



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLAS DE HIDALGO**

**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
FACULTAD DE BIOLOGÍA
FACULTAD DE INGENIERIA CIVIL**

**MAESTRIA EN CIENCIAS EN
INGENIERIA AMBIENTAL**

**“NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y ÓXIDO DE CERIO SOPORTADAS EN
CLINOPTILOLITA COMO AGENTE PARA ELIMINAR *Escherichia coli*.”**

TESIS

PRESENTA:

Q.F.B. DANTE AGUSTÍN TAPIA HERNÁNDEZ

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERIA AMBIENTAL

DIRECTOR DE TESIS:

D.C. ROBERTO GUERRA GONZÁLEZ

CO-DIRECTOR DE TESIS:

D.C. JOSÉ LUIS RIVERA ROJAS

MORELIA, MICHOACÁN, DICIEMBRE DEL 2017.

AGRADAMIENTOS.

A mis viejos, el Agus y la Yolis, por haberme apoyado a lo largo de todo este camino y soportar mis malos y buenos ratos. Por siempre apoyarme en cada uno de mis sueños y metas que me eh propuesto en esta vida sin importar aciertos o errores, por estar aquí.

A las dos mujeres que más han atormentado mi vida, mis hermanas, Karla y Citlalli, por su apoyo incondicional y soportarme aun en mis peores días.

A Tadeo, Vicky y Cons, por alegrarme la vida cada día y motivarme a desear ser una mejor persona.

A mi director de tesis, Dr. Roberto Guerra González, por su apoyo y la confianza que ha depositado en mí para la realización de este trabajo, pero sobre todo por la amistad que me ha brindado.

A mi co-director de tesis, Dr. José Luis Rivera Rojas, por haber formado parte de este proyecto. Por su apoyo, paciencia y la confianza que depósito en mí para la realización de este trabajo.

A mi mesa de sinodales, Dr. Rafael Huirache Acuña, Dr. Marco Antonio Martínez Cinco y MC. Gabriel Martínez Herrera, por su amabilidad y disponibilidad para enriquecer este trabajo de investigación con su experiencia. Por cada una de las recomendaciones y consejos que me dieron.

A CONACYT, por el apoyo económico que me brindo durante el estudio de este posgrado por medio de la beca otorgada.

A la Facultad de Ingeniería Química, por todo su apoyo en la realización de este trabajo.

A los jóvenes del laboratorio, Miriam, Wendo, Ramón, por su apoyo incondicional y entusiasmo en la presente investigación.

A toda la banderola, en especial a Emma, el char, pollo y zayra, porque a pesar de los años y las distancias siempre están ahí para apoyarme en todo momento.

A mis amigos de la maestría, Mafe, Iris, Jonathan, Lenin y Juan Carlos, por su amistad y por compartir los pocos pero agradables momentos en estos 2 años.

Han sido demasiadas las personas que han formado parte de mi vida personal y profesional que me encantaría agradecerles su apoyo, sus consejos, ánimos y en algunos de los casos su amistad.

Por todo lo que me han brindado, “gracias totales”.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	i
ÍNDICE DE TABLAS Y GRAFICAS.	iii
RESUMEN.....	iv
SUMMARY.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1. <i>Escherichia coli</i>	4
2.2. INTERACCIÓN BACTERIA-METAL	5
2.3. MECANISMOS DE LA PLATA COMO BACTERICIDA	7
2.4. METALES SOPORTADOS COMO BACTERICIDAS	7
2.5. ZEOLITAS.....	9
2.6. ZEOLITA CLINOPTILOLITA	10
2.7. OXIDO DE CERIO	11
3. JUSTIFICACION	13
4. OBJETIVO GENERAL.....	14
4.1 OBJETIVO PARTICULAR	14
5. HIPÓTESIS	15
6. METODOLOGÍA.....	16
6.1 SÍNTESIS DE CeO_2 POR EL MÉTODO SOL-GEL ASISTIDO POR MICROONDAS	17
6.2 SÍNTESIS DE CeO_2 POR EL MÉTODO DE HIDROTERMICO	18
6.3 MÉTODO DE IMPREGNACIÓN HÚMEDA INCIPIENTE	18
6.4 PREPARACIÓN DE LA CLINOPTILOLITA COMO SOPORTES	18
6.4.1 OXIDO DE CERIO SOPORTADO EN CLINOPTILOLITA	18
6.4.2 Ag SOPORTADA EN EL SOPORTE MIXTO (CLINOPTILOLITA OXIDO DE CERIO)	19
6.4.3. Ag SOPORTADA EN EL SOPORTE MIXTO (CLINOPTILOLITA - OXIDO DE CERIO).....	19
6.5. CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES.....	20

6.5.1. DIFRACCION DE RAYOS X (DRX).....	20
6.5.2. MICROSCOPIO ELECTRONICO DE BARRIDO (SEM).....	21
6.5.3. ESPECTROSCOPIA DE DISPERSIÓN DE RAYOS X (EDS).....	22
6.5.4. (BET).....	22
6.6. MATERIALES BIOLÓGICOS.....	23
6.6.1. PREPARACIÓN DE CALDOS NUTRITIVOS	23
6.6.2. PREPARACIÓN DE PLACAS CON AGAR	23
6.6.3. CEPAS BACTERIANAS	23
6.6.4. TURBIDEZ ESTÁNDAR PARA LA PREPARACIÓN DEL INÓCULO.	23
6.6.5. PREPARACIÓN DE LOS INÓCULOS.....	24
6.6.6. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) Y CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB) DE LOS MATERIALES COMO BACTERICIDAS	24
6.6.7. CRECIMIENTO BACTERIANO EN PRESENCIA DE LOS MATERIALES	25
7. RESULTADOS	27
7.1. DIFRACCION DE RAYOS X (DRX).....	27
7.2. MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO (SEM).....	30
7.3. ESPECTROSCOPIA DE DISPERSIÓN DE ENERGÍA DE RAYOS X (EDS).....	43
7.4. AREA SUPERFICIAL (BET).....	57
7.5. PRUEBAS MICRIBIOLÓGICAS PARA EVALUAR LA INHIBICION.....	57
8. CONCLUSIÓN	70
9. RECOMENDACIONES	72
10.REFERENCIAS	74
ANEXO 1.....	79
ANEXO 2.....	82

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 2.1.- (a) Estructura de la zeolita clinoptilolita, (b) anillos de 8 y 10 Tetraedros que forman las ventanas de los canales	10
Figura 6.1. Esquema para la determinación de la CMI y CMB.....	25
Figura 7.1. Patrones de difracción de rayos X: a) CeO ₂ -S, b) CeO ₂ -H, c) CeO ₂ -Ag1.5%-S, d) CeO ₂ -Ag1.5%-H.....	28
Figura 7.2. Patrones de difracción de rayos X: a) CLIPCeO ₂ -I, b) CLIPCeO ₂ -Ag1.5%-I, c) CLIPCeO ₂ -AG1.5%-IR, d) CLIPCeO ₂ -P, e) CLIPCeO ₂ -Ag1.5%-P, f) CLIPCeO ₂ -Ag1.5%-PR..	29
Figura 7.3. Micrografías de; A) clinoptilolita, B) CeO ₂ -S y C) CeO ₂ -H.....	31
Figura 7.4. Micrografías de CLIPCeO ₂ -I A) 500X, B) 10000X.....	32
Figura 7.5. Micrografías de CLIPCeO ₂ -P A) 500X, B) 10000X.....	33
Figura 7.6. Micrografías de CeO ₂ -Ag1.5%-H A) 500X, B) 5000X.....	34
Figura 7.7. Micrografías de CeO ₂ -Ag1.5%-S A) 500X, B) 5000X.....	35
Figura 7.8. Micrografía de CLIPCeO ₂ -Ag1.5%-P; A) 500X y B) 10000X.....	37
Figura 7.9. Micrografías de CLIPCeO ₂ -Ag1.5%-PR A) 500X B) 2500X, C) 10000X.....	38
Figura 7.10. Micrografías de CLIPCeO ₂ -Ag1.5%I; A) 500X y B) 10000X.....	39
Figura 7.11. Micrografías de CLIPCeO ₂ -Ag1.5%-IR A) 500X B) 5000X, C) 2500X, D) 10000X.....	40
Figura 7.12. Micrografías de CLIPCeO ₂ -Ag1.5%-IR recuperado después de su evaluación para eliminar <i>E. coli</i> A) 500X B) 5000X, C) 10000X.....	41
Figura 7.13. Micrografías de CLIPCeO ₂ -Ag1.5%-PR recuperado después de su evaluación para eliminar <i>E. coli</i> A) 500X B) 2500X.....	42
Figura 7.14. Espectro EDS de; a) zeolita clinoptilolita, b) CLIPCeO ₂ -P.....	45
Figura 7.15. Espectro EDS de la muestra CLIPCeO ₂ -Ag1.5%-P.....	46
Figura 7.16. Espectro EDS de la muestra CeO ₂ -S.....	47
Figura 7.17. Espectro EDS de la muestra CeO ₂ -Ag1.5%-H.....	48
Figura 7.18. Espectro EDS de la muestra CeO ₂ -Ag1.5%-H (recuperado).....	49
Figura 7.19. Análisis elemental EDS de cerio sobre la superficie de los soportes; A) CLIPCeO ₂ -I, B) CLIPCeO ₂ -P.....	51

