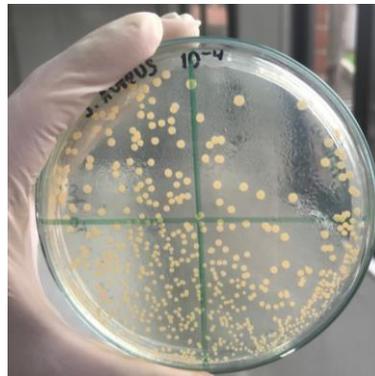
**Fuente:** elaboración propia.

**Figura 34.** Dilución  $10^{-3}$  para *S. aureus*



**Fuente:** elaboración propia.

**Figura 35.** Dilución  $10^{-4}$  para *S. aureus*



**Fuente:** elaboración propia.

**Figura 36.** Dilución  $10^{-5}$  para *S. aureus*



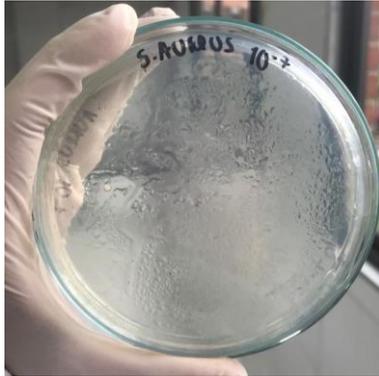
**Fuente:** elaboración propia.

**Figura 37.** Dilución  $10^{-6}$  para *S. aureus*



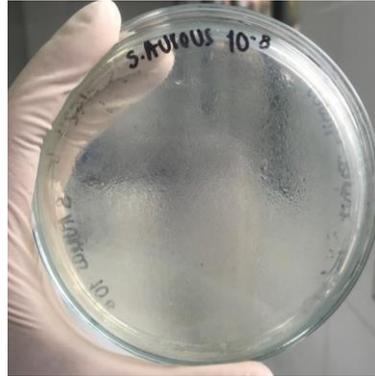
**Fuente:** elaboración propia.

**Figura 38.** Dilución  $10^{-7}$  para *S. aureus*



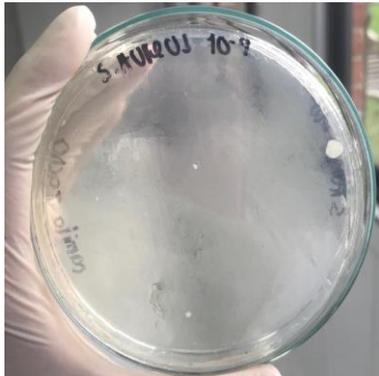
**Fuente:** elaboración propia.

**Figura 39.** Dilución  $10^{-8}$  para *S. aureus*



**Fuente:** elaboración propia.

**Figura 40.** Dilución  $10^{-9}$  para *S. aureus*



**Fuente:** elaboración propia.

**Figura 41.** Dilución  $10^{-10}$  para *S. aureus*



**Fuente:** elaboración propia.

En el caso de *Staphylococcus aureus* se obtiene el comportamiento esperado al cabo del tiempo de incubación, por lo que con una dilución que posee menor concentración de bacterias se deben observar menor cantidad de colonias. De esta manera, para realizar el conteo en placa superficial visualmente, se seleccionaron tres diluciones en las que era posible cuantificar de esta forma la cantidad de colonias existentes: la dilución  $10^{-3}$ , la dilución  $10^{-4}$  y la dilución  $10^{-5}$ ; a partir de las cuales se contaron 1080, 796 y 154 colonias respectivamente a simple vista para obtener finalmente las siguientes unidades formadoras de colonia:

- Para la dilución  $10^{-3}$ :

$$1080 \left( \frac{1}{10^{-3}} \right) = 0,01080 \times 10^8 \text{ UFC} \quad \text{Ecuación 22.}$$

- Para la dilución  $10^{-4}$ :

$$796 \left( \frac{1}{10^{-4}} \right) = 0,0796 \times 10^8 \text{ UFC} \quad \text{Ecuación 23.}$$

- Para la dilución  $10^{-5}$ :

$$154 \left( \frac{1}{10^{-5}} \right) = 0,154 \times 10^8 \text{ UFC} \quad \text{Ecuación 24.}$$

Por esta razón, para *Staphylococcus aureus* la dilución ideal es la que corresponde a  $10^{-5}$ , en tanto que presenta  $0,154 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias contables, valor que se se acerca al esperado respecto de la escala de McFarland como patrón en microbiología que presenta  $1,5 \times 10^8$  UFC.

- ***Escherichia coli*:**

**Figura 42.** Dilución  $10^{-1}$  para *E. coli*.



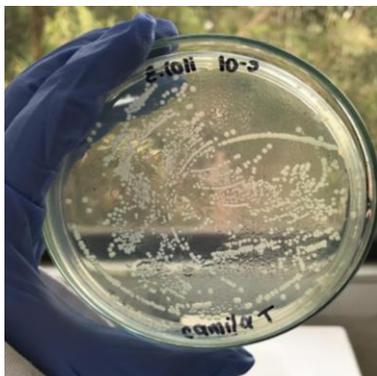
**Fuente:** elaboración propia.

**Figura 43.** Dilución  $10^{-2}$  para *E. coli*.



**Fuente:** elaboración propia.

**Figura 44.** Dilución  $10^{-3}$  para *E. coli*.



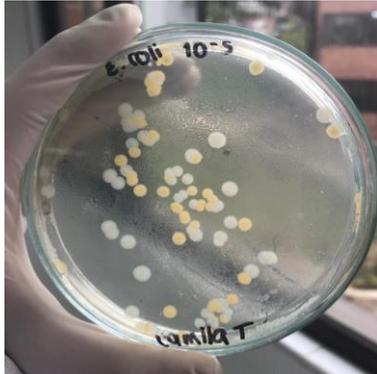
**Fuente:** elaboración propia.

**Figura 45.** Dilución  $10^{-4}$  para *E. coli*.



**Fuente:** elaboración propia.

**Figura 46.** Dilución  $10^{-5}$  para *E. coli*.



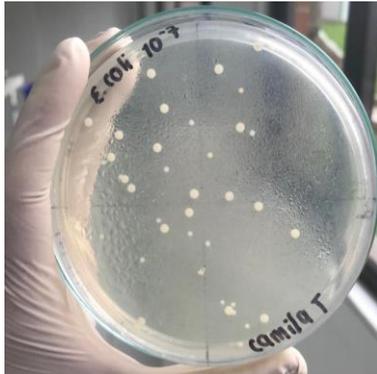
**Fuente:** elaboración propia.

**Figura 47.** Dilución  $10^{-6}$  para *E. coli*.



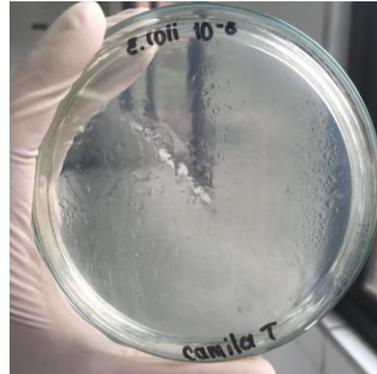
**Fuente:** elaboración propia.

**Figura 48.** Dilución  $10^{-7}$  para *E. coli*.



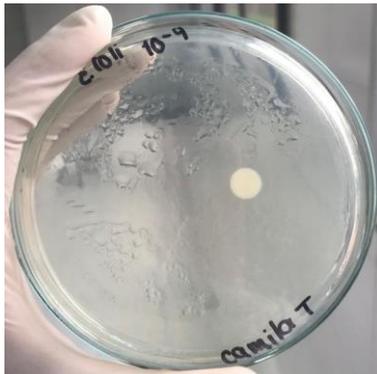
**Fuente:** elaboración propia.

**Figura 49.** Dilución  $10^{-8}$  para *E. coli*.



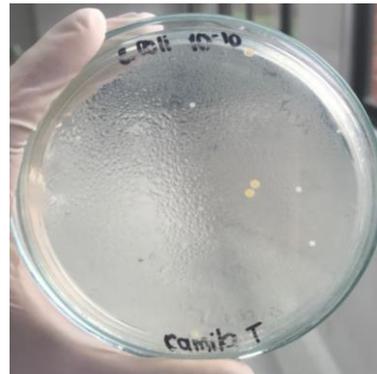
**Fuente:** elaboración propia.

**Figura 50.** Dilución  $10^{-9}$  para *E. coli*.



**Fuente:** elaboración propia.

**Figura 51.** Dilución  $10^{-10}$  para *E. coli*.



**Fuente:** elaboración propia.

De la misma manera, en el caso de *Escherichia coli* se observa la misma tendencia a disminuir que tienen las diluciones cuando se encuentran en menor concentración bacteriana. Asimismo, para realizar el conteo en placa superficial visualmente, se seleccionaron las diluciones  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ ; a partir de estas se contaron 488, 320 y 510 colonias respectivamente a simple vista para obtener finalmente las siguientes unidades formadoras de colonia:

- Para la dilución  $10^{-4}$ :

$$488 \left( \frac{1}{10^{-4}} \right) = 0,0488 \times 10^8 \text{ UFC} \quad \text{Ecuación 25.}$$

- Para la dilución  $10^{-5}$ :

$$320 \left( \frac{1}{10^{-5}} \right) = 0,320 \times 10^8 \text{ UFC} \quad \text{Ecuación 26.}$$

- Para la dilución  $10^{-6}$ :

$$510 \left( \frac{1}{10^{-6}} \right) = 5,1 \times 10^8 \text{ UFC} \quad \text{Ecuación 27.}$$

Finalmente, para *Escherichia coli* la dilución ideal es la que corresponde a  $10^{-6}$ , en tanto que presenta  $5,1 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias contables, valor que se asemeja al esperado respecto de la escala de McFarland como patrón en microbiología que presenta  $1,5 \times 10^8$  UFC.

### 3.4 CURVAS DE CRECIMIENTO MICROBIANO

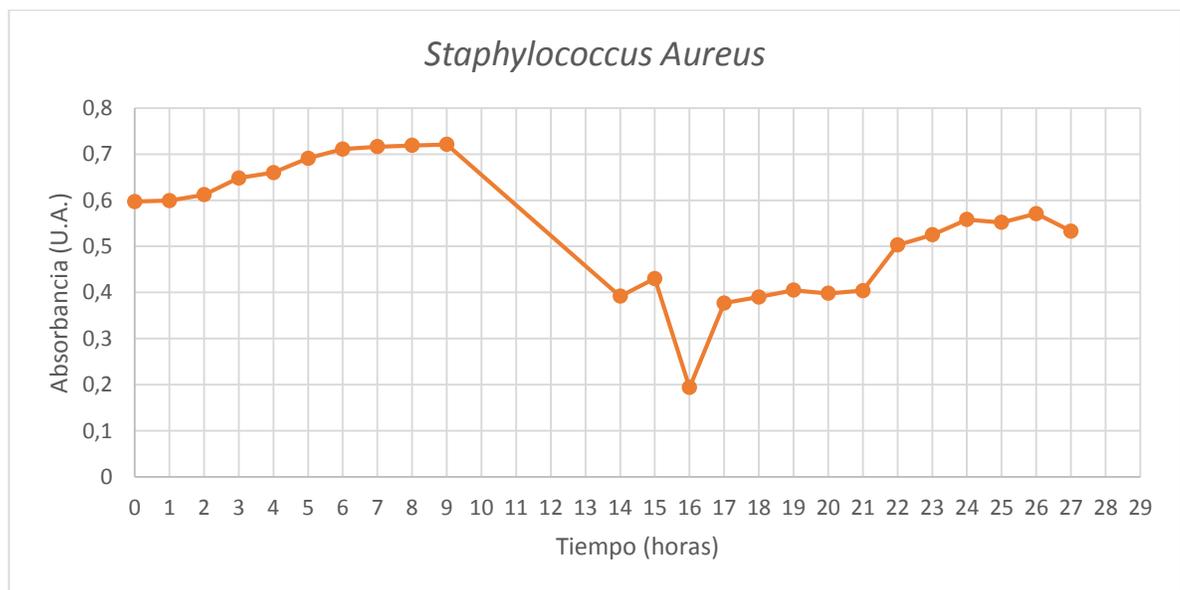
La curva de crecimiento microbiano es clave para determinar el momento previo en que la cepa bacteriana llega a su punto máximo de crecimiento entre en una fase estacionaria y luego entra en una fase de muerte la cual se produce por causa natural debido a la disminución de los nutrientes del medio en el cual se encuentra y causas diferentes a la acción de un posible antimicrobiano. De esta manera, es necesario partir del inóculo semejante al tubo 0,5 de la escala de McFarland visualmente en turbidez, el mismo se lleva a incubación durante 24 a 36 horas; toda vez que no es posible cubrir de forma continua la totalidad de las horas de observación por disponibilidad en el laboratorio; se propone entonces sembrar el mismo inóculo a diferentes horas de forma tal que sea posible la lectura de la absorbancia cada hora para ambas cepas bacterianas, con ayuda del espectrofotómetro a una longitud de onda de 560 nm del mayor lapso de tiempo, teniendo los siguientes resultados:

**Tabla 7.** Curva de crecimiento *Staphylococcus aureus*

Hora	Absorbancia	Hora	Absorbancia
0	0,597	16	0,409
1	0,599	17	0,377
2	0,612	18	0,390
3	0,648	19	0,405
4	0,660	20	0,398
5	0,691	21	0,404
6	0,711	22	0,503
7	0,716	23	0,525
8	0,719	24	0,558
9	0,721	25	0,552
14	0,392	26	0,571
15	0,430	27	0,533

**Fuente:** elaboración propia.

**Gráfica 4.** Curva de crecimiento *Staphylococcus aureus*.



**Fuente:** elaboración propia.

Para *Staphylococcus aureus*, se evidencia en la **Gráfica 4** que la cepa bacteriana entra en fase de decrecimiento exponencial a las 9 horas de incubación, fenómeno que se presenta por causas naturales evidenciando la inhibición de crecimiento para esta cepa que se busca identificar; sin embargo, al cabo de las 14 horas las bacterias presentan un intento de adaptación al medio manifestando un pequeño pico de crecimiento. De esta manera, como se puede observar, al cabo de este periodo, se presenta un pico de decrecimiento y simultáneamente, un crecimiento,

esto se debe a posibles errores experimentales que se presentaron en la medición ya que el comportamiento esperado por la tendencia que se presenta sugiere descartar este periodo, sin embargo, al interpretar esta situación, los microorganismos decrecen nuevamente lo cual indica que el medio no esta siendo favorable por lo que inhibe su crecimiento bacteriano, y al lograr una adaptación aceptable, proceden a crecer. En el intervalo de 17-21 horas, esta cepa bacteriana entra a una fase de latencia en la que no se presenta un crecimiento bacteriano significativo, posterior a este periodo, las bacterias intentan adaptarse al medio, pero por factores nocivos para estas se detiene su crecimiento y continúan en una fase de latencia.