Figura 7.20. Análisis elemental EDS de plata sobre la superficie de los materiales A) CLIPCeO ₂ -Ag1.5%-IR, B) CLIPCeO ₂ -Ag1.5%-I, c) CLIPCeO ₂ -Ag1.5%-PR, D) CLIPCeO ₂ -Ag1.5%-P, E) CeO ₂ -Ag1.5%-H, F) CeO ₂ -Ag1.5%-S.....	52
Figura 7.21. Análisis elemental EDS de plata sobre la superficies de los materiales recuperados después de su evaluación para eliminar <i>E. coli</i> , A) CeO ₂ -Ag1.5%-H, B) CeO ₂ -Ag1.5%-S, C) CLIPCeO ₂ -Ag1.5%-P, D) CLIPCeO ₂ -Ag1.5%-I, E) CLIPCeO ₂ -Ag1.5%-I-R, F) CLIPCeO ₂ -Ag1.5%-P-R.	53
Figura 7.22. Análisis elemental EDS de fosforo sobre la superficies de los materiales recuperados después de su evaluación para eliminar <i>E. coli</i> , a) CeO ₂ -Ag1.5%-H, b) CeO ₂ -Ag1.5%-S, c) CLIPCeO ₂ -Ag1.5%-P, d) CLIPCeO ₂ -Ag1.5%-PR, e) CLIPCeO ₂ -Ag1.5%-IR.....	55
Figura 7.28. Comparativo del efecto inhibitorio que presentan los materiales sobre <i>E. coli</i>	
Figura 12.1. Efecto inhibitorio de los materiales CeO ₂ sobre <i>E. coli</i>	82
Figura 12.2. Efecto inhibitorio de los materiales CLIPCeO ₂ sobre <i>E. coli</i>	83
Figura 12.3. Efecto inhibitorio de los materiales CLIPCeO ₂ -Ag%-I sobre <i>E. coli</i>	84
Figura 12.4. Efecto inhibitorio de los materiales CLIPCeO ₂ -Ag1.5%-P sobre <i>E. coli</i>	85
Figura 12.5. Halos de inhibición representados por zonas claras que indican nulo crecimiento de <i>E. coli</i> , producidos por; A)CLIPCeO ₂ -I, B)CLIPCeO ₂ -Ag1.5%-I y C)CLIPCeO ₂ -Ag1.5%-IR..	86
Figura 12.6. Halos de inhibición representados por zonas claras que indican nulo crecimiento de <i>E. coli</i> , producidos por; A) CeO ₂ -S, B) CeO ₂ -Ag0.5%-S y C) CLIPCeO ₂ -Ag1.5%-S.....	86
Figura 12.7. Halos de inhibición representados por zonas claras que indican nulo crecimiento de <i>E. coli</i> , producidos por; A) CeO ₂ -H, B) CeO ₂ -Ag0.5%-H y C) CLIPCeO ₂ -Ag1.5%-H.....	87

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 7.1. Análisis elemental (% molar) de los materiales, antes y después de la interacción con <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	56
Tabla 7.2. Área superficial de los soportes.....	57
Tabla 7.3. Determinación de CMI de los materiales para eliminar <i>E. coli</i>	62
Tabla 7.4. Número de colonias de <i>E. coli</i> que sobrevivieron frente a los materiales evaluados como biocidas.....	64

RESUMEN

En el presente trabajo se realizó la síntesis de 4 distintos materiales bactericidas. Se sintetizó óxido de cerio por los métodos hidrotérmico y sol-gel asistido por microondas, los otros dos materiales consistieron en la deposición de óxido de cerio en una zeolita natural del tipo clinoptilolita por medio de los métodos de impregnación húmeda incipiente y por depósito-precipitación, los cuales se utilizaron como soporte de nanopartículas de plata. Los materiales se caracterizaron por las técnicas de difracción de rayos X y microscopia electrónica de barrido. El objetivo principal de este trabajo, fue evaluar el poder bactericida de las nanopartículas de plata soportadas en óxido de cerio y en la zeolita modificada con óxido de cerio para eliminar *Escherichia coli*. Se determinó el número de unidades formadoras de colonia mediante la técnica de conteo de colonias en placa. Se demostró la capacidad bactericida de las nanopartículas de plata soportadas en óxido de cerio y zeolita modificada con óxido de cerio con dosis de 0.006 y 0.01 g de nanopartículas de plata por mililitro de caldo de cultivo, respectivamente, dando una concentración de 1.5% en relación peso de plata en ambos casos. Los materiales sintetizados constituyen una buena alternativa como medio de soporte de nanopartículas metálicas de plata debido a que permite una deposición homogénea de éstas, además de tener la ventaja de poder reutilizarse. Finalmente, puede concluirse que el método de síntesis del soporte influye en la eficiencia bactericida del material sobre todo en los primeros minutos de acción bactericida.

Palabras clave: clinoptilolita, óxido de cerio, plata, *Escherichia coli*.

SUMMARY

In the present work, the synthesis of 4 different bactericidal materials was carried out. Cerium oxide was synthesized by the hydrothermal and sol-gel methods assisted by microwaves, the other two materials consisted of the deposition of cerium oxide in a natural zeolite of the clinoptilolite type by means of the incipient wet impregnation methods and by deposition-precipitation, which were used as support for silver nanoparticles. The materials were characterized by X-ray diffraction techniques and scanning electron microscopy. The main objective of this work was to evaluate the bactericidal power of the silver nanoparticles supported in cerium oxide and in the zeolite modified with cerium oxide to eliminate *Escherichia coli*. The number of colony forming units was determined by the plate colony counting technique. The bactericidal capacity of the silver nanoparticles supported on cerium oxide and zeolite modified with cerium oxide was demonstrated with doses of 0.006 and 0.01 g of silver nanoparticles per milliliter of culture broth, respectively, giving a silver concentration of 1.5% weight in both cases. The synthesized materials are a good alternative as a support medium for metallic silver nanoparticles because it allows a homogeneous deposition of these noble metals, as well as having the advantage of being reused. Finally, it can be concluded that the synthesis method of the support influences the bactericidal efficiency of the material, especially in the first minutes of bactericidal action.