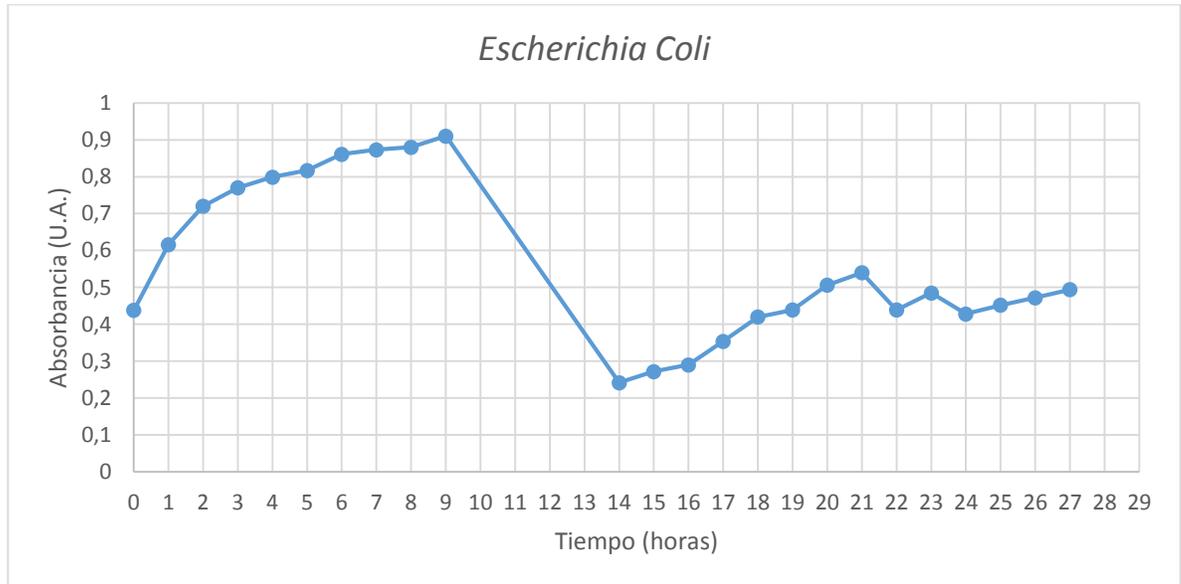
Este comportamiento es resultado de evaluar el crecimiento bacteriano durante 27 horas de incubación, por lo que se hace necesario prolongar este periodo con el fin de conocer la fase de muerte en donde se presenta lisis celular de la totalidad de esta cepa. Sin embargo, para este proyecto solo fue necesario identificar el momento en el que la cepa presenta inhibición en su crecimiento, de manera que es suficiente la que se evidencia en la **Gráfica 4**, ya que, al identificar el momento previo a la fase de decrecimiento exponencial, es posible aplicar los nanocompuestos de plata a diferentes concentraciones para descartar la muerte celular por factores diferentes a la actividad antimicrobiana que se espera obtener debido al comportamiento biocida de los mismos, para esta cepa bacteriana, la absorbancia resultante en el momento anteriormente descrito, toma un valor de 0,721, el cual va a ser la base para los siguientes ensayos ya que el inóculo a evaluar tendrá que cumplir con esta característica.

**Tabla 8.** Curva de crecimiento *Escherichia coli*

<b>Hora</b>	<b>Absorbancia</b>	<b>Hora</b>	<b>Absorbancia</b>
0	0,438	16	0,290
1	0,616	17	0,354
2	0,720	18	0,420
3	0,770	19	0,439
4	0,799	20	0,506
5	0,817	21	0,540
6	0,861	22	0,439
7	0,873	23	0,485
8	0,880	24	0,428
9	0,910	25	0,452
14	0,242	26	0,472
15	0,272	27	0,494

**Fuente:** elaboración propia.

**Gráfica 5.** Curva de crecimiento *Escherichia coli*



**Fuente:** elaboración propia.

En el caso de *Escherichia coli*, al igual que el anterior, se evidencia que la cepa bacteriana entra en fase de decrecimiento exponencial a las 9 horas de incubación, como se menciona anteriormente, este fenómeno se presenta por causas naturales que logran inhibir el crecimiento bacteriano para esta cepa siendo el punto de interés a identificar; sin embargo, al cabo de las 14 horas las bacterias entran nuevamente en una fase de aparente crecimiento en tanto que presentan una adaptación del medio en el cual se encuentran logrando potencializar su crecimiento, hasta que finalmente, de las 21 horas en adelante, se presentan picos de decrecimiento y crecimiento simultáneos de forma repetitiva por lo que se evidencia una constante adaptación de estos microorganismos frente a los posibles factores nocivos que pretenden inhibir su crecimiento, de manera que finalmente entran a una fase de latencia en la que no se presenta un crecimiento significativo de la cepa bacteriana.

De la misma manera, este comportamiento se observa al evaluar el crecimiento durante 27 horas de incubación, por lo que se desconoce el momento en el que la cepa entra a la fase de muerte en la que se presenta lisis en la totalidad de la misma y se hace necesario prolongar el periodo de evaluación. Sin embargo, se logra identificar el momento en el que se presenta inhibición del crecimiento y por lo tanto un decrecimiento exponencial, evidente en la **Gráfica 5**, para descartar factores diferentes a la aplicación de los nanocompuestos de plata cuya finalidad es generar un comportamiento biocida, para esta cepa bacteriana, la absorbancia resultante en el momento anteriormente descrito, toma un valor de 0,91, el cual va a ser la base para los siguientes ensayos ya que el inóculo a evaluar tendrá que cumplir con esta característica.

### 3.5 CARACTERIZACIÓN DE LOS NANOCOMPUESTOS DE PLATA QUE EXHIBIERON ACTIVIDAD BIOCIDA

A continuación, se muestran las pruebas de caracterización realizadas a los diferentes componentes del nanocompuesto de plata (sol biocompatible de óxido de silicio y nanopartículas de óxido de hierro) como al mismo, de manera que se pretende comprobar que se alcanzaron correctamente cada una de las etapas dentro del proceso de síntesis conociendo los compuestos que deberían presentarse en los mismos. Para comprobar este fenómeno, las pruebas realizadas pretenden otorgar información química, estructural y morfológica de cada uno de los compuestos obtenido en cada fase requerida para la síntesis del nanocompuesto de plata.

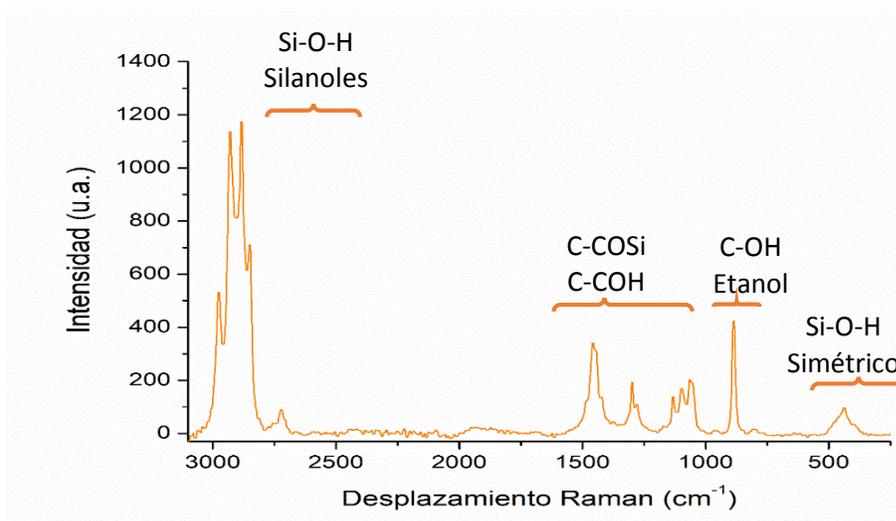
**3.5.1 Caracterización del Sol.** La **Gráfica 6** muestra el espectro Raman del sol SiO<sub>2</sub>. Esta técnica hace referencia al examen de la luz dispersada por el material que se desea evaluar, en este caso el sol biocompatible de óxido de silicio, incidiendo sobre el un haz de luz monocromático, de manera que, de acuerdo al material, se dispersa una cantidad específica de luz de forma inelástica que genera ligeros cambios de frecuencia propios del material otorgando información química y estructural del mismo<sup>62</sup>.

Como se puede observar, en la **Gráfica 6** se identifican cuatro bandas características de este sol en las cuales se evidencian las diferentes interacciones que presentan los enlaces que se encuentran en este compuesto. La banda ancha centrada alrededor de un desplazamiento equivalente a los 430 cm<sup>-1</sup>, se asocia a movimientos de los átomos de oxígeno y se atribuye a modos vibracionales simétricos de estiramiento del enlace Si-O. El pico intenso que se presenta en el desplazamiento de 884cm<sup>-1</sup> se debe a los modos de estiramiento del grupo Si-OH.

---

<sup>62</sup> FUNDAMENTOS DE ESPECTROSCOPÍA RAMAN. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/6887/03Rpp03de11.pdf?sequence=3&isAllowed=y>

**Gráfica 6.** Espectroscopia Raman de sol SiO<sub>2</sub>.



**Fuente:** elaboración propia.

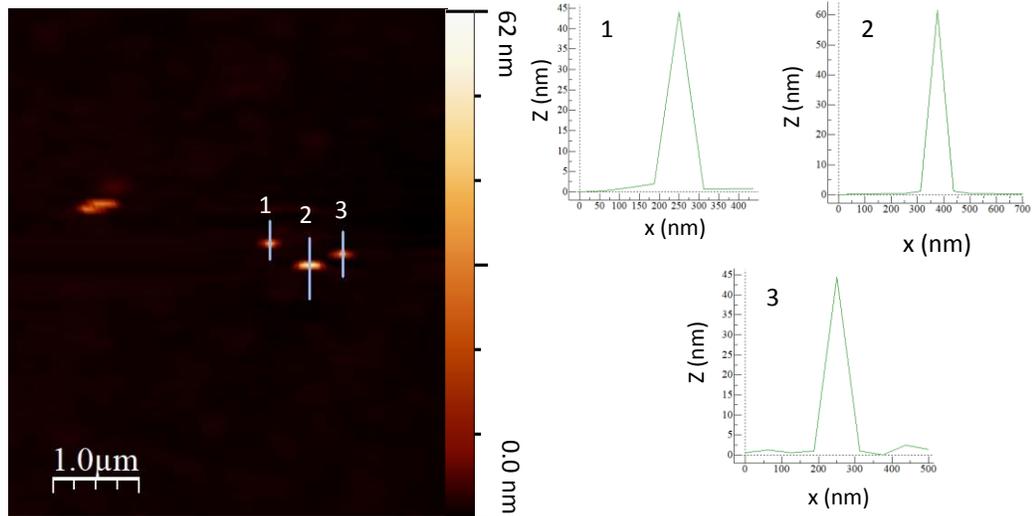
Con ayuda del espectro Raman obtenido para el sol biocompatible de óxido de silicio (ver **Gráfica 6**), es posible comprobar la interacción de los enlaces necesarios para la formación del mismo, se identifican los cambios de frecuencia generados gracias al oxígeno y silicio, componentes requeridos en el proceso de síntesis del nanocompuesto de plata ya que el óxido de silicio tiene como objetivo proteger al núcleo de óxido de hierro de la corrosión que puede presentar. De manera que, es posible determinar la presencia de los mismos gracias al pico que estos generan al momento de realizar la caracterización a través de esta técnica los cuales se caracterizan por su simetría de estiramiento.

**3.5.2. Caracterización Morfológica y química de las NPIO.** A través de dos técnicas de caracterización se determina la morfología que presenta el nanocompuesto de plata a evaluar sobre las cepas bacterianas, y en adición, se comprueba la composición química del mismo por medio de una técnica de caracterización asociada con lo cual se reconocen las etapas características del agente biocida.

La primera de ellas se trata de la técnica de microscopía de fuerza atómica (AFM) la cual se fundamenta en un análisis superficial que busca otorgar la altura promedio que posee el material a evaluar, en tanto que, con ayuda de esta, se implementa una punta que interactúa con la superficie del mismo generando un perfil de alturas en los puntos de medición<sup>63</sup>.

<sup>63</sup> CASTROVIEJO, María Pilar. Microscopía de fuerza atómica (AFM). En: *universidad de burgos* [en línea]. 04 de julio de 2019. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en

**Gráfica 7.** AFM de 5x5  $\mu\text{m}$  de Fe@SiO<sub>2</sub>



**Fuente:** elaboración propia.

La **Gráfica 7** hace referencia a la caracterización propuesta por la técnica AFM a 5x5  $\mu\text{m}$  de resolución sobre las nanopartículas de óxido de hierro recubiertas por óxido de silicio (Fe@SiO<sub>2</sub>), estas fueron re-dispersadas en IPA por ultrasonidos durante 5 min con el fin de garantizar una lectura sobre la muestra homogénea, posteriormente fueron depositadas sobre un sustrato de vidrio.

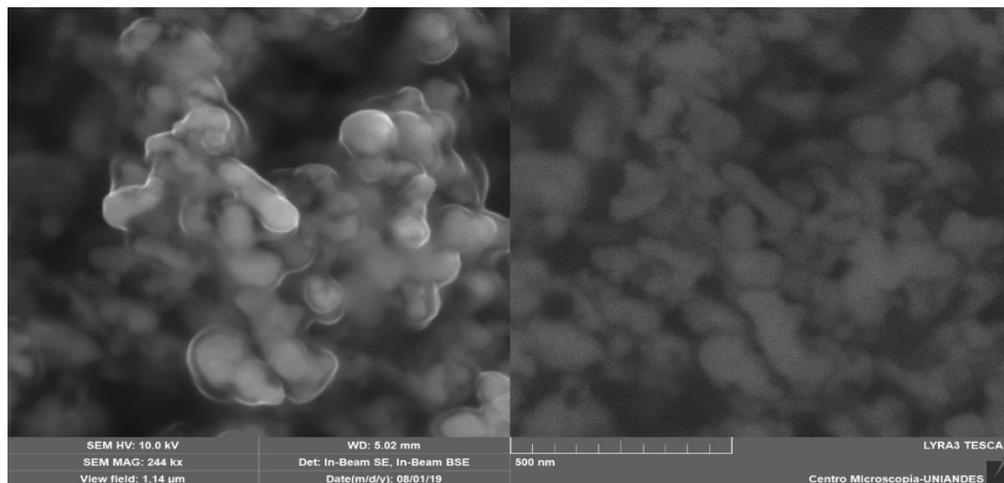
En la parte izquierda se establecen los tres puntos en los cuales se realizó la medición, de los que surgen los tres perfiles de altura de contorno sobre la topografía a lo largo de la línea verde correspondientes que se encuentran en la parte derecha. A partir de los mismos, se determina una altura promedio de las nanopartículas de  $54 \pm 10$  nm, de manera que, las nanopartículas sintetizadas se encuentran dentro del rango nanométrico, característica esencial para cumplir con las propiedades del agente biocida que se evalúa.

La segunda técnica de caracterización es la microscopía electrónica de barrido (MEB), la cual se basa en un análisis superficial que busca determinar el tamaño promedio de la muestra que se estudia, basa su funcionamiento en enfocar sobre la misma un fino haz de electrones acelerado por energías de excitación generando la información morfológica requerida<sup>41</sup>. De esta manera, los resultados obtenidos de

<https://www.ubu.es/parque-cientifico-tecnologico/servicios-cientifico-tecnicos/microscopia/microscopia-de-fuerza-atmica-afm>

la caracterización del nanocompuesto de plata en su totalidad, se muestran en la **Gráfica 8**:

**Gráfica 8.** Microfotografías obtenidas por MEB de nanopartículas de óxido de hierro recubiertas por SiO<sub>2</sub> y Ag



**Fuente:** elaboración propia.

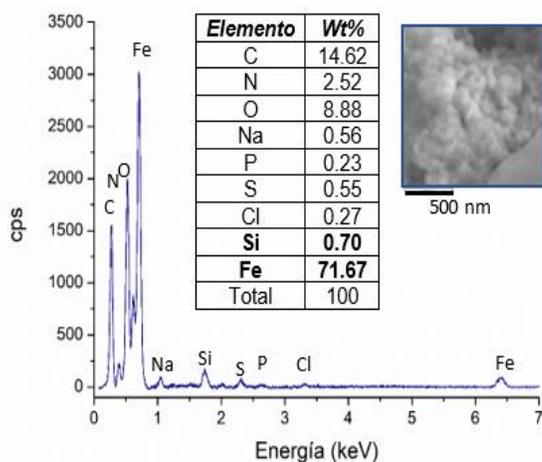
En la **Gráfica 8** se muestran dos micrografías: a la izquierda, la imagen topográfica de alta resolución por SE (Electrones Secundarios), y a la derecha, la imagen de composición o distribución química por Electrones Retrodispersados (BSE), ambas a 244 mil aumentos a 10kV. Como se menciona anteriormente, las muestras seleccionadas han sido examinadas por microscopía electrónica de barrido con filamento de emisión de campo (FE-SEM) de alta resolución de la marca Tescan Lyra 3. Este equipo, además tiene acoplado un sistema de microanálisis por dispersión de energía de rayos X (EDX).

Las micrografías muestran la tendencia que presentan las partículas a formar aglomerados, este fenómeno se presenta gracias a su tamaño nanométrico y características magnéticas. Con ayuda del programa de análisis de imágenes ImageJ® se determinó que el tamaño de las NPIO recubiertas con SiO<sub>2</sub> tenían un tamaño de  $65 \pm 10$  nm, lo cual comprueba que el nanocompuesto de plata se encuentra dentro de la escala nanométrica esperada. Gracias al contraste uniforme de la imagen de composición BSE que se puede observar, se logra determinar que la muestra presenta una composición homogénea para el límite de detección del equipo, en tanto que no se presentan diferencias sobre las características visuales que se muestran.

Finalmente, la técnica asociada de espectroscopía de energía de rayos X (EDS) consiste en una técnica analítica basada en la detección y rayos X emitida al

atravesar un haz de electrones de alta intensidad sobre la muestra que se desea analizar, esto permite obtener información cuantitativa y cualitativa sobre la composición química de la misma<sup>64</sup>.

**Gráfica 9.** Espectro de EDS de nanopartículas de óxido de Hierro/Ag.



**Fuente:** elaboración propia.

En la **Gráfica 9** se muestra el análisis por espectroscopía de energía, acoplada al microscopio de barrido (SEM-EDS), en el recuadro azul se muestra el área de análisis. Se calculó la composición porcentual promedio de las muestras. La presencia de los elementos Na, P, S y Cl se debe a la matriz acuosa en la que se dispersaron las NPIO.

Se constata que las NPIO están compuestas principalmente de Fe y Si, componentes propios de las nanopartículas de óxido de hierro recubiertas por óxido de silicio. Por otro lado, se esperaba la presencia de la plata en el nivel 3 de la gráfica, sin embargo, debido a que el nancompuesto se encontraba disuelto en un medio de caldo nutritivo el cual posee otros componentes como azúcares, sales, entre otros, no fue posible su identificación ya que el rango de lectura que tiene el equipo con el que se realiza la medición, no alcanza a detectar la plata gracias a que los demás componentes presentes generan que este porcentaje sea menor para visualizarse, a pesar de ello, por debajo del rango de medición se comprueba la presencia de la misma, razón por la cual es posible comprobar que el nancompuesto contiene todas las etapas propuestas en la síntesis.

<sup>64</sup> TÉCNICAS DE ANÁLISIS QUÍMICO SUPERFICIES. 23 de noviembre de 2012. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <https://ssyf.ua.es/es/formacion/documentos/cursos-programados/2012/especifica/tecnicas-instrumentales-en-el-analisis-de-superficie/26-noviembre-tecnicas-de-analisis-quimico-superficies.pdf>

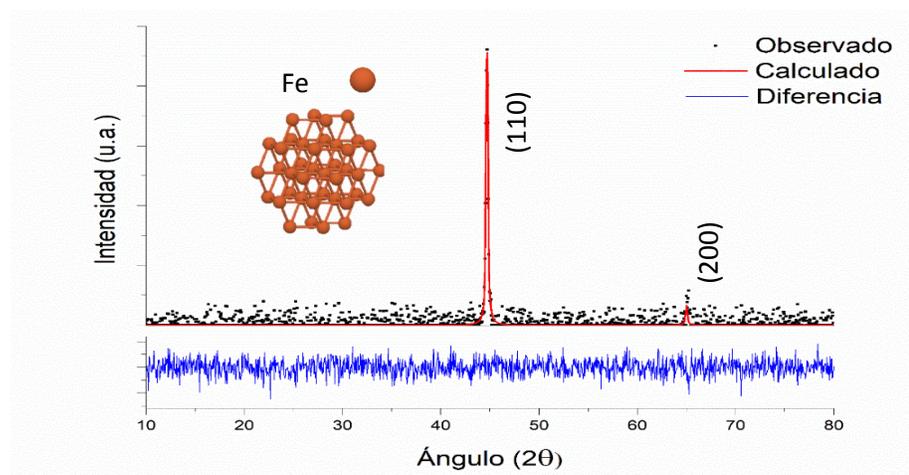
**3.5.3. Caracterización cristalográfica de las nanopartículas.** Para la identificación cristalográfica de las muestras se empleó la técnica de difracción de rayos X (XRD). En la **Gráfica 10** se muestra un patrón típico de DRX con análisis de Rietveld de una muestra de nanopartículas de óxido de hierro. Los resultados de DRX muestran la formación de la fase de Fe puro, consistente con la estructura cúbica centrada en el cuerpo  $\alpha$ -Fe con el grupo espacial  $I_{m3m}$  (229) (tarjeta JCPDS No. # 87-0721) con un parámetro de red 0,2896 nm.

El tamaño medio de los granos cristalinos fue calculado a partir del análisis de los picos de difracción más intensos mediante la ecuación de Debye-Scherrer (ver **Ecuación 28**):

$$d = \frac{k \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos \theta} \quad \text{Ecuación 28}^{65}.$$

Donde  $d$  es el tamaño medio de grano cristalino (en Å),  $\lambda$  es la longitud de onda de la radiación incidente  $Cu_{K\alpha}$  igual a 1,5418 Å,  $k$  es una constante que toma el valor de 0,9 (previamente calibrada en el equipo a partir de muestras patrón de tamaño de grano conocido),  $\beta$  es la anchura del pico a la mitad de su intensidad máxima (en radianes) y  $\theta$  es el ángulo de difracción para dicha intensidad. El diámetro del grano cristalino para las NPIO fue de 32 nm, plano (110).

**Gráfica 10.** Refinamiento de Rietveld de Nps de óxido de Hierro/Ag aplicando el software PCW



**Fuente:** elaboración propia.

<sup>65</sup> RAMÓN, Luisa. Determinación del tamaño de cristal utilizando el software Jade 6.5. En: *Universidad Nacional Autónoma de México* [en línea]. Septiembre de 2007. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <http://xml.cie.unam.mx/xml/ms/Doctos/ManualJade65.pdf>

Los resultados finales de refinamiento de Rietveld de NPIO aplicando el software PCW, observado (.), calculado (línea roja) y diferencia (línea azul). Las marcas dan la posición de todas las posibles reflexiones de Bragg.

#### **4. DETERMINACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE LAS BACTERIAS MODELO A LOS NANOCOMPUESTOS DE PLATA SINTETIZADOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE DIFUSIÓN EN AGAR (MÉTODO DE KIRBY – BAUER)**

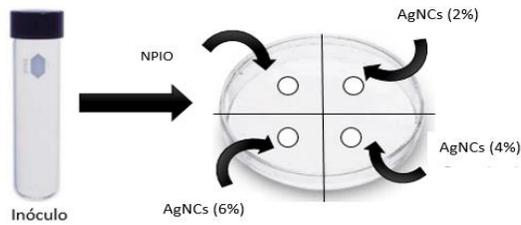
En este capítulo se desarrolla la técnica de susceptibilidad cualitativa Kirby Bauer, antibiograma con el cual se busca establecer el halo de inhibición que presentan los nanocompuestos de plata a evaluar sobre las cepas bacterianas, lo cual pretende reconocer el campo de acción de los mismos a través del posible efecto que se identifica visualmente, y, en adición, conocer la difusión que presenta en medios diferentes a los que en su mayoría son líquidos.

##### **4.1 TÉCNICA DE KIRBY BAUER PARA PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD FRENTE A ANTIMICROBIANOS**

Para realizar la prueba de susceptibilidad mediante la técnica de Kirby Bauer, es necesario sembrar el inóculo a una absorbancia anteriormente identificada referente al punto previo de que las cepas bacterianas entren a la fase de muerte. Esta técnica tiene como base la implementación de un agar Müller Hinton el cual se caracteriza por ser un medio suelto permitiendo una mejor difusión de antimicrobianos como el que va a ser empleado, de forma que es necesario preparar este medio; en primer lugar, se pesa la cantidad necesaria para un volumen necesario ya que este se encuentra a una concentración de 38 g/l, es disuelto en agua destilada y llevado a una plancha de calentamiento y agitación para garantizar la homogeneidad de la mezcla, luego, se somete a esterilización en el autoclave durante dos horas y finalmente, es servido en las respectivas cajas de Petri.

Seguido a esto, el inóculo identificado para cada cepa bacteriana es sembrado sobre el medio de agar Müller Hinton y en adición, los sensidiscos característicos de esta técnica son impregnados de los antimicrobianos a evaluar que hacen referencia a las nanopartículas de hierro recubiertas en óxido de silicio (USPIO), los AgNCs a una concentración del 2% (AgNCs 2%), los AgNCs a una concentración del 4% (AgNCs 4%) y los AgNCs a una concentración del 6% (AgNCs 6%). Finalmente, la superficie de la placa se divide en cuatro partes con el fin de aplicar esta prueba de susceptibilidad a los cuatro agentes evaluados en el mismo inóculo para cada cepa bacteriana, el procedimiento anteriormente descrito se muestra en la **Figura 52**:

**Figura 52.** Metodología técnica Kirby Bauer.



**Fuente:** elaboración propia.

#### 4.2 REALIZACIÓN DE LAS MEDICIONES CORRESPONDIENTES PARA IDENTIFICAR EL HALO DE INHIBICIÓN CORRESPONDIENTE A LA DOSIS MÍNIMA BIOCIDA

Para la cepa bacteriana referente a *Staphylococcus Aureus* se preparó el inóculo con una absorbancia de 0,721 la cual es propia del punto previo a que la misma entre en la fase de muerte por causas naturales o externas y se aplicó la técnica de Kirby Bauer anteriormente descrita evaluando los agentes antimicrobianos de interés: las nanopartículas de hierro recubiertas en óxido de silicio (USPIO) de las cuales se puede evidenciar su comportamiento en el sensidisco 1, los nanocompuestos de plata a una concentración del 2% (AgNCs 2%) evidentes en el sensidisco 2, los nanocompuestos de plata a una concentración del 4% (AgNCs 4%) evidentes en el sensidisco 3 y los nanocompuestos de plata a una concentración del 6% (AgNCs 6%) evidentes en el sensidisco 4. Se obtuvieron los siguientes resultados (ver **Figura 53**):

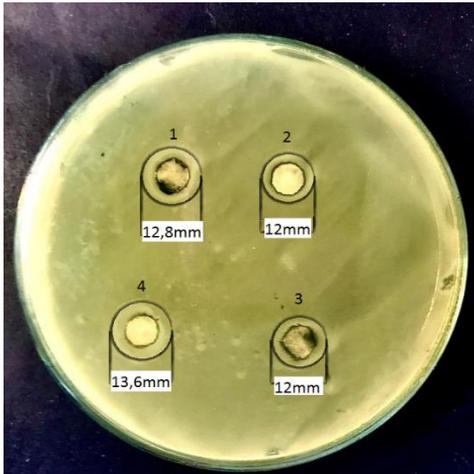
**Figura 53.** Técnica Kirby Bauer para *Staphylococcus aureus*.



**Fuente:** elaboración propia.

De la misma manera, se realiza el mismo procedimiento para la cepa bacteriana *Escherichia Coli*, estas difieren en tanto que la absorbancia en el punto de interés de esta bacteria es de 0,91. En la aplicación de este se obtienen los siguientes resultados (ver **Figura 54**):

**Figura 54.** Técnica Kirby Bauer para *Escherichia Coli*



**Fuente:** elaboración propia.

Como se puede observar, esta técnica no logra presentar con claridad el halo de inhibición que presentan los nanocompuestos de plata en tanto que la difusión en el medio característico de esta prueba, el cual se trata de Müller Hinton, no se da como es esperado, esto se presenta como consecuencia de la gravedad específica que tienen los nanocompuestos y al actuar sobre un medio con densidad tan alta, no logran difundirse correctamente.

Sin embargo, el pequeño halo de inhibición que logra percibirse, se asocia con el comportamiento biocida que presentan los diferentes nanocompuestos a evaluar de modo que con un mayor halo de inhibición se presenta mayor actividad antimicrobiana gracias al grado de susceptibilidad que tienen las bacterias frente a las diferentes concentraciones, ya que como consecuencia de la estructura de cada bacteria que difiere en tanto que sea Gram positiva o Gram negativa, el efecto de los nanocompuestos presenta tendencias diferentes.

Este fenómeno se presenta con mayor claridad en la técnica de dilución de caldo, por lo que se encuentran suspendidas en un medio líquido, razón por la cual es posible evidenciar el comportamiento biocida para cada concentración, y de esta manera, explicar porque se presentan estos resultados: para *Staphylococcus aureus*, se presenta un halo de inhibición aproximado de 12,5mm para las nanopartículas de hierro recubiertas por óxido de silicio, 9,17mm para los nanocompuestos de plata con una concentración del 2%, 15mm para los del 4% y finalmente, 13,6mm para los del 6%; por otro lado, para *Escherichia coli*, se

presentan halos de inhibición aproximados de 12,8mm, 12mm, 12mm y 13,6mm respectivamente. De manera que, la dosis mínima biocida para las cepas se trata del nanocompuesto de plata con una concentración del 4% para *Staphylococcus aureus* y el nanocompuesto de plata con una concentración del 6% para *Escherichia coli*.