1. INTRODUCCION

Según cifras reportadas por la organización mundial de la salud se estima que existen alrededor de 1700 millones de casos anuales de diarrea a nivel mundial, siendo las enfermedades diarreicas la causa de muerte de alrededor de 525 mil niños menores de cinco años cada año (UNICEF., 2006). La diarrea suele ser un síntoma de una infección del tracto digestivo, que puede estar ocasionada por diversos organismos bacterianos, víricos y parásitos. La infección se transmite por el consumo de alimentos o agua contaminados. Diversas enfermedades suelen ser causadas por el uso o consumo de aguas contaminadas, de las cuales algunas son relacionadas con algún tipo de microorganismo. Actualmente la transmisión de patógenos por medio del agua continúa siendo un problema grave, por lo que, los agentes antimicrobianos son necesarios para eliminar la reproducción de patógenos. Actualmente la bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) continua siendo uno de los principales microorganismos patógenos causales de diversas infecciones gastrointestinales, principalmente la diarrea y es el principal indicador de contaminación fecal en aguas.

La plata y otros metales pueden llegar a ser muy efectivos en la inhibición del crecimiento bacteriano y son preferibles a otros agentes antibacterianos, ya que no representan un alto riesgo ni cambian las características fisicoquímicas del agua, minimizando la formación de subproductos durante el proceso de desinfección. Los cúmulos y nanopartículas de plata soportados en diferentes matrices que permiten su liberación controlada al medio están siendo utilizados como bactericidas inorgánicos de amplio espectro. Estos productos bactericidas se desarrollan en matrices como fibras de carbono, partículas de SiO₂ y TiO₂ y zeolitas (Concepción-Rosabala et al., 2008).

Tomando en cuenta lo anterior, se realizó este proyecto de investigación orientado a la aplicación de materiales con una alta área específica, a los cuales se les incorporo nanopartículas de plata, lo anterior con el objetivo de estudiar su eficiencia como agentes para eliminar el crecimiento de *Escherichia coli* (*E. coli*).

2. ANTECEDENTES.

Los riesgos epidemiológicos, relacionados con el consumo de alimentos y agua contaminados por microorganismos virulentos son causales del cólera, fiebres tifoideas, entre otras. Una contaminación microbiológica puede afectar a algunas personas o a comunidades enteras, dependiendo de la calidad o del tipo de microorganismo, su modo de transmisión, así como del perfil de las personas contaminadas. La contaminación microbiológica del agua ocurre por lo general a través de aguas residuales con heces de origen humano o animal (Pulido et al., 2005) . El riesgo de contraer una infección por microorganismos patógenos depende de su grado de invasión, de su dosis mínima infectante así como del nivel inmunológico del organismo huésped. Algunas bacterias patógenas pueden incluso multiplicarse en los alimentos y las bebidas, lo que aumenta los riesgos de infección. Debido a estas condiciones, en el caso de los microorganismos patógenos no existe un límite inferior tolerable; por lo que el agua destinada para el consumo (alimentos y bebidas), y a la higiene personal no debe contener ningún agente patógeno para los seres humanos (NMX-AA-42-SCFI, 2000; NOM-127-SSA1,1994) .

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

Las bacterias patogénicas, como *Salmonella typhi* (*s. typhi*) y *Escherichia coli* (*E. coli*), son de particular interés por ser transmisoras de enfermedades por alimentos; son causantes de enfermedades peligrosas, como la salmonelosis en el caso de la *S. typhi* y el síndrome urémico hemolítico por *E. coli*, ambas con consecuencias graves y permanentes para el ser humano. Stoimenov y colaboradores han demostrado que las nanopartículas elementales oxidantes altamente reactivas, como oro, plata y cobre, muestran excelentes propiedades bactericidas contra las bacterias gram negativas y gram positivas (Stoimenov et al., 2002). Debemos de tener en cuenta que, la meta del tratamiento de aguas residuales nunca ha sido la obtención de un producto estéril, si no el hecho de reducir el nivel de microorganismos dañinos para la salud del usuario a niveles más seguros de exposición.

La desinfección es la destrucción de los microorganismos patógenos del agua ya que su presencia en el líquido es perjudicial para la salud. Existen diferentes desinfectantes, que

pueden eliminar o desactivar los microorganismos patógenos. Entre estos están el cloro o sustancias que contienen derivados del cloro, ozono, rayos UV, y plata entre otros.

Para la desinfección de aguas el más utilizado en la actualidad debido a su bajo costo, es el cloro o compuestos clorados que causan alteraciones físicas, químicas y bioquímicas en la pared celular, de esta forma se destruye la barrera protectora de la célula de los microorganismos dejándola indefensa y disminuyendo sus funciones vitales hasta llevarla a la muerte. Una de las principales desventajas del uso de cloro y derivados es que reacciona con mucha materia orgánica y da lugar a compuestos trihalometanos (THMs) muchos de los cuales se ha demostrado son tóxicos o carcinogénicos (Rook, 1974). Otro inconveniente es la formación de clorofenoles en aguas que contienen fenoles, lo que daría lugar a problemas de salud como alteraciones histopatológicas, genotoxicidad, mutagenicidad, y carcinogenicidad (Backhaus et al., 2010).

El ozono debido a que es la forma más activa del oxígeno es capaz de destruir virus, bacterias, parásitos, priones, hongos, mohos, esporas y muchos otros contaminantes por oxidación en pocos segundos. Una ventaja del ozono es que no deja residuos en la sustancia a desinfectar, ya que al ser muy reactivo, rápidamente se descompone en oxígeno. No obstante la desventaja del ozono es que, dada su inestabilidad, es muy difícil almacenarlo, por lo que se tiene que producir justo en el lugar donde se aplica, lo cual resulta en un método costoso (Parish et al., 2003).

La desinfección por rayos ultravioleta es un método donde se utilizan ondas cortas de radiación ultravioleta que inciden sobre el material genético (ADN) de los microorganismos y los virus (Montsoriu & de Dios, 1996), destruyéndolos en corto tiempo, sin producir cambios físicos o químicos notables en el agua tratada, sin embargo tiene como desventaja que la luz ultravioleta también se aplica en el momento. Esto quiere decir que después de la desinfección por este sistema hay que aplicar un compuesto químico para garantizar la seguridad microbiológica.

Los efectos bactericidas de la plata o de las sales de plata son bien conocidos (Silver, 2003), sin embargo, los métodos de acción no son muy claros. Se ha determinado que la plata tiene efecto en bacterias Gram negativas como *Escherichia coli*, *Vibrio cholera*, y *Pseudomonas aeruginosa* (Morones et al., 2005; Sondi & Salopek-Sondi, 2004), *Staphylococcus aureus* (Shrivastara et al., 2007), *Enterococcus faecalis* (Panacek et al., 2006), e incluso se ha

determinado la capacidad antiviral de nanopartículas de plata en virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (Echiguerra et al., 2005; Lara et al., 2010).

Los estudios microbiológicos in vitro han mostrado que las partículas subnanométricas de plata soportadas en zeolita clinoptilolita natural poseen una alta actividad bactericida y antiviral comparable con la de los iones de Ag^+ y son mucho más activas que nanopartículas de mayor tamaño. Guerra y colaboradores han demostrado que las nanopartículas de plata y oro de tamaños de 10 a 20 nm soportadas en zeolitas presentan mayor efecto bactericidas para las bacterias gram negativas, *E. coli* y *S. typhi* que nanopartículas de menor tamaño, sin determinar sus características morfológicas (Guerra et al., 2013; Guerra et al., 2012).

2.1. *Escherichia coli*.

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

Es una de las especies bacterianas más minuciosamente estudiadas, no solamente por sus capacidades patogénicas, sino también como sustrato y modelo de investigaciones metabólicas, genéticas, poblacionales y de diversa índole (Neidhardt & Curtiss, 1999). Se trata de bacterias de rápido crecimiento y amplia distribución en el suelo, el agua, vegetales y gran variedad de animales.

Son bacilos gram negativos poco exigentes en sus necesidades nutritivas y relativamente resistentes a los agentes externos, presenta diferentes factores de virulencia (por ejemplo, adhesinas, invasinas, y toxinas) que son responsables de una amplia gama de enfermedades diarreicas (Nataro & Kaper, 1998). Como integrante de la flora normal del hombre y de muchos animales, se le considera un germen indicador de contaminación fecal cuando está presente en el ambiente, agua y alimento.