## 5. DETERMINACIÓN DE LA DOSIS MÍNIMA BIOCIDA DE LOS NANOCOMPUESTOS DE PLATA SINTETIZADOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE DILUCIÓN DE CALDO SOBRE LAS BACTERIAS MODELO

En este capítulo se comprueba la actividad biocida que presentan los nanocompuestos de plata a evaluar gracias a la determinación de la dosis mínima biocida con ayuda de la técnica de dilución de caldo, de manera que, se identifican las tendencias presentadas por cada agente biocida aplicado en las cepas *Staphylococcus aureus* y *Escherichia Coli*, y se logra reconocer las razones por las cuales el comportamiento difiere en cada cepa bacteriana.

**Tabla 9.** Diseño experimental

Cepa bacteriana Agente bactericida	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
NPIO	NPIO-SA	NPIO-EC
	NPIO-SA1	NPIO-EC1
AgNCs (2%)	AgNCs2-SA	AgNCs2-EC
	AgNCs2-SA1	AgNCs2-EC1
AgNCs (4%)	AgNCs4-SA	AgNCs4-EC
	AgNCs4-SA1	AgNCs4-EC1
AgNCs (6%)	AgNCs6-SA	AgNCs6-EC
	AgNCs6-SA1	AgNCs6-EC1

**Fuente:** elaboración propia.

Para el presente proyecto de grado se selecciona un diseño de experimentos 2<sup>4</sup> factorial, en donde se presentan como variables dependientes las dos cepas bacterianas a evaluar: *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Por otro lado, se tienen como variables independientes los agentes biocidas que se van a aplicar sobre estos microorganismos con el fin de medir su comportamiento, los cuales son: nanopartículas de hierro recubiertas en óxido de silicio, nanocompuestos de plata con una concentración del 2%, nanocompuestos de plata con una concentración del 4% y nanocompuestos de plata con una concentración del 6%. De igual forma, se pretende encontrar la dosis mínima biocida que alcance la lisis celular de estos patógenos. De la misma manera, se busca dar respuesta a la variable mencionada anteriormente.

Así pues, se pretende evaluar el efecto que tienen las nanopartículas de hierro y se quiere comprobar que efectivamente no funcionan como agentes biocidas en comparación con los nanocompuestos de plata, de manera que se tiene un control de bacterias con el que se compara el crecimiento regular de estas cepas bacterianas para evidenciar con mayor claridad el efecto que tienen los mismos. Los

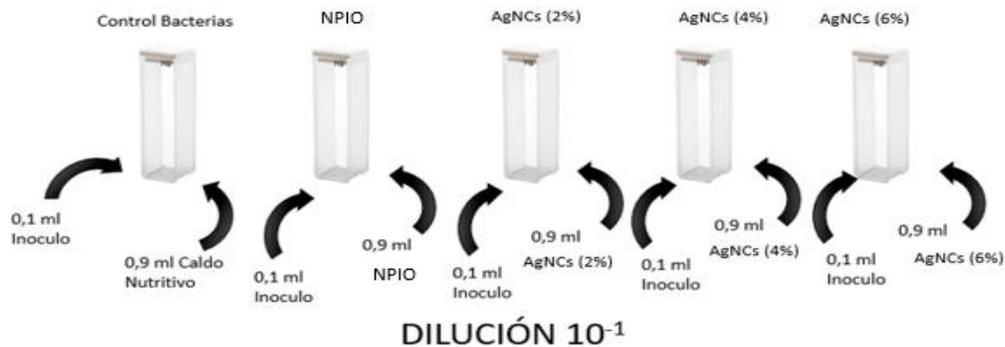
resultados obtenidos a partir del comportamiento de cada agente, se visualizan a través de las diferentes curvas de tendencia donde en cada evaluación se realiza una replica con el fin de garantizar la reproducibilidad que tienen los resultados y comprobar la acción de cada agente.

## 5.1 TÉCNICA DE DILUCIÓN DE CALDO PARA PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD FRENTE A ANTIMICROBIANOS

Para realizar la prueba de susceptibilidad mediante la técnica de Dilución de caldo, es necesario sembrar el inóculo a una absorbancia anteriormente identificada referente al punto previo de que las cepas bacterianas entren a la fase de muerte. Esta técnica tiene como base el medio basado en caldo nutritivo, de forma que es necesario preparar este medio; en primer lugar, se pesa la cantidad necesaria para un volumen necesario ya que este se encuentra a una concentración de 8 g/l, es disuelto en agua destilada y llevado a una plancha de calentamiento y agitación para garantizar la homogeneidad de la mezcla, luego, se somete a esterilización en el autoclave durante dos horas y finalmente, es servido en los tubos taparosca necesarios, se realiza la preparación del inóculo requerido. Seguido a esto, se toman 5 cubetas del espectrofotómetro para cada cepa bacteriana en los cuales se van a aplicar los antimicrobianos a evaluar referentes a las nanopartículas de hierro recubiertas en óxido de silicio (USPIO), los nanocompuestos de plata a las diferentes concentraciones (2%, 4% y 6%).

En cada cubeta se transfieren 100 µl del inóculo propio de las cepas bacteriana. En la primera de ellas, se adicionan 900 µl de caldo nutritivo, por lo que se va a manejar una dilución denominada “control” cuya finalidad es realizar el seguimiento del crecimiento normalizado de las bacterias la cual se encuentra a una concentración de  $10^{-1}$ ; en la segunda cubeta, se adicionan 900 µl de nanopartículas de hierro recubiertas por óxido de silicio (NPIO) de modo que la dilución bacteriana se encuentre a la misma concentración; en la tercera cubeta, se adicionan 900 µl de nanocompuestos de plata a una concentración del 2% (AgNCs 2%) garantizando la misma concentración microbiana; en la cuarta, se adicionan 900 µl de nanocompuestos de plata a una concentración del 4% (AgNCs 4%); y finalmente, en la última se adicionan 900 µl de nanocompuestos de plata a una concentración del 6% (AgNCs 6%), en la se describen con claridad las diluciones preparadas para llevar a cabo esta técnica (ver **Figura 55**):

**Figura 55.** Metodología técnica de Dilución de caldo.



**Fuente:** elaboración propia.

## 5.2 REALIZACIÓN DE LAS MEDICIONES CORRESPONDIENTES PARA IDENTIFICAR LA DOSIS MÍNIMA BIOCIDA

Las lecturas de absorbancia para cada cubeta se realizaron durante 120 minutos con ayuda del espectrofotómetro a una longitud de onda de 560  $\mu\text{m}$ , y para cada cepa se realizan dos réplicas de modo que se garantice la veracidad de los resultados. Se debe tener en cuenta que cada dilución debe encontrarse lo más dispersa posible, por lo que al terminar una medición se procede a realizar la dispersión de las mismas con ultrasonidos y las cepas fueron evaluadas bajo las mismas condiciones. Además, los resultados reportados reflejan la presencia de células viables para cada cepa, en tanto que previamente se realiza una normalización para descartar el efecto que tiene cada agente evaluado sobre la absorbancia obtenida para cada caso, de forma que es posible visualizar la disminución en cuanto células viables que se presenta exclusivamente, expresadas en valores porcentuales en las gráficas 6, 7, 8 y 9, tomando como control bacteriano, el inóculo seleccionado para cada cepa.

En estudios realizados previamente por Durán, Seabra, Fávoro y otros, se expone con claridad el mecanismo de acción que presentan las nanopartículas de plata. En primer lugar, se presenta el daño en la permeabilidad de la membrana para cada cepa bacteriana teniendo menor susceptibilidad en las bacterias Gram negativas gracias a la complejidad de su estructura; los nanocompuestos de plata logran permear la membrana de las bacterias gracias a la interacción con la porción de proteína que presenta cada cepa en las cuales difieren, es por eso que la acción de la plata se presenta con mayor facilidad en Gram positivas en comparación con las Gram negativa. Esta interacción conlleva a la inactivación de las enzimas y proteínas presentes en la membrana alcanzando alteraciones en la estructura de las mismas, lo cual se comprueba en un estudio realizado por Agnihotri, Mukherji y

Suparna, en el cual a través de la caracterización de las células con ayuda del TEM (Microscopio electrónico de transmisión) se observan fugas en el contenido citoplasmático generadas por una especie de picaduras sobre la membrana como consecuencia de la acción de las nanopartículas de plata<sup>5</sup>.

En adición, este agente antimicrobiano interfiere en los procesos de respiración celular obstaculizando la producción de energía lo cual afecta a la célula en su totalidad, además, influye en los procesos de replicación de ADN en tanto que se ahiera al mismo causando la desnaturalización del ARN por lo cual interrumpe la replicación bacteriana; y gracias a los daños en la membrana, se generan especies reactivas de oxígeno (ROS) las cuales generan un envejecimiento celular que origina el proceso de lisis bacteriano<sup>66</sup>. Razones por las cuales, se presenta un comportamiento bactericida en las cepas bacterianas de estudio, sin embargo, no se descarta el comportamiento bacteriostático ya que las concentraciones evaluadas pueden ser insuficientes para alcanzar este mecanismo de acción, y como se mencionó anteriormente, los requerimientos para *Escherichia coli* son mayores en comparación a la *Staphylococcus aureus* por ser un microorganismo Gram negativo. En esta medida, se obtienen los siguientes resultados para cada cepa bacteriana:

- ***Staphylococcus aureus*:**

**Tabla 10.** Aplicación de agentes bactericidas *Staphylococcus aureus* réplica 1

Control*	NPIO*	AgNCs (2%)*	AgNCs (4%)*	AgNCs (6%)*
0,996	1	1	1	1
0,998	0,819	0,875	0,812	0,768
1	0,808	0,628	0,748	0,573
1	0,794	0,569	0,616	0,44
0,999	0,783	0,372	0,51	0,399
0,996	0,757	0,342	0,431	0,32
1	0,752	0,331	0,352	0,296

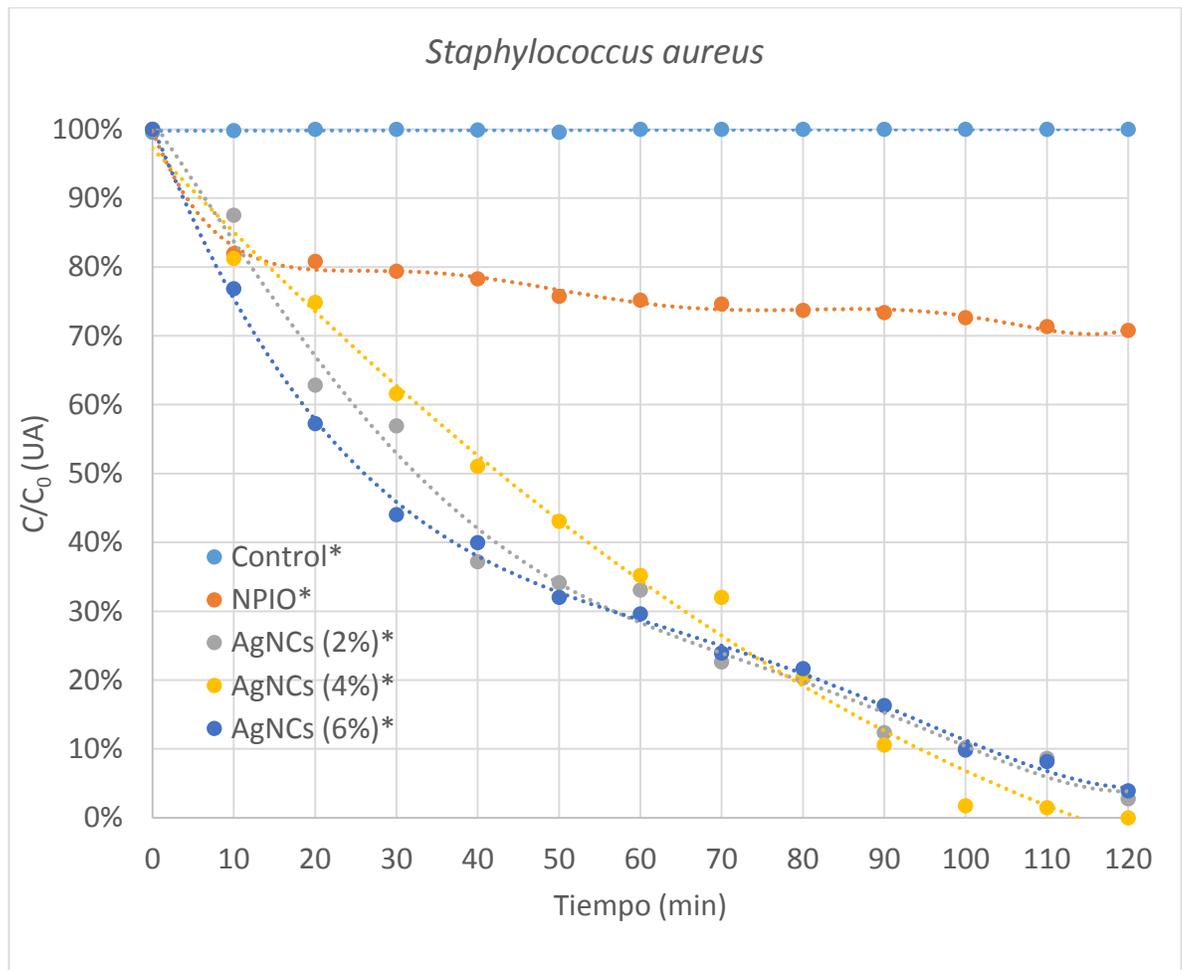
<sup>66</sup> XU, Chen; XIAOQUAN, Huang; CHUPING, Zheng; YANAN, Liu; TAOYUAN, Xua; JIE, Liu. Preparation of different sized nano-silver loaded on functionalized graphene oxide with highly effective antibacterial properties. En: *Journal of Materials Chemistry B* [en línea]. 2015. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2015/tb/c5tb00280j/unauth#!divAbstract>

**Tabla 10.** (Continuación)

Control*	NPIO*	AgNCs (2%)*	AgNCs (4%)*	AgNCs (6%)*
1	0,746	0,226	0,32	0,239
1	0,737	0,203	0,205	0,217
1	0,734	0,123	0,106	0,163
1	0,726	0,102	0,017	0,098
1	0,714	0,086	0,015	0,082
1	0,708	0,027	0	0,039

**Fuente:** elaboración propia.

**Gráfica 11.** Aplicación de agentes bactericidas *Staphylococcus aureus* réplica 1



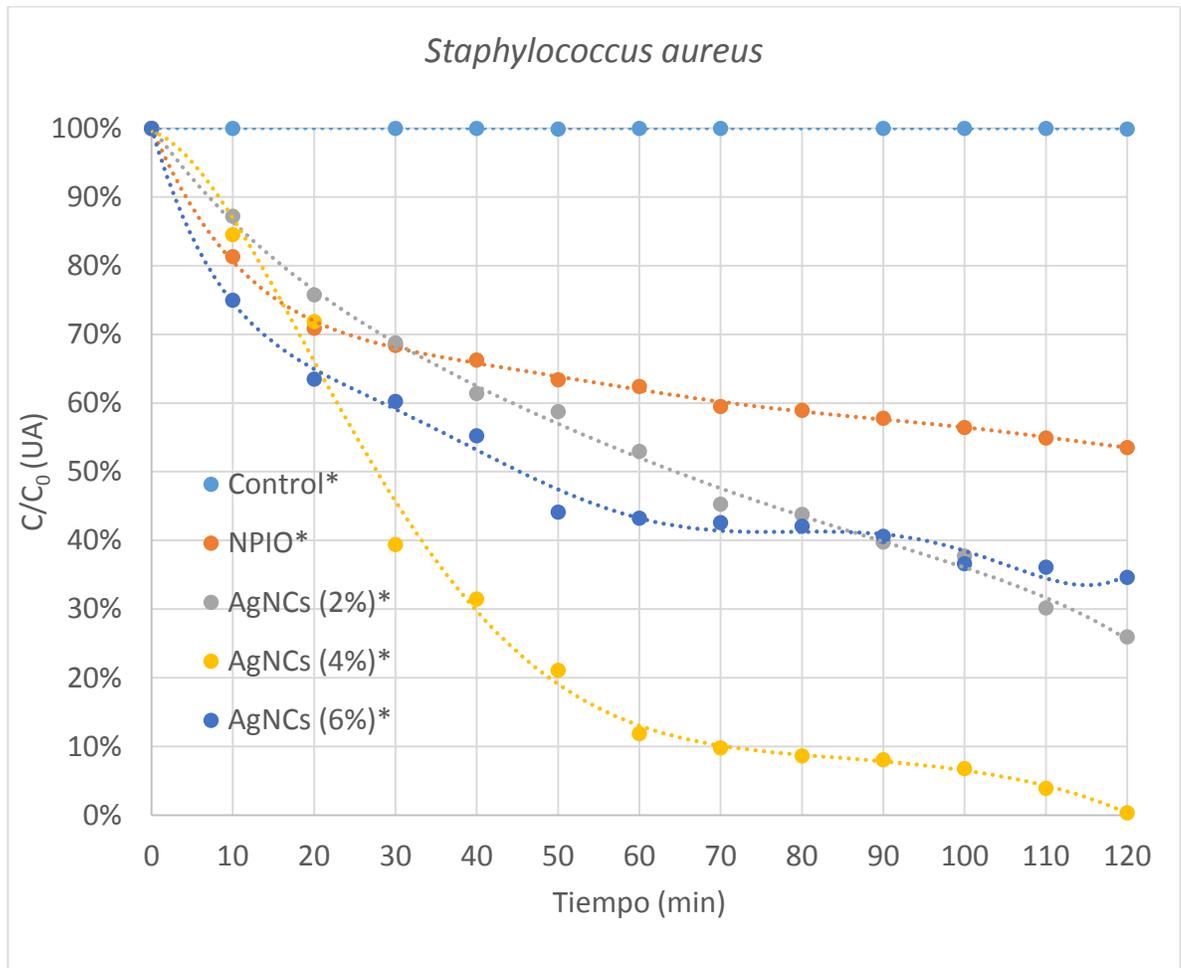
**Fuente:** elaboración propia.

**Tabla 11.** Aplicación de agentes bactericidas *Staphylococcus aureus* réplica 2

<b>Control*</b>	<b>NPIO*</b>	<b>AgNCs (2%)*</b>	<b>AgNCs (4%)*</b>	<b>AgNCs (6%)*</b>
1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
1,000	0,813	0,872	0,845	0,750
1,001	0,709	0,758	0,719	0,635
1,000	0,684	0,688	0,394	0,603
1,000	0,663	0,614	0,315	0,553
0,999	0,634	0,588	0,211	0,441
1,000	0,624	0,530	0,119	0,433
1,000	0,595	0,453	0,098	0,426
1,001	0,590	0,438	0,087	0,421
1,000	0,578	0,398	0,081	0,406
1,000	0,565	0,377	0,068	0,366
1,000	0,549	0,302	0,040	0,361
0,999	0,536	0,260	0,004	0,346

**Fuente:** elaboración propia.

**Gráfica 12.** Aplicación de agentes bactericidas *Staphylococcus aureus* réplica 2



**Fuente:** elaboración propia.

A partir de los resultados obtenidos, es posible comprobar la reproducibilidad de los mismos a través de las dos replicas realizadas (ver **Gráfica 11** y **Gráfica 12**) para evaluar el comportamiento de los diferentes nanocompuestos aplicados sobre la cepa bacteriana *Staphylococcus aureus*, ya que se evidencian tendencias similares en los dos casos, asimismo, las pequeñas variaciones que se presentan son consecuencia de errores experimentales tras realizar las respectivas lecturas.

En primer lugar, las nanopartículas de hierro recubiertas por una capa fina de óxido de silicio (NPIO), presentan un comportamiento catalogado como bacteriostático, en tanto que logran inhibir el crecimiento celular en el periodo inicial de aplicación, sin embargo, a medida que las bacterias se encuentran expuestas a la acción de las mismas, presentan una adaptación frente al efecto que las NPIO proporcionan, esto es evidente en las fluctuaciones que se presentan dentro de la tendencia, pero después de esto, se manifiesta una normalización por lo cual la cepa bacteriana

logra sobrevivir a las características que presenta este medio gracias a que el hierro es empleado como nutriente para la misma por lo que al cabo de un tiempo, las células logran mantener su viabilidad.

En contraste, el nanocompuesto de plata que posee una concentración del 2% manifiesta un comportamiento bactericida frente a esta cepa bacteriana, ya que se evidencia que logra inhibir el crecimiento bacteriano generando lisis celular, de manera que, las bacterias presentan altos niveles de susceptibilidad frente a esta concentración, sin embargo, esta dosis es insuficiente para alcanzar el comportamiento biocida esperado en el tiempo de exposición en el cual fueron evaluados los nanocompuestos.

Por otro lado, el nanocompuesto de plata con una concentración del 6% presenta tendencias diferentes en las réplicas realizadas, esto es consecuencia de errores experimentales dentro de las mediciones realizadas, así pues, esta dosis presenta un comportamiento bactericida evidente con mayor claridad en la primera réplica (**Gráfica 11**), de manera que la cepa bacteriana presenta altos niveles de susceptibilidad al igual que la anterior concentración, por lo que es evidente la inhibición del crecimiento y su posterior lisis celular, sin embargo, esta concentración no es la óptima para manifestar el comportamiento bactericida que se espera en el tiempo de exposición evaluado para el *Staphylococcus aureus*.

Finalmente, se logra identificar que la dosis mínima capaz de inhibir el crecimiento bacteriano y generar lisis celular de la cepa en su totalidad, se trata de la concentración del 4% con la que cuenta el nanocompuesto de plata en este caso, de manera que, en el tiempo evaluado, esta dosis cumple con los requerimientos de plata para que se presente el comportamiento bactericida esperado, razones por las cuales, la concentración del 4% es catalogada como la dosis mínima biocida (DMB) para la cepa bacteriana *Staphylococcus aureus*. La tendencia que se presenta al evaluar los nanocompuestos con diferentes concentraciones sobre esta cepa, carece de fluctuaciones significativas por lo que es posible determinar que las bacterias no presentan periodos de adaptación, de manera que, estos agentes antimicrobianos actúan al momento de ser aplicados sobre las mismas.

En esta medida, este fenómeno se presenta como consecuencia de la estructura que posee la cepa bacteriana *Staphylococcus aureus*, de manera que, estos microorganismos Gram positivos se caracterizan por tener una pared celular gruesa constituida mayoritariamente por peptidoglicano<sup>15</sup>, a pesar de que la presencia de este dificulta la permeabilidad de los nanocompuestos de plata para interiorizarse en la célula, la dosis requerida de plata es menor en comparación a los microorganismos Gram negativos ya que para el caso de bacterias Gram positivas, la acción bactericida de estos nanocompuestos se desarrolla con mayor facilidad gracias a la presencia exclusiva de esta pared celular que pretende proteger a la bacteria del ingreso de cualquier sustancia no deseada.

Sin embargo, como se puede observar, la concentración más pequeña evaluada no es suficiente para lograr penetrar la membrana y presentar la actividad antimicrobiana característica de los nanocompuestos de plata; por otro lado, la mayor concentración evaluada sigue sin ser óptima para alcanzar el comportamiento biocida esperado, esto debido a que la misma no logra penetrar de forma efectiva a la pared celular de la bacteria ya que requiere un canal que permita su ingreso lo cual por la tendencia obtenida, no se presenta de la manera esperada para que durante el tiempo de exposición, esta concentración logre la lisis celular de la cepa en su totalidad, se comprueba que con esta concentración es posible permear la pared celular, sin embargo, no lo hace por completo, así pues, no alcanza la efectividad esperada.

Razones por las cuales, la dosis mínima biocida (DMB) que logra un comportamiento bactericida capaz de llevar a la lisis celular de toda la cepa bacteriana, se trata de la concentración del 4% que equivale a 0,252 mg de Ag/mL para el *Staphylococcus aureus*, y, con estudios realizados con anterioridad (ver **Tabla 14**), es posible determinar que esta dosis es considerablemente menor en comparación con las que ya se han evaluado, por lo cual, los nanocompuestos de plata sintetizados presentan altos niveles de eficiencia con dosis pequeñas dentro de la escala nanométrica ideal<sup>67</sup>.

- ***Escherichia coli*:**

**Tabla 12.** Aplicación de agentes bactericidas *Escherichia coli* réplica 1

Control*	NPIO*	AgNCs (2%)*	AgNCs (4%)*	AgNCs (6%)*
0,998	1	1	1	1
0,998	0,972	0,941	0,855	0,799
0,999	0,921	0,847	0,841	0,598
0,999	0,812	0,737	0,827	0,578
0,998	0,797	0,643	0,784	0,433
0,999	0,775	0,613	0,699	0,346

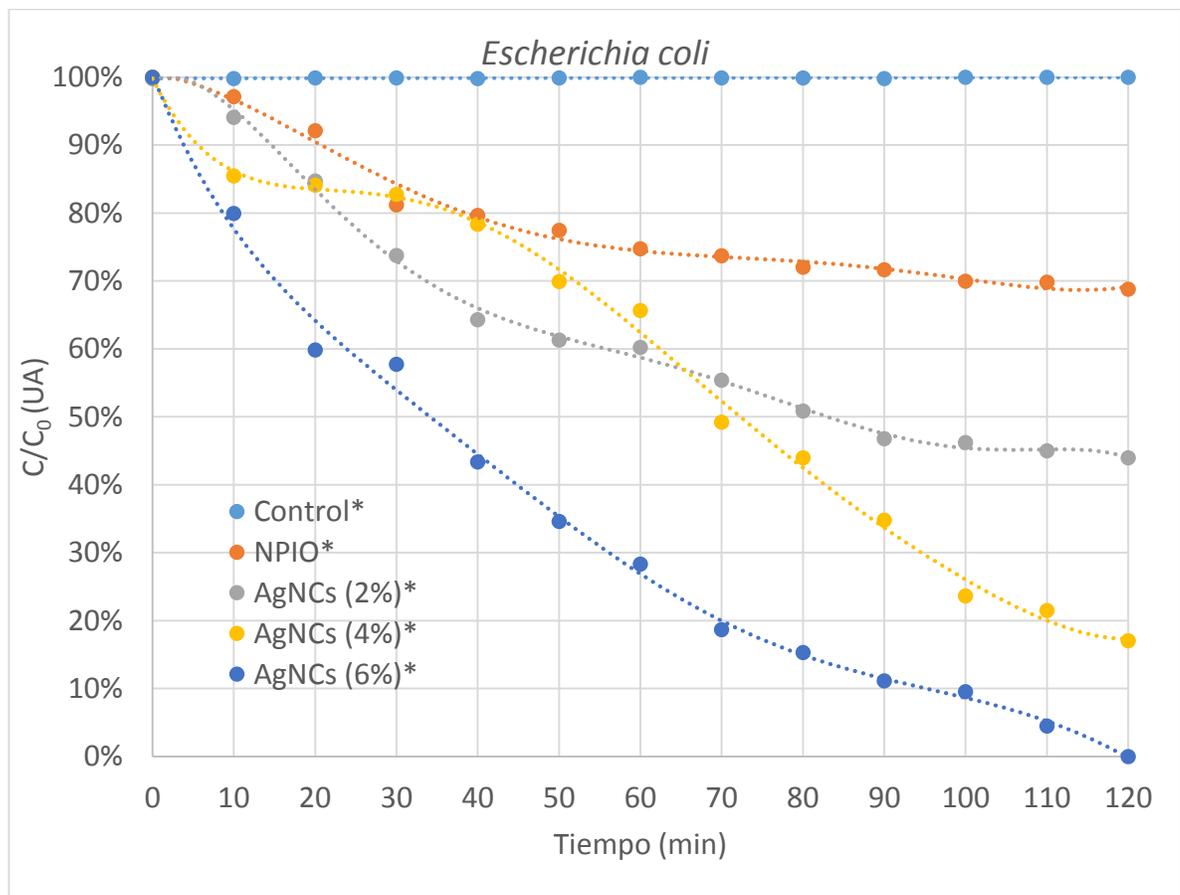
<sup>67</sup> CHANGANAQUÍ, Katherina; ALVARADO, Débora; ALARCÓN, Hugo. Síntesis y caracterización de nanocompuestos Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Ag: su efecto contra Enterobacter aerogenes y Enterococcus faecalis. En: *Universidad Nacional de Ingeniería* [en línea]. 19 de febrero de 2019. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v48n2.73724>

**Tabla 12.** (Continuación)

Control*	NPIO*	AgNCs (2%)*	AgNCs (4%)*	AgNCs (6%)*
1	0,747	0,602	0,656	0,283
0,999	0,737	0,554	0,492	0,187
0,999	0,72	0,508	0,44	0,153
0,998	0,716	0,468	0,348	0,111
1	0,699	0,462	0,236	0,095
1	0,698	0,45	0,215	0,045
1	0,688	0,44	0,17	0