Las *E. coli* diarreagénicas se clasifican en seis patotipos: *E. coli* enteropatógena, *E. coli* enterotoxigénica, *E. coli* enterohemorrágica, *E. coli* enteroinvasiva, *E. coli* difusamente adherente, y *E. coli* enteroagregativa (Nataro, 2005). La *E. coli* enteroagregativa se considera la principal causa de brotes de diarrea en Europa, el Reino Unido, Suiza y Japón. La *E. coli*

enteroagregativa y la *E. coli* enterotoxigénica son causales de diarrea bacteriana y es común en los países en desarrollo (Nataro et al., 2006; Rüttler et al., 2002).

2.2. INTERACCIÓN BACTERIA-METAL.

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

Para llevar a cabo sus funciones metabólicas, los microorganismos requieren de la presencia de algunos iones inorgánicos esenciales, como los iones de los metales calcio, magnesio, sodio, potasio y manganeso. Algunos metales presentes en el ambiente son intrínsecamente tóxicos y carecen de actividad biológica (como los metales pesados: plomo, mercurio, cadmio, cobre, plata, etc.), o bien son esenciales pero presentan toxicidad cuando se encuentran en concentraciones relativamente elevadas, es el caso de cobre, zinc, cobalto, níquel, etc., aunque los mecanismos de toxicidad de los metales son diversos, los procesos más comunes involucran una interferencia con el transporte y la función de los iones fisiológicos esenciales, o la integración con las macromoléculas celulares tales como las enzimas y los ácidos nucleicos. Los iones que interactúan con las células bacterianas pueden clasificarse en tres grupos (Silver, 1983):

- ✚ Iones esenciales. Se refiere a aquellos iones que son indispensables para el desarrollo bacteriano, como Mg^{2+} , K^+ , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , que son considerados como nutrientes; en este grupo están también aquellos que la célula requiere en menores cantidades como Mn^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , que son considerados como micronutrientes o minerales traza.
- ✚ Iones no esenciales. Son iones que, a pesar de su abundancia natural, no son indispensables para el metabolismo bacteriano; entre ellos están Na^+ y Cl^- . Las bacterias los utilizan en procesos regulatorios o en funciones de las proteínas accesorias de las células (filamentos del citoplasma).
- ✚ Iones tóxicos. Son iones que, dada su interacción con las macromoléculas celulares, son altamente nocivos para el desarrollo bacteriano; incluyen los iones: Hg^{2+} , AsO_4^{3-} , AsO_2^- , Cd^{2+} , Ag^+ , Pb^{2+} , CrO_4^{2-} , TeO_3^{2-} , Cu^{2+} , SbO_2^- , y otros. Las células bacterianas han

elaborado mecanismos de resistencia a iones tóxicos; estos mecanismos son muy específicos, codificados por genes que se encuentran en plásmidos o en transposones (Silver et al., 1989).

Los principales mecanismos mediante los cuales las bacterias interactúan con los metales tóxicos son (Cervantes & Silver, 1992)

- a) La precipitación extracelular de los iones tóxicos por sustancias excretadas por las bacterias.
- b) La unión de los cationes metálicos con las cubiertas celulares, por lo general con las cargas negativas de los constituyentes de la pared celular
- c) La acumulación intracelular mediante la unión de los metales a componentes citoplásmicos.
- d) Las reacciones redox que convierten a algunos iones en especies químicas menos tóxicas.
- e) Los sistemas de expulsión de la membrana que impiden la acumulación de los iones nocivos.

En las bacterias, los genes se hallan agrupados en los cromosomas. La reproducción de las bacterias puede inhibirse por los iones de los metales pesados tóxicos, pero a la vez las bacterias pueden desarrollar resistencia al efecto tóxico del metal. Los genes que confieren esta resistencia a los metales pesados generalmente se localizan en los plásmidos, fuera del cromosoma bacteriano. Las estrategias bacterianas más eficientes para resistir a los metales tóxicos, son probablemente las que provocan la expulsión del metal (en su forma de ion) desde el interior de las bacterias hacia el medio externo; de esta forma disminuye la concentración del ion dentro de la célula y, por lo tanto, se reduce su toxicidad (Vargas et al., 1998).

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

La plata es tóxica para las bacterias a concentraciones tan bajas como 0.5 μM (Tuovinen et al., 1985). Los niveles de tolerancia a iones metálicos dependen de la cepa y del estado fisiológico del organismo, de su historia previa a la exposición del metal tóxico y de las condiciones ambientales (Cooper, 2004). Las paredes de las células gram positivas contienen de 3 a 20 veces más peptidoglucano que una especie gram negativa. Debido a que los peptidoglucanos

pueden asimilar protones, las bacterias gram positivas son generalmente menos sensibles a agentes antimicrobianos que contienen iones de metales pesados que las especies gram negativas (Kawahara et al., 2000).

2.3. MECANISMOS DE LA PLATA COMO BACTERICIDA.

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

La plata reacciona con los grupos azufrados de las membranas de las enzimas, provocando que la membrana pierda permeabilidad; la bacteria no es capaz, entonces, de efectuar procesos de respiración y muere (Feng et al., 2000).

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

El mecanismo probable de la plata como bactericida puede ser el siguiente: Los iones de plata (Ag^+) en contacto con las bacterias penetran la membrana celular, destruyendo la proteína de la bacteria eliminando la síntesis del ADN bacteriano. Finalmente, cuando la plata iónica interactúa con los grupos sulfhidrilos ($-\text{SH}$) de la enzima de los microorganismos, se forma un enlace S-Ag , bloqueando la actividad enzimática e impidiendo su respiración, provocando la muerte del microorganismo (Yan & Cheng, 2005).

2.4. METALES SOPORTADOS COMO BACTERICIDAS.

El objetivo de utilizar un soporte para dispersar el metal es maximizar la superficie activa. Los soportes, sin embargo, son muchos y muy diferentes con respecto a sus propiedades físico-químicas, que a su vez determinan las propiedades de los metales soportados. Las partículas

de plata soportada pueden usarse para inhibir el crecimiento de patógenos, ya sea añadiéndolas directamente en agua o incorporándolas en varios materiales.

Existen antecedentes del uso de zeolitas como soportes de materiales para la desinfección de los efluentes de procesos biológicos aerobios y anaerobios. Se aplican para evitar la propagación de ciertos organismos que producen patologías al hombre. Se han realizado numerosos estudios con zeolitas naturales, demostrándose sus efectos bactericidas sobre aquellos organismos presentes en las aguas residuales y en los efluentes de desechos sólidos. Los metales soportados en zeolitas naturales son elementos que, dependiendo de su naturaleza y su concentración en un medio determinado, pueden ejercer diferentes efectos sobre los microorganismos, por ejemplo, a partir de determinadas concentraciones, son inhibidores microbianos (De la Rosa-Gómez et al., 2008; Rivera-Garza et al., 2000).

Los cúmulos y nanopartículas de plata soportados en diferentes matrices que permiten su liberación controlada al medio están siendo utilizados como bactericidas inorgánicos de amplio espectro. Estos productos bactericidas se desarrollan en matrices como fibras de carbono, partículas de SiO₂, TiO₂ y zeolitas (Concepción-Rosabala et al., 2008).

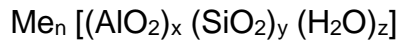
Se ha encontrado en estudios microbiológicos “in vitro” que las partículas sub-nanométricas soportadas en la zeolita clinoptilolita natural cuentan con una actividad bactericida y antiviral comparable con la de los iones de Ag⁺ y mucho más activas que las nanopartículas de mayor tamaño (Bogdanchikova et al., 2000).