**Fuente:** elaboración propia.

**Gráfica 13.** Aplicación de agentes bactericidas *Escherichia coli* réplica 1



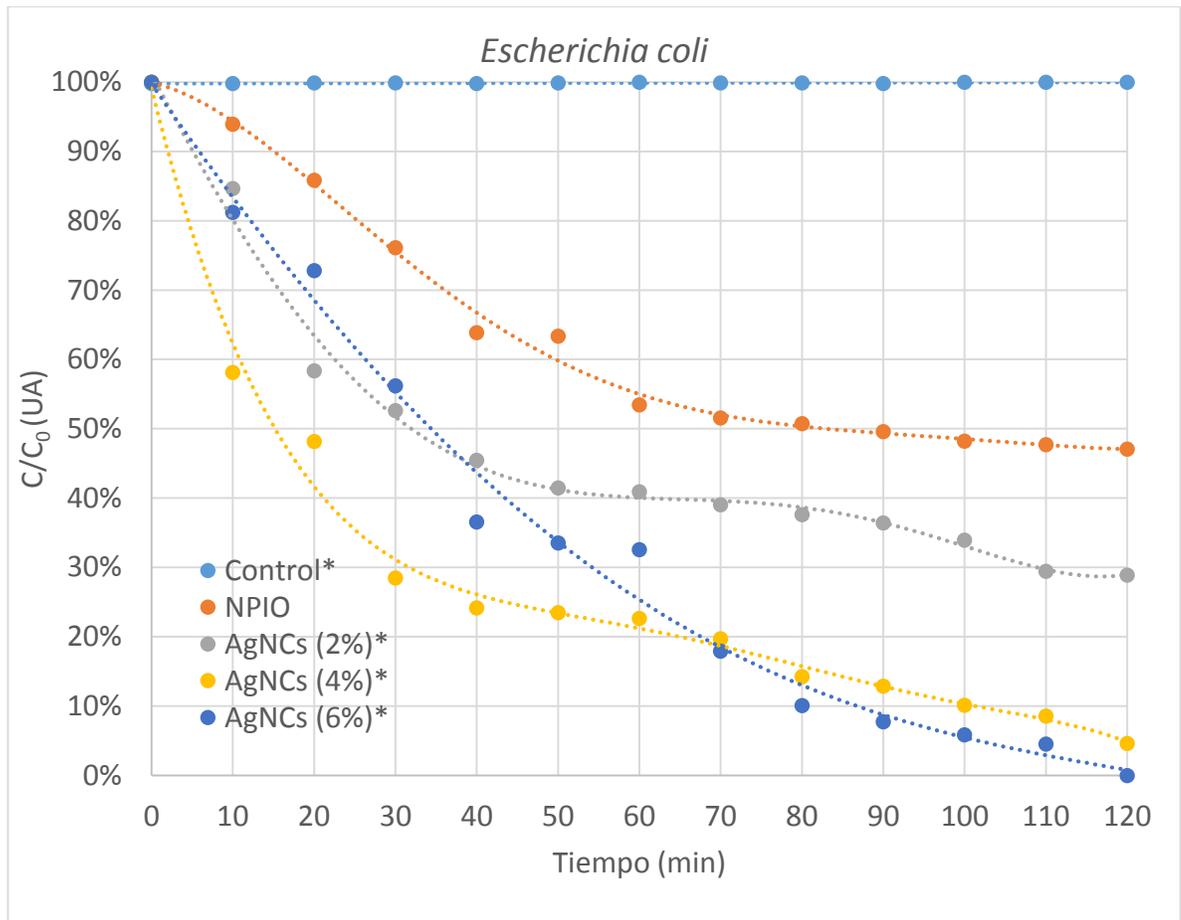
**Fuente:** elaboración propia.

**Tabla 13.** Aplicación de agentes bactericidas Escherichia coli réplica 2

<b>Control*</b>	<b>NPIO*</b>	<b>AgNCs (2%)*</b>	<b>AgNCs (4%)*</b>	<b>AgNCs (6%)*</b>
0,998	1,000	1,000	1,000	1,000
0,998	0,939	0,847	0,581	0,812
0,999	0,859	0,584	0,482	0,728
0,999	0,761	0,526	0,285	0,562
0,998	0,639	0,455	0,242	0,366
0,999	0,634	0,415	0,235	0,336
1,000	0,534	0,409	0,226	0,326
0,999	0,516	0,390	0,197	0,180
0,999	0,508	0,376	0,142	0,101
0,998	0,496	0,364	0,129	0,077
1,000	0,482	0,340	0,101	0,059
1,000	0,477	0,294	0,086	0,045
1,000	0,471	0,289	0,046	0,000

**Fuente:** elaboración propia.

**Gráfica 14.** Aplicación de agentes bactericidas *Escherichia coli* réplica 2



**Fuente:** elaboración propia.

Como se puede observar en la **Gráfica 13** y **Gráfica 14**, al evaluar el comportamiento del nanocompuesto para la cepa bacteriana *Escherichia coli* a diferentes concentraciones, se obtienen tendencias similares en las réplicas desarrolladas por lo que los resultados son reproducibles, sin embargo, las variaciones en las que difieren las réplicas se presenta gracias a errores experimentales generados al momento de realizar las respectivas lecturas.

En la **Gráfica 13** y la **Gráfica 14**, es evidente que las nanopartículas de hierro recubiertas con óxido de silicio tienen la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano, sin embargo, el comportamiento de las mismas es catalogado como bacteriostático ya que inhiben, pero no logran generar lisis celular; según la tendencia que manifiestan, es posible identificar la adaptación de las mismas luego de un periodo de tiempo estimado, esto se fundamenta en que inicialmente la concentración de NPIO aplicada, es capaz de generar estrés en la cepa bacteriana pero, el hierro funciona como un nutriente para la misma por lo que al adaptarse,

las células son capaces de sobrevivir a pesar de las características del medio en el que se encuentran.

Por otro lado, el AgNCs con una concentración del 2% presenta un comportamiento similar, bacteriostático, ya que es posible observar fluctuaciones referentes a la adaptación que tienen las células en periodos determinados, y, en los mismos, es capaz de inhibir el crecimiento de las mismas, sin embargo, se evidencia una normalización de la tendencia al cabo de la adaptación descrita anteriormente por parte de las bacterias, lo cual indica que logra sobrevivir bajo esta concentración de plata, manifestando una resistencia bacteriana al nanocompuesto, por lo que la misma es insuficiente para hablar de un comportamiento bactericida.

En el caso del nanocompuesto de plata con una concentración del 4%, en el periodo inicial de aplicación, las tendencias difieren para las réplicas realizadas, esto se debe a posibles errores experimentales en la medición que originaron fluctuaciones referentes a la adaptación de las bacterias para la réplica 1 (**Gráfica 13**), proporcionando un comportamiento bacteriostático que posteriormente presenta actividad biocida en tanto que logra generar lisis celular a través del tiempo, a diferencia de la réplica 2 (**Gráfica 14**), en la que se observa el comportamiento biocida desde el inicio del tratamiento con mayor efectividad, sin embargo, en los dos casos se comprueba que esta concentración de plata es capaz de inhibir el crecimiento bacteriano logrando lisis celular de la cepa bacteriana, manifestando una elevada susceptibilidad bacteriana a este nanocompuesto, a pesar de ello, para que esta concentración sea catalogada como la dosis mínima biocida (DMB) que se busca, requiere un mayor tiempo de exposición para que la misma evidencie lisis celular de la cepa en su totalidad.

Finalmente, para el nanocompuesto de plata con una concentración del 6%, se evidencia con claridad el comportamiento biocida que se presenta frente a la cepa bacteriana evaluada, ya que en esta tendencia no son evidentes periodos en los que se generen fluctuaciones significativas que expliquen una adaptación de las bacterias a la aplicación de este, lo que determina que esta concentración de plata empleada, es capaz de generar lisis celular en la totalidad de la cepa, presentando la mayor susceptibilidad bacteriana de la misma con respecto a los nanocompuestos evaluados, razones por las cuales, la concentración de plata referente al 6% se cataloga como la dosis mínima biocida (DMB) para la cepa bacteriana *Escherichia coli*.

Por consiguiente, este fenómeno se presenta gracias a las características dentro de la estructura de la *Escherichia coli*, ya que al ser un microorganismo Gram negativo, posee propiedades estructurales propias de los mismos; de manera que, descrito anteriormente, esta bacteria posee en principio una membrana plasmática, posteriormente se encuentra el espacio periplásmico que contiene bajos niveles de peptidoglicano en comparación con los microorganismos Gram positivos, y por

último, presenta una membrana externa exclusiva para bacterias Gram negativas constituida por lipopolisacaridos, fosfolípidos y proteínas<sup>15</sup>.

Por todo esto, la estructura de esta cepa bacteriana dificulta la acción biocida del nanocompuesto de plata, así pues, el requerimiento de plata en cuanto a la dosis empleada para lograr la actividad antimicrobiana sobre la *Escherichia coli* incrementa, es cierto que la plata posee propiedades biocidas, sin embargo, concentraciones relativamente bajas son insuficientes para lograr permear la estructura característica de estas bacterias, en tanto que al aplicar el nanocompuesto, este debe irrumpir las tres zonas descritas anteriormente.

Por todo esto, la dosis mínima que logra el comportamiento bactericida esperado se trata de la mayor concentración empleada, el 6% equivalente a 0,378 mg de Ag/mL. Aunque en comparación con estudios realizados (ver **Tabla 14**) previamente, esta dosis sigue siendo considerablemente menor a las encontradas con anterioridad dentro de un tamaño de partícula en la escala nanométrica. por lo cual, los nanocompuestos de plata sintetizados presentan altos niveles de eficiencia con dosis pequeñas<sup>67</sup>.

**Tabla 14.** Antecedente Vs Resultado

Título	Cepas bacterianas	Tamaño promedio de partícula	Concentración de plata aplicada
"Síntesis y caracterización de nanocompuestos Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /Ag: su efecto contra <i>Enterobacter aerogenes</i> y <i>Enterococcus faecalis</i> "	<i>Enterobacter aerogenes</i> y <i>Enterococcus faecalis</i>	18 nm	5mg/mL
"DESARROLLO DE NANOCOMPUESTOS DE PLATA COMO AGENTES DESINFECTANTES IN-VITRO"	<i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i>	65±10 nm	~0,4mg/mL

**Fuente:** CHANGANAQUÍ, Katherina; ALVARADO, Débora; ALARCÓN, Hugo. Síntesis y caracterización de nanocompuestos Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Ag: su efecto contra *Enterobacter aerogenes* y *Enterococcus faecalis*. En: *Universidad Nacional de Ingeniería* [en línea]. 19 de febrero de 2019. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v48n2.73724>

En la **Tabla 14** se comparan los resultados obtenidos tras realizar las pruebas requeridas para encontrar la dosis mínima biocida de los nanocompuestos de plata capaz de generar lisis celular en las bacterias modelo *Staphylococcus aureus* y *Escherichia*; se contrasta con un estudio realizado recientemente por Changanáquí, Alvarado y Alarcón, en el cual se evalúa el comportamiento biocida de los nanocompuestos sobre otras cepas bacterianas: *Enterobacter aerogenes* y *Enterococcus faecalis*, en este se determinó que el tamaño promedio de partícula más eficiente es de 18 nm, valor que se encuentra por debajo del obtenido tras la síntesis del mismo por metodología sol-gel asistida por ultrasonidos expuesta en este proyecto de grado. Sin embargo, al observar las concentraciones de plata aplicadas para cada caso, se determina que al usar menor concentración en comparación con este estudio, los nanocompuestos de plata presentan mayor efectividad, ya que se buscaba minimizar la cantidad de plata requerida en tanto que la aplicación de la misma genera que esta alternativa biocida incremente gastos y niveles de toxicidad, de tal manera que se comprueba que concentraciones tan pequeñas logran alcanzar el comportamiento esperado por estos nanocompuestos de plata posicionándolos como una alternativa viable para futuras aplicaciones.

## 6. CONCLUSIONES

- Se comprueba a través de la síntesis de los nanocompuestos de plata que la ruta química de coprecipitación adelantada permite obtener nanopartículas de óxido de hierro, como lo muestran los resultados alcanzados a través de la técnica de caracterización AFM en la cual es evidente que estos agentes tienen una tendencia a generar aglomerados y se evidencia un tamaño medio de  $54\pm 10$  nm.
- Con base a la caracterización realizada por la técnica DRX, se identifica la formación de la fase de hierro puro en la cual se manifiesta una estructura cúbica centrada del mismo con un parámetro de red equivalente a  $0,2896$  nm. Además, se determina que la metodología sol-gel asistida por ultrasonidos produce un sol que favorece la producción de nanopartículas de óxido de hierro recubiertas con óxido de silicio con un tamaño medio de  $65\pm 10$  nm, con lo cual se comprueba que los nanocompuestos sintetizados se encuentran dentro de la escala nanométrica.
- Finalmente, se comprueba la capacidad paramagnética que presentan los AgNCs gracias al empleo de la separación magnética en diferentes etapas del proceso de síntesis, por lo cual se identifica la posibilidad de recuperación de estos agentes bactericidas y su reutilización.
- Se identifica un decrecimiento exponencial para las cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* al cabo de 9 horas de incubación, momento clave para la aplicación de los nanocompuestos de plata ya que se descarta la inhibición del crecimiento de las cepas por causas naturales.
- Se establece que la metodología ensayada en las técnicas de susceptibilidad bacteriana produce AgNCs con actividad bacteriostática / bactericida dependiendo de la carga de AgNP empleada.
- Con base a las pruebas de susceptibilidad bacteriana por la técnica de Kirby Baüer, se evidencia la dificultad que presenta el nanocompuesto de plata para difundirse en el agar Müeller Hinton dificultando la lectura de los halos de inhibición. Posiblemente debido a su mayor gravedad específica y menor solubilidad respecto de agentes bactericidas tradicionales.
- Con la técnica de Kirby Bauer se logra determinar según la relación del tamaño obtenido con el efecto bactericida de los agentes evaluados que la dosis mínima para cada cepa bacteriana es:  $0,252$  mg de Ag/ml para *Staphylococcus aureus* y  $0,378$  mg de Ag/ml para *Escherichia coli*; esto debido a que presentan el mayor halo de inhibición en cada caso.

- Teniendo en cuenta los resultados obtenidos frente a la técnica de dilución de caldo, se identifica la dosis mínima biocida (DMB) gracias al comportamiento bactericida que presentan los agentes para cada cepa bacteriana: 0,252 mg de Ag/ml para *Staphylococcus aureus* y 0,378 mg de Ag/ml para *Escherichia coli* en tanto que las cepas presentan diferencias estructurales originando requerimientos de plata específicos para alcanzar la muerte celular.
- Los agentes presentan un comportamiento bacteriostático, las NPIO tienden a ser catalogadas de esta manera, aunque el hierro funciona como nutriente por lo que las cepas logran adaptarse lo que descarta la función bacteriostática de las mismas.
- A partir de las tendencias presentadas para cada cepa bacteriana, se logra identificar la dosis mínima inhibitoria (DMI) para cada cepa corresponde a 0,378 mg de Ag/ml para *Staphylococcus aureus* y 0,126 mg de Ag/ml para *Escherichia coli*; esto se determina gracias a la inhibición en el crecimiento bacteriano que presentan estos agentes, pero la adaptación manifestada por las células no permite que funcionen como bactericidas.
- Al comparar la dosis mínima biocida (DMB) para cada cepa bacteriano con estudios recientes, se determina que las mismas son bajas por lo que se habla de nanocompuestos de plata con altos niveles de eficiencia.