En 2011, Kamyar Shameli y colaboradores encontraron actividad antibacteriana de zeolitas dopadas con nanopartículas de plata, la cual se le realizó contra bacterias gram negativas (*Escherichia coli* y *Shigella dysenteriae*) y bacterias gram positivas (*Staphylococcus aureus* resistente a la metilicina y *Staphylococcus aureus*) por el método de difusión en disco usando agar Mueller-Hinton (Shameli et al., 2011).

Sobre los mecanismos de acción bactericida de la zeolita dopada con plata son dos los que se proponen. En uno la acción es a través de la liberación de iones de plata de la zeolita (CHEUN, 1996), y en el otro es la generación de especies reactivas de oxígeno generadas a partir de plata de la matriz (KOURAI, 1994; Miyoshi, Kourai, & Maeda, 1998; Miyoshi, Kourai, Maeda, et al., 1998). Es por eso que algunos investigadores señalan que el oxígeno es necesario para la actividad bactericida del sistema plata-zeolita (Inoue et al., 2002).

2.5. ZEOLITAS.

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



siendo n , x , y , z números enteros y Me un catión metálico. No obstante, en general, los materiales zeolíticos pueden contener además de Si y Al, otros elementos como V, P y Ti (Bosch et al., 2003; Carranza & Montero, 2016).

Las zeolitas se utilizan a nivel industrial en procesos de adsorción, separación de gases, catálisis e intercambio iónico (Flanigen et al., 1991). La estructura de las zeolitas se basa en tetraedros covalentes TO_4 en los que el átomo T suele ser Si, Al o Ti. Los tetraedros se unen por los átomos de oxígeno formando una red tridimensional con canales y cavidades lo suficientemente grandes como para albergar cationes y algunas moléculas pequeñas tales como agua o algunos hidrocarburos. La sustitución isomórfica de átomos de silicio por átomos de aluminio genera un exceso de carga negativa que se neutraliza por cationes.

Estos cationes ocupan posiciones poco estables y esto le confiere a la zeolita su capacidad de intercambio catiónico. La regla de Löwenstein establece que en una estructura zeolítica no pueden haber uniones Al-O-Al, es decir dos tetraedros $[\text{AlO}_4]$ vecinos. Por tanto, el valor mínimo de la relación Si/Al es 1. Una relación Si/Al baja implica un elevado número de cationes en los poros de la zeolita que originan fuertes campos electrostáticos locales e interacciones fuertes con los adsorbatos más polares. El intercambio iónico en las zeolitas depende de la naturaleza del catión (tipo, tamaño y carga), temperatura, concentración de especies catiónicas en disolución, tipo de anión asociado a la disolución catiónica, disolvente y las características estructurales de la zeolita (Bosch & Schifter, 2003).

Varias zeolitas naturales se han usado como intercambiadores iónicos en la remoción de iones amonio de aguas residuales, de iones de cesio y estroncio de desechos radioactivos y de metales pesados en aguas residuales (Kesraoui-Ouki et al., 1994; Leyva-Ramos et al., 2004; Ramos et al., 2001).

2.6. ZEOLITA CLINOPTILOLITA.

Desde el punto de vista mineral, la clinoptilolita pertenece al grupo heulandita. Son cristales monoclinicos isoestructurales del grupo espacial C2/m a temperatura ambiente. Los parametros de su celda unitaria son aproximadamente los siguientes: $a = 17.67 \text{ \AA}$, $b = 17.87 \text{ \AA}$, $c = 7.41 \text{ \AA}$, y $\beta = 116.39^\circ$ (Concepción-Rosabala et al., 2008).

La clinoptilolita presenta tres tipos de canales limitados por el sistema de anillos tetraedricos. Los canales a y b con ventanas de anillos de 10 y 8 tetraedros respectivamente, están interconectados por el canal c que está formado por sistemas de anillos de 8 miembros y que corre paralelo a los planos [100] y [102]. Las dimensiones de los canales de una zeolita tipo HEU 9 son: en la dirección [001] el canal consiste de anillos de 10 tetraedros $3.1 \times 7.5 \text{ \AA}$ (figura 2.1 a) y para la dirección [010] consiste de anillos de 8 tetraedros $3.6 \times 4.6 \text{ \AA}$ (figura 2.1 b) y en la dirección [100] consiste de anillos de 8 tetraedros $2.8 \times 4.7 \text{ \AA}$ (Baerlocher et al., 2001).

La clinoptilolita es utilizada gracias a sus propiedades adsorbentes, tiene una estructura tridimensional cristalina y cuenta con una sola celda típica; la clinoptilolita tiene algunos iones intercambiables, tales como, Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} , situados en canales que a su vez le proporcionan una alta capacidad de intercambio iónico a dicho material; estos cationes pueden ser intercambiados por cationes orgánicos e inorgánicos.

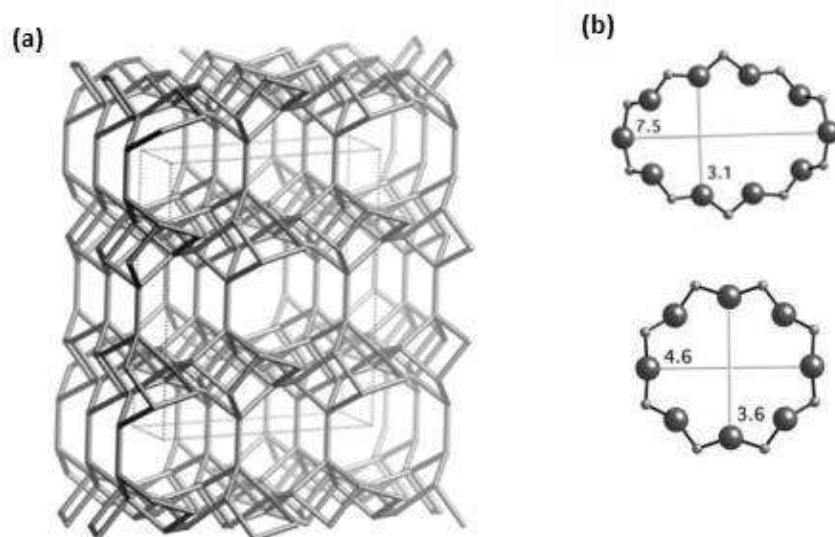


Figura 2.1.- (a) Estructura de la zeolita clinoptilolita, (b) anillos de 8 y 10 Tetraedros que forman las ventanas de los canales

2.7. OXIDO DE CERIO

El óxido de cerio puro tiene una estructura tipo fluorita, es de color amarillo claro, cuando se encuentra no estequiométrico su coloración es azul y cuando se encuentra reducido se torna color negro.

Las aplicaciones del óxido de cerio son amplias y entre ellas se encuentra su uso en productos para el pulido de cristales y lentes ópticos, en la fabricación de sensores de gases como el NO_2 y CO , como soporte catalítico o aditivo en catalizadores industriales, se utiliza comúnmente para fabricar conductores iónicos, condensadores, semiconductores y cátodos, inhibidores de corrosión en aluminio (Salazar-Banda et al., 2009), agentes en tratamiento de aguas residuales (K.-S. Lin & Chowdhury, 2010), dispositivos electrocrómicos (Štangar et al., 1997). Avances recientes en la composición del convertidor catalítico es la incorporación del óxido de cerio (CeO_2), cuya función es la de estabilizar térmicamente al catalizador así como su alta capacidad de adsorción y almacenamiento de oxígeno (Zhang et al., 2003). Además las nanopartículas de óxido de cerio son capaces de adsorber proteínas e incorporarse en células, lo cual indica que se pueden utilizar en aplicaciones médicas (Patil et al., 2007).

En catálisis su utilización se encuentra relacionada con la reversibilidad entre sus formas oxidada y reducida. El CeO_2 puede proporcionar o retirar oxígeno del medio según las necesidades del proceso, y esta propiedad le permite regular la presión de O_2 en una corriente, o proporcionar oxígeno en alguna reacción catalítica. Las propiedades, específicas para cada aplicación, dependen de su método de síntesis.