## 7. RECOMENDACIONES

Al culminar el proyecto de grado, se recomienda:

- Elaborar la curva de crecimiento para cada cepa bacteriana en un periodo de tiempo mayor al empleado en esta investigación, con el fin de conocer con exactitud las fases propias de estas bacterias y así, poder descartar con mayor grado de veracidad los factores externos a la exposición de estos microorganismos frente a los AgNCs que pudiesen general muerte celular.
- Realizar las pruebas de susceptibilidad bacteriana para los nanocompuestos de plata exclusivamente en técnicas que incluyan medios líquidos en tanto que gracias a las propiedades paramagnéticas y tamaño nanométrico, propiedades que les confiere la tendencia a formar aglomerados, la difusión en otros medios se dificulta de manera que se obstaculiza alcanzar una correcta lectura de los resultados.
- Evaluar el comportamiento bactericida de los AgNCs frente a diferentes cepas bacterianas que tengan grandes afectaciones a la humanidad en tanto que presenten diferentes problemas biológicos y presenten altos niveles de resistencia frente a los agentes antimicrobianos tradicionales, con el fin de ampliar el espectro de aplicación que tienen los nanocompuestos de plata.
- Realizar una investigación que se focalice en el método de recuperación con el que se pueden retirar los AgNCs con el fin de verificar su capacidad de ser reutilizables y, en adición, determinar la cantidad de ciclos en los que la acción bactericida de este logra mantenerse.
- Aplicar esta alternativa de desinfección en tratamientos de agua contaminadas con estos patógenos ya que la actividad bactericida que poseen los nanocompuestos de plata fue comprobada a escala laboratorio.

## BIBLIOGRAFÍA

ÁVALOS, A.; HAZA, AI.; MATEO, D. y MORALES, P. Nanopartículas de plata: aplicaciones y riesgos tóxicos para la salud humana y el medio ambiente. En: *Dpto. Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. UCM* [en línea]. 2013. [Consultado: 23 de agosto de 2019]. Disponible en <https://revistas.ucm.es/index.php/RCCV/article/download/43408/41203>.

BAETTIG Ricardo, PERRÉ Patrick, RÉMOND Romain. Aplicación de espectrometría de rayos x para el estudio de la madera: algunos resultados iniciales. Enero de 2007. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en [https://www.researchgate.net/publication/242687615\\_APLICACION\\_DE\\_ESPECTROMETRIA\\_DE\\_RAYOS\\_X\\_PARA\\_EL\\_ESTUDIO\\_DE\\_LA\\_MADERA\\_ALGUNOS\\_RESULTADOS\\_INICIALES\\_X-RAYS\\_SPECTROMETRIC\\_METHODS\\_FOR\\_WOOD\\_PROPERTIES\\_DETERMINATION\\_SOME\\_INITIAL\\_RESULTS](https://www.researchgate.net/publication/242687615_APLICACION_DE_ESPECTROMETRIA_DE_RAYOS_X_PARA_EL_ESTUDIO_DE_LA_MADERA_ALGUNOS_RESULTADOS_INICIALES_X-RAYS_SPECTROMETRIC_METHODS_FOR_WOOD_PROPERTIES_DETERMINATION_SOME_INITIAL_RESULTS)

BOLÍVAR, Gabriel. Hidróxido de amonio: estructura, propiedades y usos. En: *Lifeder.com* [en línea]. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en [https://www.lifeder.com/hidroxido-de-amonio/#Peso\\_molecular](https://www.lifeder.com/hidroxido-de-amonio/#Peso_molecular)

BROWER, Melissa. Staph. Aureus foodborne. En: *EcoLab* [en línea]. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en <https://www.ecolab.com/expertise-and-innovation/resources/microbial-risks/staph-aureus-foodborne>

CAMACHO, A., M.GILES, A. ORTEGÓN, M.Palao, B. SERRANO y O.Velázquez. Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. En: *UNAM México* [en línea]. 2009. [Consultado: 17 de marzo de 2019]. Disponible en [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasicas-Cuenta-en-placa\\_6527.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasicas-Cuenta-en-placa_6527.pdf)

CANATA, María Gabriela; NAVARRO, Rodrigo; VELÁZQUEZ, Gladys & otros. Caracterización molecular de factores de virulencia de aislados *Escherichia coli* obtenidas de heces de niños con gastroenteritis del Hospital Central de Instituto de Previsión Social en el 2012. En: *Pediatría (Asunción)* [en línea]. 01 de abril de 2016. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en <http://dx.doi.org/10.18004/ped.2016.abril.13-17>

CASTROVIEJO, María Pilar. Microscopía de fuerza atómica (AFM). En: *universidad de burgos* [en línea]. 04 de julio de 2019. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <https://www.ubu.es/parque-cientifico-tecnologico/servicios-cientifico-tecnicos/microscopia/microscopia-de-fuerza-atmica-afm>

CERVANTES GARCÍA, Estrella.; GARCÍA GONZÁLEZ, Rafael. & SALAZAR SCHETTINO, Paz María. Características generales del Staphylococcus. En: *Revista Latinoamericana de Patología Clínica* [en línea]. 24 de febrero de 2014. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en <http://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2014/pt141e.pdf>

CHANGANAQUÍ, Katherina; ALVARADO, Débora; ALARCÓN, Hugo. Síntesis y caracterización de nanocompuestos Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Ag: su efecto contra Enterobacter aerogenes y Enterococcus faecalis. En: *Universidad Nacional de Ingeniería* [en línea]. 19 de febrero de 2019. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v48n2.73724>

CH-SISTEMAS. pH-Metro de Alta Precisión – Termómetro – Kit, CHP-810. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <https://chsistemas.com/producto/ph-metro-de-alta-precision/>

CONSEJERÍA DE EMPLEO Y DESARROLLO TECNOLÓGICO. Manipulación de alimentos. En: *Servicio Andaluz de Empleo* [en línea]. [Consultado: 17 de marzo de 2019]. Disponible en [http://www.juntadeandalucia.es/empleo/recursos2/material\\_didactico/especialidades/materialdidactico\\_manipulacion\\_alimentos/PDF/Manual\\_Comun.pdf](http://www.juntadeandalucia.es/empleo/recursos2/material_didactico/especialidades/materialdidactico_manipulacion_alimentos/PDF/Manual_Comun.pdf)

CUMMING, Benjamin. Direct Methods. En: *Pearson Education* [en línea]. 2016. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <http://academic.pgcc.edu/~kroberts/Lecture/Chapter%206/counting.html>

DAZA PÉREZ, R.M. Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. En: *Información terapéutica del Sistema Nacional de Salud* [en línea]. 2001. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en <https://www.mscbs.gob.es/biblioPublic/publicaciones/docs/bacterias.pdf>

DCNE. Hoja informativa sobre sustancias peligrosas. En: *Departamento de salud y servicios con personas mayores de New Jersey* [en línea]. Marzo de 1998. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en <http://www.dcne.ugto.mx/Contenido/CCESH/Fichas%20Seguridad/Cloruro%20Ferroso.pdf>

DEI. Agua Milli-Q. En: *Real Academia de Ingeniería* [en línea]. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en <http://diccionario.raing.es/es/lema/agua-milli-q>

DÍAZ, Rafael. Alcohol Etílico: Fórmula, Propiedades, Riesgos y Usos. En: *Lifeder* [en línea]. Agosto de 2019. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en <https://www.lifeder.com/alcohol-etilico/>

DITECSA. Funcionamiento de la centrifugación y aplicación en limpiezas de tanques de crudo. En: *Soluciones industriales y medioambientales* [en línea]. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <http://www.grupoditecsa.com/es/funcionamiento-de-la-centrifugacion-y-aplicacion-en-limpiezas-de-tanques-de-crudo/>

DURÁN, Nelsón; DURÁN, Marcela; BISPO DE JESÚS, Marcelo; SEABRA, Amedea B.; FÁVARO, Wagner J. & NAKAZATO, Gerson. Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. 16 de noviembre de 2015. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.11.016>

ECHEVERRÍA, Jacqueline. CORREDOR Acuña & ECHEVERRÍA Félix. Síntesis de óxidos de hierro nanoparticulados. En: *Universidad Tecnológica de Pereira* [en línea]. Septiembre de 2007. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en [file:///C:/Users/Usuario/Downloads/Dialnet-SintesisDeOxidosDeHierroNanoparticulados-4802708%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Usuario/Downloads/Dialnet-SintesisDeOxidosDeHierroNanoparticulados-4802708%20(1).pdf)

ECHEVARRIA ZARATE, Juan; IGLESIAS QUILCA, David. Estafilococo Meticilino resistente, un problema actual en la emergencia de resistencia entre los Gram positivos. En: *Revista Médica Herediana* [en línea]. Octubre de 2003. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en [http://scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1018-130X2003000400008&script=sci\\_arttext](http://scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1018-130X2003000400008&script=sci_arttext)

ELMA. Elmasonic S 30 H. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en [https://www.elma-ultrasonic.com/fileadmin/downloads/Produktprofile/Produktprofile\\_ES/Ultraschallgeraete/Elmasonic\\_S/PP\\_Elmasonic\\_S30H\\_ES.pdf](https://www.elma-ultrasonic.com/fileadmin/downloads/Produktprofile/Produktprofile_ES/Ultraschallgeraete/Elmasonic_S/PP_Elmasonic_S30H_ES.pdf)

ENFERMERÍA DEL TRABAJO. Nanotecnología, nanopartículas y toxicidad. 05 de febrero de 2015. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/5213017.pdf>

EXAM. Quinolonas. En: *Farmacología del sistema nervioso vegetativo* [en línea]. 08 de junio de 2015. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <http://l.exam-10.com/biolog/2627/index.html?page=19>

FAJARDO. Antimicrobianos betalactámicos. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <http://uvsfajardo.sld.cu/sites/uvsfajardo.sld.cu/files/betalactamicos.pdf>

FERNÁNDEZ, T. Diferencias entre virus y bacterias. 26 de agosto de 2010. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en <http://www.batanga.com/curiosidades/2010/08/26/diferencias-entre-virus-y-bacterias>

FISHER SCIENTIFIC. Thermo Scientific™ Serie de placas calefactoras SuperNuova+™. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <https://www.fishersci.es/shop/products/supernuova-hotplate-series/p-6367017>

FRESNADILLO MARTÍNEZ, María José.; GARCÍA GARCÍA, María Inmaculada.; GARCÍA SÁNCHEZ, Enrique. & GARCÍA SÁNCHEZ, José Elías. Los carbapenems disponibles: propiedades y diferencias. En: *Facultad de Medicina, Universidad de Salamanca* [en línea]. 2010. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <https://www.elsevier.es/index.php?p=revista&pRevista=pdf-simple&pii=S0213005X10700318>

FUNDAMENTOS DE ESPECTROSCOPIA RAMAN. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/6887/03Rpp03de11.pdf?sequence=3&isAllowed=y>

GRUPO BIOCOTE. Five Facts about E. coli. En: *Biocote* [en línea]. 27 de julio de 2017. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en <https://www.biocote.com/blog/five-facts-e-coli/>

HIELSCHER. Efectos sonoquímicos en los procesos sol-gel. En: *Ultrasound Technology* [en línea]. 2019. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en <https://www.hielscher.com/es/sonochemical-effects-on-sol-gel-processes.htm>

IKNER, Luisa. Análisis de la curva de crecimiento bacteriano y sus aplicaciones ambientales. En: *Universidad de Arizona* [en línea]. 2019. [Consultado: 17 de marzo de 2019]. Disponible en <https://www.jove.com/science-education/10100/anlisis-de-la-curva-de-crecimiento-bacteriano-y-sus-aplicaciones?language=Spanish>

INSHT. Seguridad y salud en el trabajo con nanomateriales. En: *Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo* [en línea]. Abril de 2015. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <https://www.icms.us-csic.es/sites/icms.us-csic.es/files/SST%20con%20nanomateriales.pdf>

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. Compendio de normas para trabajos escritos. NTC-1486-6166. Bogotá D.C.: el instituto, 2018. ISBN. 9789588585673 133p.

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. Evaluación de riesgos de staphylococcus aureus enterotoxigénico en alimentos preparados no industriales en Colombia. 2010. [Consultado: 23 de agosto de 2019]. Disponible en <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/Er-staphylococcus.pdf>

KOLPINGSTR., Elma GmbH & Co KG. Elmasonic P. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en [https://www.dt-shop.com/fileadmin/media/ga/51805\\_ga\\_esp.pdf](https://www.dt-shop.com/fileadmin/media/ga/51805_ga_esp.pdf)

KON, Kateryna. Structure of Gram-negative bacteria cell wall. En: *Dreamstime* [en línea]. 2000-2019. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en <https://www.dreamstime.com/stock-illustration-structure-gram-negative-bacteria-cell-wall-labeled-d-illustration-image84181743>

KWON, Ae.; JUNG, Huh & YOUNG, Jik. "Nanoantibioticos": Un nuevo paradigma para el tratamiento de enfermedades infecciosas utilizando nanomateriales. En: *Elsevier* [en línea]. 06 de julio de 2011. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.07.002>

LABORATORYINFO.COM. Tinción de Gram: Principio, Procedimiento, Interpretación y Animación. 19 de enero de 2019. [Consultado: 17 de marzo de 2019]. Disponible en <https://laboratoryinfo.com/gram-staining-principle-procedure-interpretation-and-animation/>

LOGIES, Melissa. Gram positive vs. gram negative. En: *Scientific and Medical Illustration* [en línea]. 2017. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <https://www.melissalogies.com/scientific?lightbox=datattem-j0g2ulps>

MACDOUGALL, C.; CHAMBERS, H. F. Capítulo 55: Inhibidores de la síntesis de proteínas y diversos antibacterianos. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1882&sectionid=138617077>

MAFU, A. A., ROY, D., GOULET, J., Y SAVOIE, L. Characterization of physicochemical forces involved in adhesion of *Listeria monocytogenes* to surfaces. En: *Appl Environ Microbiol* 57. [Consultado: 12 de octubre de 2019]

MDM CIENTÍFICA S.A.S. Inserto Patrón McFarland. 05 de julio de 2017. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <http://mdmcientifica.com/wp-content/uploads/2017/07/Patr%C3%B3n-McFarland-05072017-O-P.PD-311-INSERTO-05072017-MDM-cient%C3%ADfica.pdf>

MÉNDEZ, Ángeles. Cloruro Férrico. En: *La guía Química* [en línea]. 27 de enero de 2014. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en <https://quimica.laguia2000.com/elementos-quimicos/cloruro-ferrico>

MERCK. Trietoximetilsilano. 2019. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en [http://www.merckmillipore.com/CO/es/product/Triethoxymethylsilane,MDA\\_CHEM-818819](http://www.merckmillipore.com/CO/es/product/Triethoxymethylsilane,MDA_CHEM-818819)