(Contreras et al., 2015).

Las propiedades redox del CeO_2 (Dowding et al., 2013) han motivado su interés en otras áreas de investigación como lo es la médica, en años recientes el estudio sobre la aplicación de nanopartículas de óxido de cerio (CeO_2) ha llevado a considerarlas como un posible agente terapéutico, ya que datos actuales sobre sus aplicaciones médicas revelan una disminución de la viabilidad de células cancerígenas (Asati et al., 2010; Kumari et al., 2014; W. Lin et al., 2006). Khan y colaboradores indican el potencial citotóxico de nanocúmulos de CeO_2 para la reducción de la viabilidad celular de células HT29, así como, un efecto mínimo en los glóbulos rojos humanos (Khan et al., 2017).

Sobre la actividad antibacteriana del óxido de cerio se ha reportado la influencia del tamaño de las nanopartículas y el pH del medio en la inhibición del crecimiento de *E.coli* (Alpaslan et al., 2017; Pelletier et al., 2010; Thill et al., 2006).

3. JUSTIFICACION

El crecimiento en el desarrollo industrial, así como, el desmedido crecimiento de la población en México y en el mundo han ocasionado la multiplicación de contaminantes en las aguas para consumo. La contaminación microbiológica del agua ocurre por lo general a través de aguas residuales con heces de origen humano o animal. Se debe tener en cuenta que una contaminación microbiológica puede afectar a algunas personas o a comunidades enteras, lo cual depende del tipo de microorganismo, su modo de transmisión, así como del perfil de las personas contaminadas. Actualmente el surgimiento de cepas de bacterias resistentes a los actuales antibióticos se ha convertido en otro problema de salud de relevancia, debido a que esto compromete la eliminación de los patógenos que dañan la salud de la población.

El uso o consumo de aguas contaminadas influye en la vida cotidiana de la población afectando sus derechos humanos; como el derecho a una vida digna, derecho a la salud, derecho al agua, derecho a un ambiente sano y derecho a una alimentación adecuada. Esta preocupación ha llevado a una investigación intensa de nuevas alternativas que nos permitan la eliminación de patógenos y el desarrollo de tecnologías sustentables, al igual que, normatividades cada vez más estrictas.

Dentro de las alternativas se encuentra el uso de plata y otros metales, los cuales han demostrado tener la capacidad para inhibir el crecimiento de microorganismos.

El CeO_2 tiene una variedad de aplicaciones como en la industria vidriera y catalizadores de autos, sin embargo, se ha encontrado que el uso de la asociación de CeO_2 y nanopartículas de plata permite la eliminación de microorganismos patógenos.

Cabe resaltar que la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de óxido de cerio ha sido poco investigada, mientras que el efecto de la actividad antibacteriana del óxido de cerio soportado en un material poroso (zeolita) no se ha reportado, por lo que este trabajo brinda información sobre la influencia de la síntesis y tipo del soporte, así como la eficiencia para eliminar la bacteria con la que cuentan los materiales aquí estudiados.

Así pues, se pretende la implementación de zeolitas dopadas con el fin de eliminar el crecimiento de microorganismos causales de enfermedades en la sociedad. La deposición de nanopartículas de plata en un soporte, también nos permite la recuperación del material evitando gastos adicionales y costosos.

4. OBJETIVO GENERAL

Sintetizar materiales que cuente con la capacidad para eliminar *Escherichia coli*, que tengan como ventaja tiempos de acción cortos, estabilidad térmica y mecánica, amplia área superficial, así como la no generación de residuos tóxicos.

4.1. OBJETIVOS PARTICULARES

- Sintetizar óxido de cerio por los métodos sol-gel e hidrotérmico.
- Obtener un soporte mixto (zeolita clinoptilolita - óxido de cerio)
- Soportar nanopartículas de plata mediante la técnica de impregnación húmeda incipiente en el soporte mixto.
- Realizar la caracterización de los materiales (soporte-metal) para obtener su estructura composición superficial.
- Evaluar la capacidad antimicrobiana con que cuentan los distintos materiales sintetizados previamente para eliminar *E. coli*.

5. HIPÓTESIS

Las nanopartículas de plata soportadas en óxido de cerio se dispersan homogéneamente sobre la superficie dependiendo del método de síntesis del soporte. Esta dispersión homogénea facilita el proceso bactericida en contra de la bacteria *E. coli*. La dispersión adicional del soporte de óxido de cerio en otro material soporte como la zeolita clinoptilolita provoca que las partículas de óxido de cerio no formen cúmulos, pero reduce el área de óxido de cerio disponible para soportar nanopartículas de plata porque parte de la superficie del óxido de cerio queda bloqueada por la superficie de la zeolita, y estos dos efectos pueden o no incrementar la actividad bactericida, lo cual se debe esclarecer.

6. METODOLOGÍA

Se realizó la síntesis de óxido de cerio (CeO_2) por los métodos sol-gel e hidrotérmico. En ambos casos se utilizó acetato de cerio (III) hidratado grado reactivo (Sigma Aldrich) como precursor. Se depositó plata a una concentración de 1.5 % en relación peso por el método de impregnación húmeda incipiente usando como precursor de plata el nitrato de plata de grado reactivo (Sigma Aldrich). Para favorecer la reducción de la plata, los materiales se sometieron a tratamientos térmicos en flujo de H_2 (30 ml/min) a 400°C .

Posteriormente se prepararon materiales de zeolita Clinoptilolita con cerio y plata, donde se llevó a cabo la deposición de cerio utilizando los métodos de impregnación húmeda incipiente por el cual se incorporara un porcentaje de 1.5 % en relación peso de cerio, y se sintetizó otro material también con una deposición de cerio utilizando el método de precipitación, para ambos casos se tuvo como precursor el nitrato de cerio amoniacal $(\text{NH}_4)_2[\text{Ce}(\text{NO}_3)_6]$ grado reactivo. Una vez obtenidos los soportes se procedió a depositar plata a una concentración de 1.5 % en relación peso por el método de impregnación húmeda incipiente usando como precursor nitrato de plata (AgNO_3) grado reactivo (Sigma Aldrich). Con el fin de favorecer la reducción de la plata, los materiales se sometieron a un tratamiento térmico en flujo de H_2 (30 ml/min) a 400°C . Por último, los materiales preparados fueron expuestos a las bacterias *E. coli* para explorar las propiedades biocidas del material.

Para el presente trabajo los materiales se nombrarán siguiendo la siguiente nomenclatura:

X-M%-S

Donde:

X= a el soporte

M= metal incorporado

%= porcentaje de metal en relación peso que se le incorporo

S= primera letra del método de síntesis del soporte

Así los materiales quedan con la siguiente nomenclatura:

a) Plata al 1.5% en peso sobre oxido de cerio sintetizado por el método hidrotérmico: CeO_2 -
Ag1.5%-H

- b) Plata al 1.5% en peso sobre óxido de cerio sintetizado por el método sol-gel: CeO₂-Ag1.5%-S
- c) Plata al 1.5% en peso sobre óxido de cerio sobre zeolita clinoptilolita sintetizado por el método de impregnación húmeda incipiente: CLIPCe-Ag1.5%-I
- d) Plata al 1.5% en peso sobre óxido de cerio sobre zeolita clinoptilolita sintetizado por el método de depósito-precipitación: CLIPCe-Ag1.5%-P.

Como experimentos de control también se estudió su capacidad bactericida, así los soportes sin nanopartículas de plata se nombraron:

- a) Óxido de cerio sintetizado por el método hidrotérmico: CeO₂-H
- b) Óxido de cerio sintetizado por el método sol-gel: CeO₂-S
- c) Óxido de cerio sobre zeolita clinoptilolita sintetizado por el método de impregnación húmeda incipiente sin reducir: CLIPCeO₂-I
- d) Óxido de cerio sobre zeolita clinoptilolita sintetizado por el método de impregnación húmeda incipiente reducido: CLIPCeO₂-IR
- e) Óxido de cerio sobre zeolita clinoptilolita sintetizado por el método de depósito precipitación sin reducir: CLIPCeO₂-P
- f) Óxido de cerio sobre zeolita clinoptilolita sintetizado por el método de depósito precipitación reducido: CLIPCeO₂-PR

6.1. SÍNTESIS DE CeO₂ POR EL MÉTODO SOL-GEL ASISTIDO POR MICROONDAS

Para la síntesis de óxido de cerio CeO₂ por el método sol-gel, se disuelve acetato de cerio con 11.6 ml de agua calentándolo a una temperatura de 60°C con agitación constante durante 4 horas, en otro vaso de precipitado se tiene el etilenglicol con 21.6 ml de agua, bajo las mismas condiciones, la función del etilenglicol será como agente gelificante. Una vez cumplido y efectuada la hidrólisis, se procede a mezclar poco a poco las dos soluciones con agitación continua, a una temperatura de 80°C hasta la obtención de un gel. Posterior a esto se somete a una temperatura de 150°C durante 20 minutos en el microondas. Se somete a calcinación durante 4 horas a una temperatura de 400°C permitiendo que el material se enfríe en el horno, y el polvo es nuevamente molido y tamizado.

6.2. SÍNTESIS DE CeO_2 POR EL MÉTODO DE HIDROTÉRMICO

En la síntesis por el método hidrotérmico, se disuelve el acetato de cerio en 10 ml de agua, calentándolo a una temperatura de 60°C durante 2 horas, y se agrega gota a gota 10 ml de solución de hidróxido de sodio. Una vez homogeneizado se somete a un tratamiento térmico por 48 horas a una temperatura de 180°C ; el polvo se saca del horno y se lava con agua hasta obtener una solución con un pH de 7. Se somete a un segundo tratamiento térmico durante 12 horas a una temperatura de 120°C . Se calcina por 4 horas a una temperatura de 400°C , y por último se macera y tamiza.

6.3. MÉTODO DE IMPREGNACIÓN HÚMEDA INCIPIENTE

Para la deposición de plata en el óxido de cerio se realiza por el método de impregnación húmeda incipiente, para la cual se hace una solución con 0.071 g de nitrato de plata (AgNO_3) en 3 ml de agua, con agitación constante hasta disolución a una temperatura de 70°C . Se coloca en baño maría a una temperatura de 70°C el polvo de óxido de cerio y se impregna gota a gota con una solución de nitrato de plata durante 2 horas; se agita y se evita que se seque la muestra. El polvo de $\text{CeO}_2\text{-Ag}$ se seca durante 12 horas a una temperatura de 100°C y se macera el polvo. Se calcina el polvo de $\text{CeO}_2\text{-Ag}$ durante 2 horas a una temperatura de 400°C .

6.4. PREPARACIÓN DE LA ZEOLITA CLINOPTILOLITA COMO SOPORTE

Se muele y tamiza (0.15 mm) la zeolita tipo clinoptilolita. Con el fin de eliminar toda clase de impurezas y homogeneizar su capacidad de intercambio catiónico, la zeolita se convierte a la forma homoiónica de sodio: el material de zeolita se trata con una solución 5 M de NaCl por 8 días para asegurarse de que el catión predominante dentro de la red cristalina sea el sodio. La zeolita se lava con agua desionizada para eliminar la presencia de iones cloruro, y al término de cada lavado se separa el sólido del líquido utilizando una centrífuga a 80 rpm. La zeolita clinoptilolita tratada con Na^+ se seca a 80°C por 12 hr.

6.4.1. ÓXIDO DE CERIO SOPORTADO EN CLINOPTILOLITA POR IMPREGNACIÓN HUMEDA INCIPIENTE.

El CeO_2 es depositado en la zeolita clinoptilolita a una relación de 1.5 % en relación peso mediante la técnica de impregnación húmeda incipiente.

Se depositó la clinoptilolita antes tratada en un crisol de cerámica, y se procedió a realizar la impregnación en un solo ciclo, a una temperatura de 70°C . Una vez alcanzado el punto final, se

secó el sólido impregnado durante 12 horas en horno marca Felisa a una temperatura de 100°C. Tras la impregnación, se hizo una molienda de la muestra y se tamizó. A continuación, se sometió a un tratamiento térmico en una mufla a una temperatura de 400 °C durante 2 horas.

6.4.2. OXIDO DE CERIO SOPORTADO EN CLINOPTILOLITA POR DEPOSITO-PRECIPITACION

Consiste en hacer precipitar los precursores de una sal en disolución sobre la superficie de un soporte poroso, el incremento gradual del pH de una disolución ácida, que contiene al soporte en suspensión, evita que los iones precipiten en la disolución o en las bocas de los poros del soporte. La dispersión metálica es homogénea y el tamaño de partícula es pequeño, en algunos casos similares a los obtenidos por intercambio iónico.

Para este trabajo se tuvo como precursor el nitrato de cerio amoniacal, zeolita natural del tipo clinoptilolita pre-tratada con una solución de cloruro de sodio al 5 M y por último, una solución de NaOH al 0.5 N como agente basificante.

Se depositó la clinoptilolita en un vaso de precipitado con una solución de nitrato de cerio amoniacal al 0.5 N y con un pH 2.5, para lo cual se le incorporo NaOH al 0.5 N como agente basificante para ajustar el pH a 5. La solución se mantuvo en agitación constante durante 4 horas a temperatura ambiente alrededor de 27 °C, transcurridas 4 h se recuperó el precipitado y se sometió a un secado en un horno marca Felisa a una temperatura de 100 °C durante 12 horas. Posteriormente se hizo una molienda de la muestra y se tamizó. A continuación, se sometió a un tratamiento térmico en una mufla a una temperatura de 400 °C durante 2 horas.

6.4.3. Ag SOPORTADA EN EL SOPORTE MIXTO (CLINOPTILOLITA - OXIDO DE CERIO)

La plata fue soportada mediante el método de impregnación húmeda incipiente a las condiciones ya antes mencionadas en el punto 7.3. Finalmente el material se trató térmicamente a 400°C con flujo de H₂ (30 ml/min) para reducir el metal y obtener las nanopartículas de plata soportadas en su forma metálica.

6.5. CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES

Con el fin de conocer algunos aspectos estructurales y morfológicos de los materiales sintetizados se analizaron por las técnicas de difracción de rayos x (por sus siglas en inglés XRD), microscopia electrónica de barrido (SEM), EDS (Energy Dispersive Xray spectroscopy) con un detector OxfordISIS acoplado a un microscopio electrónico de barrido (modelo JSM-7600 JEOL Noran Instruments). El área superficial se caracterizó mediante la técnica BET.

6.5.1. DIFRACCION DE RAYOS X (DRX)

La Difracción de Rayos X (DRX o XRD) es un método no destructivo efectivo para identificar las fases presentes en polvos policristalinos desconocidos. Su aplicación fundamental es la identificación cualitativa de la composición mineralógica de una muestra cristalina mediante el análisis de patrones de difracción recopilados de una muestra desconocida y la comparación con los patrones de difracción de compuestos conocidos.

Otras aplicaciones son el análisis cuantitativo de compuestos cristalinos, la determinación de tamaños de cristales, cálculos sobre la simetría del cristal y en especial la asignación de distancias (interplanares) a determinadas familias de planos, así como la obtención de los parámetros de la red. Las estructuras cristalinas poseen planos, producidos por ordenamientos repetitivos de átomos, que son capaces de difractar rayos-X. El fundamento de esta técnica se debe a la ley de William Bragg para interferencias constructivas. Bragg desarrolló una explicación de lo que sucedía cuando un haz monocromático de rayos-X llegaba a un cristal. Cuando un haz de rayos-X incide con un ángulo θ en una estructura ordenada la ley establece que para que las ondas reflejadas estén en concordancia de fase, y por tanto den lugar a una interferencia constructiva (difracción), es necesario que la diferencia de camino recorrido de las dos reflexiones sea múltiplo entero de la longitud de onda del haz incidente. Estas observaciones se traducen matemáticamente en la siguiente ecuación:

$$2d \sin \theta = n \lambda$$

Donde d es la distancia interplanar, n un número entero que representa el orden de difracción y λ la longitud de onda de la fuente de rayos-X.