MORA, Xavier. Diferenciando bacterias gram+ y gram -. En: *Selecciones Avícolas* [en línea]. Febrero 2012. [Consultado: 17 de marzo de 2019]. Disponible en <https://seleccionesavicolas.com/pdf-files/2012/2/6536-diferenciando-bacterias-gran-y-gram.pdf>

OMS. Datos recientes revelan los altos niveles de resistencia a los antibióticos en todo el mundo. En: *Organización Mundial de la Salud* [en línea]. 29 de enero de 2018. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2018/antibiotic-resistance-found/es/>

ORJUELA MATEUS, Laura. Caracterización de la infección por staphylococcus aureus en población pediátrica en infantes. En: *universidad colegio mayor de nuestra señora del rosario* [en línea]. Octubre de 2016. [Consultado: 30 de septiembre de 2019]. Disponible en <https://repository.urosario.edu.co/bitstream/handle/10336/12876/OrjuelaMateus-Laura-2017.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

OVALLE, William. ¿Para qué sirve la Plancha de Calentamiento? En: *Acequilabs* [en línea]. 2019. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <https://acequilabs.com.co/blog/guias-de-uso/para-que-sirve-la-plancha-de-calentamiento/>

PATEL Vijay, BERTHOLD David, PURANIK Pravin & GANTAR Miroslav. Proyección de las cianobacterias y microalgas por su capacidad para sintetizar nanopartículas de plata con actividad antibacteriana. En: *Elsevier* [en línea]. 05 de diciembre de 2014. [Consultado: 17 de marzo de 2019]. Disponible en <https://mail.google.com/mail/u/1/?pli=1#inbox/FFNDWNXhcFbLvKsQkDHfTTgVXqbdKBCT?projector=1&messagePartId=0.7>

PEÑA, Juan; CARDONA, Eliana; RIOS, Luis. Síntesis de óxidos de silicio de altas área superficial y porosidad. Noviembre de 2008. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en <http://www.scielo.org.co/pdf/dyna/v75n156/a20v75n156.pdf>

PÉREZ, G. Ácido Ascórbico. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en <https://www.acidoascorbico.com/>

PICAZO, Juan J. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. En: *Procedimientos en Microbiología Química* [en línea]. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia11.pdf>

PÍREZ, M. & MOTA, M. Morfología y estructura bacteriana. 2008. [Consultado: 17 de marzo de 2019]. Disponible en <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/MorfologiayEstructuraBacteriana.pdf>

PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA. Práctica 23 – Escala McFarland. 02 de marzo de 2017. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <https://fiestadelosmicroorganismos.wordpress.com/2017/03/02/practica-23-escala-mcfarland/>

QUIMINET. Usos y aplicaciones del citrato de sodio. En: *QuimiNet.com* [en línea]. 02 de mayo de 2012. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en <https://www.quiminet.com/articulos/usos-y-aplicaciones-del-citrato-de-sodio-2722645.htm>

RAFFINO, María Estela. Concepto de Ácido Acético. 29 de agosto de 2019. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <https://concepto.de/acido-acetico/>

RAMÓN, Luisa. Determinación del tamaño de cristal utilizando el software Jade 6.5. En: *Universidad Nacional Autónoma de México* [en línea]. Septiembre de 2007. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <http://xml.cie.unam.mx/xml/ms/Doctos/ManualJade65.pdf>

RAYHAN, Asraful islam. Aminoglycosides Antibiotic's. 03 de junio de 2017. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <https://www.slideshare.net/RayhanPharmacy/aminoglycosides-antibiotics-76614521>

REYES, Sarai Carmina Guadarrama. Efecto antibacteriano de las nanopartículas de plata versus clorhexidina sobre streptococcus mutans y lactobacillus casei. En: *Universidad Autónoma del Estado de México* [en línea]. 18 de enero de 2013. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en <http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/49169/TESIS%20FINAL%20SARAI.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

RINCÓN O., R. J. Síntesis de cordierita mediante el método sol-gel. En: *Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia* [en línea]. 2002.

RIVERA, Channah Rock and BERENISE. La Calidad del Agua, E. coli y su Salud. En: *college of agriculture and life sciences* [en línea]. Marzo de 2014. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en <https://extension.arizona.edu/sites/extension.arizona.edu/files/pubs/az1624s.pdf>

RODRÍGUEZ-ANGELES, Guadalupe M. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli. 17 de abril de 2002. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en [http://www.adiveter.com/ftp\\_public/E.coli.pdf](http://www.adiveter.com/ftp_public/E.coli.pdf)

RODRÍGUEZ LÓPEZ, Aarón. Estudio de la síntesis y caracterización de nanopartículas de magnetita por métodos electroquímicos. En: *Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica* [en línea]. Noviembre de 2012. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <https://cideteq.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1021/91/1/Estudio%20de%20la%20s%C3%ADntesis%20y%20caracterizaci%C3%B3n%20de%20nanopart%C3%ADculas%20de%20magnetita%20por%20m%C3%A9todos%20electroqu%C3%ADmicos.pdf>

SALUDCAPITAL. Nitrato de Plata. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en [http://biblioteca.saludcapital.gov.co/img\\_upload/57c59a889ca266ee6533c26f970cb14a/Nitrato\\_de\\_Plata.pdf](http://biblioteca.saludcapital.gov.co/img_upload/57c59a889ca266ee6533c26f970cb14a/Nitrato_de_Plata.pdf)

SÁNCHEZ CRUZ, Ramona. Fosforilación a nivel de sustrato. Fosforilación Oxidativa (Fosforilación a nivel de Cadena Respiratoria). 2016. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <https://docplayer.es/24087262-Fosforilacion-a-nivel-de-sustrato-fosforilacion-oxidativa-fosforilacion-a-nivel-de-cadena-respiratoria.html>

SÁNCHEZ MERINO José María, GUILLÁN MAQUIEIRA Cristina, FUSTER FOZ Carlos, LÓPEZ Ramiro, et al. Evolución de la resistencia a antibióticos de escherichia coli en muestras de orina procedentes de la comunidad. 2008. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en <http://scielo.isciii.es/pdf/urol/v61n7/02.pdf>

SEIJA, Verónica. Cocos gram positivos: Aspectos prácticos. En: *Higiene.edu* [en línea]. 2002. [Consultado: 30 de septiembre de 2019]. Disponible en <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2019.pdf>

SHEKHAR, Agnihotri; SOUMYO, Mukherji & SUPARNA, Mukherji. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. En: *Royal Society Of Chemistry* [en línea]. 01 de noviembre de 2013. [Consultado: 22 de febrero de 2019]. Disponible en [www.rsc.org/advances](http://www.rsc.org/advances)

SIIM Küünal, SANDER Kutti, PROTIMA Rauwel, MITHU Guha, WRAGG David & ERWAN Rauwel. Biocidal properties study of silver nanoparticles used for application in green housing. En: *Springer* [en línea]. 07 de julio de 2016. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en <http://www.Springerlink.com>

SUÁREZ ÁLVAREZ, María Elena. Caracterización de tipos patógenos de *Escherichia coli* y otros peligros biológicos asociados a la leche de cabra y productos derivados. En: *Universidad de León* [en línea]. 2014. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en [https://buleria.unileon.es/bitstream/handle/10612/3607/tesis\\_8d55c0.PDF?sequence=1](https://buleria.unileon.es/bitstream/handle/10612/3607/tesis_8d55c0.PDF?sequence=1)

TAFUR, José; TORRES, Julián; VILLEGAS, María Virginia. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias gram negativas. En: *Centro Internacional de Investigaciones Médicas* [en línea]. 15 de abril de 2008. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en [http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/apua-cuba/mecanismos\\_de\\_resistencia\\_a\\_los\\_antibioticos\\_en\\_bacterias\\_gram\\_negativas.pdf](http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/apua-cuba/mecanismos_de_resistencia_a_los_antibioticos_en_bacterias_gram_negativas.pdf)

TÉCNICAS DE ANÁLISIS QUÍMICO SUPERFICIES. 23 de noviembre de 2012. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <https://ssyf.ua.es/es/formacion/documentos/cursos-programados/2012/especifica/tecnicas-instrumentales-en-el-analisis-de-superficie/26-noviembre-tecnicas-de-analisis-quimico-superficies.pdf>

TETRA PAK. Microbiología. En: *Manual de procesamiento de lácteos* [en línea]. 2019 [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <https://dairyprocessinghandbook.tetrapak.com/chapter/microbiology>

THERMO SCIENTIFIC. Horno de secado / de calor / tratamiento térmico / de cámara. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <https://www.directindustry.es/prod/thermo-scientific-laboratory-equipment/product-21327-567979.html>

TP. pHmetro (Medidor de pH). En: *Portal de Contenidos Educativos de Química General y Laboratorio Químico* [en línea]. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <https://www.tplaboratorioquimico.com/laboratorio-quimico/materiales-e-instrumentos-de-un-laboratorio-quimico/phmetro.html>

UAM. Principios del metabolismo microbiano. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en [http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/aura/Principios\\_Metabolismo\\_microbiano.pdf](http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/aura/Principios_Metabolismo_microbiano.pdf)

UAB. Ácido Nítrico. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en [https://www.uab.cat/doc/DOC\\_RiscosLab13\\_DF\\_Guia\\_us\\_Acid\\_Nitric](https://www.uab.cat/doc/DOC_RiscosLab13_DF_Guia_us_Acid_Nitric)

UAB. Hidróxido de Sodio. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <http://documentacion.ideam.gov.co/openbiblio/bvirtual/018903/Links/Guia17.pdf>

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES. Microscopía de Barrido de Electrones (MEB). [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en <https://investigaciones.uniandes.edu.co/microscopio-electronico-de-barrido-meb/>

URBAEZ, Gabriela. Glucopéptidos. 21 de abril de 2018. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <https://prezi.com/iqecjk0p8rxh/glucopeptidos/>

VIGNOLI, R.; SEIJA, V. Principales grupos de antibióticos. 2008. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA34.pdf>

XU, Chen; XIAOQUAN, Huang; CHUPING, Zheng; YANAN, Liu; TAOYUAN, Xua; JIE, Liu. Preparation of different sized nano-silver loaded on functionalized graphene oxide with highly effective antibacterial properties. En: *Journal of Materials Chemistry B* [en línea]. 2015. [Consultado: 12 de octubre de 2019]. Disponible en <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2015/tb/c5tb00280j/unauth#!divAbstract>

ZANELLA, Rodolfo. Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño. En: *MundoNano* [en línea]. Junio de 2012. [Consultado: 20 de marzo de 2019]. Disponible en [https://www.researchgate.net/publication/325305624\\_Metodologias\\_para\\_la\\_sintesis\\_de\\_nanoparticulas\\_controlando\\_forma\\_y\\_tamano](https://www.researchgate.net/publication/325305624_Metodologias_para_la_sintesis_de_nanoparticulas_controlando_forma_y_tamano)

ZHANG Xi-Feng, ZHI-GHUO Liu, WEI Shen y GURUNATHAN Sangiliyandi. Las nanopartículas de plata: síntesis, caracterización, propiedades, aplicaciones y enfoques terapéuticos. En: *Revista Internacional de Molecular Sciences* [en línea]. 13 de septiembre de 2016. [Consultado: 17 de marzo de 2019]. Disponible en <https://mail.google.com/mail/u/1/?pli=1#inbox/FFNDWNXhcFbLvKsQkDHfTTgVXqbdKBCT?projector=1&messagePartId=0.7>

## **ANEXOS**

## ANEXO A

### PROTOCOLO DE PRUEBAS DE MEDIO DE CULTIVO

1. Se realiza la prueba de tinción de gram con el fin de comprobar las cepas bacterianas a estudiar.
2. Se prepara el medio de caldo nutritivo en tubos tapa rosca con una capacidad de 10 ml, el cual se encuentra a una concentración de 8g/L.
3. Se prepara el inóculo llevándolo a una turbidez semejante a la escala de McFarland, patrón de microbiología.
4. Se preparan las diluciones escogidas para realizar el recuento de unidades formadoras de colonia.
5. Se realiza la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 560 nm para cada dilución con el fin de construir la curva de calibración para cada cepa.
6. Se prepara el medio de agar nutritivo en cajas de petri con capacidad de 24 ml, el cual posee una concentración de 23g/L.
7. Se realiza el pase de las cepas bacterianas desde el inóculo en caldo nutritivo al medio de agar nutritivo y se llevan a incubar.
8. Se realiza el recuento de colonias en superficie para cada cepa bacteriana en donde se pretende seleccionar la dilución ideal que permita cuantificar las colonias para cada una.
9. Se construye la curva de crecimiento para cada cepa bacteriana realizando lecturas de absorbancia a una longitud de onda de 560 nm durante 24 horas, con el fin de identificar el momento en el que se presenta un decrecimiento exponencial por causas naturales.

#### 1. TÉCNICA DE DILUCIÓN DE CALDO:

- 1.1. Se prepara el inóculo para cada cepa bacteriana llevándolo a la absorbancia identificada previamente que hace referencia al punto anterior al que se presenta un decrecimiento exponencial por causas naturales.
- 1.2. Se preparan 4 diluciones a las cuales se les va a realizar la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 560 nm:
  - 1.2.1. La primera de ellas con 0,1 ml del inóculo preparado y 0,9 ml de nanopartículas de hierro recubiertas en óxido de silicio con el fin de descartar el comportamiento biocida por parte del hierro.
  - 1.2.2. La segunda con 0,1ml del inóculo, y 0,9 ml del nanocompuesto de plata con una concentración del 2%.
  - 1.2.3. La tercera con 0,1 ml del inóculo y 0,9 ml del nanocompuesto de plata con una concentración del 4%
  - 1.2.4. La cuarta con 0,1 ml del inóculo y 0,9 ml del nanocompuesto de plata con una concentración del 6%

**1.3.** Se realiza la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 560 nm en cada dilución cada 10 minutos, durante 120 minutos.

**1.4.** Seguido de cada lectura, se procede a redispersar cada dilución por medio de ultrasonidos con el fin de descartar un comportamiento diferente por la sedimentación de los agentes.

**1.5.** Se identifica el comportamiento para cada agente evaluado, de manera que, se logra identificar la dosis mínima biocida capaz de generar la lisis celular de las bacterias en el tiempo de exposición.

## **2. TÉCNICA DE KIRBY BAUER:**

**2.1.** Se prepara el inóculo para cada cepa bacteriana llevándolo a la absorbancia identificada previamente que hace referencia al punto anterior al que se presenta un decrecimiento exponencial por causas naturales.

**2.2.** Se realiza la recuperación del inóculo en un medio de cultivo de Agar Müller Hinton.

**2.3.** Se toman 4 sensidiscos y se impregnan con los 4 agentes a evaluar, de manera que se distribuyen a través de la caja de petri con el inóculo previamente preparado.

**2.4.** Se somete a incubación durante 24 horas.

**2.5.** Se realiza la lectura del halo de inhibición para cada agente evaluado.

**2.6.** Se identifica la dosis mínima biocida para cada cepa bacteriana gracias a la relación de efectividad que presenta con respecto al tamaño del halo de inhibición.