Los sólidos que poseen suficiente orden periódico son cristalinos y por tanto dan lugar a patrones de difracción bien definidos. Las distancias entre los diferentes planos que definen la red cristalina determinan el valor del ángulo de Bragg, cuya posición se considera como “huella

única” del sólido ordenado. De este modo, los patrones de difracción suministran información inequívoca de la estructura cristalina. La posición angular de los máximos de difracción se relaciona con los parámetros de la celda unitaria mientras que las intensidades reflejan la simetría de la red y la densidad electrónica dentro de la celda unitaria.

Para este trabajo la caracterización de los materiales se hizo en un equipo de difracción de rayos-X modelo D8 ADAVANCE DAVINCI usando radiación $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1.54 \text{ nm}$), Las condiciones de operación fueron con un tamaño de paso de $0.04\theta^\circ$ en un intervalo de análisis de $15\text{-}85^\circ$, a un voltaje de 35 KeV y una corriente de 30 mA .

6.5.2. MICROSCOPIO ELECTRONICO DE BARRIDO (SEM)

El microscopio electrónico de barrido o SEM (de Scanning Electron Microscopy) es un instrumento de gran utilidad para examinar y analizar características morfológicas de muestras sólidas. Las razones de esta utilidad son la alta resolución, la gran profundidad de foco que le da apariencia tridimensional, así como la fácil preparación de las muestras e interpretación de los resultados.

Las espectroscopias electrónicas (MEB, MET, etc.) se basan en el análisis de la distribución de energía de los electrones emitidos desde la superficie de un sólido, presentando energías características propias que dependen de los tipos de átomos que hay en la superficie y de las interacciones electrónicas que existen entre ellas. La microscopía electrónica es una técnica que permite obtener información local de la muestra objeto de estudio. En un microscopio electrónico de barrido, el haz pasa a través de las lentes condensadoras y objetivos, y es barrido a lo largo de la muestra por las bobinas de barrido, mientras que un detector cuenta el número de electrones secundarios de baja energía emitidos por cada punto de la superficie dando morfología y topografía a la superficie de estudio. Para el análisis se usó un microscopio electrónico de barrido modelo JSM-7600 JEOL Noran Instruments a 15keV y 10^{-6} mmHg .

Antes de introducir la muestra a analizar se realizó un recubrimiento metálico con cobre para que exista conductividad eléctrica. Una vez metalizadas, las muestras se adhirieron a cinta de carbono como porta muestras para finalmente ser introducidas en el microscopio.

6.5.3. ESPECTROSCOPIA DE DISPERSIÓN DE RAYOS X (EDS)

La espectroscopia de dispersión de rayos X es una herramienta analítica usada para la caracterización química, esta permite la especificación de los elementos presentes del área que se encuentre bajo observación en el microscopio (SEM o TEM).

Su funcionamiento se basa en la captación de los fotones de alta energía que emite cada elemento al ser bombardeado por el haz primario (rayos X característicos). Este tipo de señales es específico de cada elemento de la superficie de la muestra y siendo captada por un detector especial que posee la propiedad de transducir cada señal en un pulso específico, que es conducido a un sistema que compara esta información con un banco de datos de los diferentes elementos de la tabla periódica. La ocupación de las vacancias por electrones de capas más externas es un proceso que le es característico a cada tipo de elemento y es lo que permite identificarlos (Bozzola & Russell, 1999).

El sistema está dotado de un programa que nos permite la realización gráfica del espectro de picos de energía correspondientes a cada uno de los elementos que constituyen el área estudiada, además de ser posible conocer de manera semicuantitativa el porcentaje de cada uno de ellos. El análisis cualitativo determina cuáles elementos están presentes en la muestra al identificar los picos en el espectro, mientras que el análisis cuantitativo es usado para determinar la concentración de los elementos presentes, a partir de las intensidades de los picos correspondientes, ya sea en comparación con otros elementos presentes o con estándares.

6.5.4. (BET)

Esta técnica nos permite determinar el área superficial de un sólido. La adsorción de N_2 a 77 K es la que más se utiliza: cubre todo el rango de porosidad e interacciona débilmente con la mayoría de los sólidos. El análisis de las isotermas de adsorción permite determinar el área superficial específica aplicando el modelo de Brunauer, Emmett y Teller (BET).

La ecuación de Brunauer, Emmett y Teller, conocida como ecuación BET es aplicable únicamente a fenómenos de adsorción física. Esta se basa en la consideración de las fuerzas de atracción de van der Waals como únicas responsables del proceso de adsorción. La idea básica de este método se basa en conocer la cantidad de gas requerido para formar una monocapa.

6.6. MATERIALES BIOLÓGICOS.

6.6.1. PREPARACIÓN DE CALDOS NUTRITIVOS.

El caldo soya tripticaseína se preparó según las indicaciones del fabricante. Después de esterilizarse en autoclave, se dejó enfriar a temperatura ambiente (en forma estéril bajo campana de flujo laminar). Se agregó 10 mL de caldo en tubos de ensaye con tapa rosca, en condiciones asépticas.

6.6.2. PREPARACIÓN DE PLACAS CON AGAR.

Los agares soya tripticaseína, Müller-Hinton y MacConkey, se prepararan según las indicaciones del fabricante. Después de esterilizarse, se dejaron enfriar en un baño de agua a 45-50 °C (en forma estéril bajo campana de flujo laminar con luz ultravioleta). Se vertieron 20 ml de los preparados en cajas Petri de 100 mm de diámetro, para dar un espesor uniforme de aproximadamente 3 mm. Las placas se dejaron solidificar a temperatura ambiente, evitando la acumulación de gotas de condensación en la tapa. Las placas preparadas se envolvieron en plástico, para minimizar el secado de los agares, y se almacenaron en refrigerador a 4°C.

6.6.3. CEPAS BACTERIANAS.

Se utilizó una cepa de *Escherichia coli* (*E. coli*) con el número de Colección de Cepas Americana en ingles American Type Culture Collection (ATCC) 25922. La cepa en estudio, fue proporcionada por el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Michoacán siguiendo los lineamientos aplicables, la cual se hizo crecer en tubos en plano inclinado de agar soya tripticaseína a 37 °C por 24 h, y se sembraron cada 24 h por 5 días para garantizar la fase exponencial de crecimiento. Estas cepas fueron conservadas a 4°C, con el fin de mantener la viabilidad.

6.6.4. TURBIDEZ ESTÁNDAR PARA LA PREPARACIÓN DEL INÓCULO.

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

6.6.5. PREPARACIÓN DE LOS INÓCULOS.

Para la preparación de los inóculos se tomaron 3 colonias aisladas del mismo tipo de morfología de las cepas mantenidas en cuñas de agar soya tripticaseína, y se hicieron crecer en tubos con 5 ml de caldo de soya tripticaseína a 37 °C hasta alcanzar la turbidez estándar. Esta suspensión contendrá aproximadamente 1×10^8 Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/ml de *E. coli*. Los inóculos se resembraron cada 24 h por 5 días para confirmar la fase exponencial de crecimiento. Estas cepas fueron conservadas a 4 °C, con el fin de mantener la viabilidad.

6.6.6. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) Y CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB) DE LOS MATERIALES COMO BACTERICIDAS.

Para evaluar la sensibilidad de la bacteria hacia el material, se expuso una pequeña cantidad del material con la bacteria en agar Müller-Hinton (MH) con base en el método de difusión en disco, se incubaron por 24 h a una temperatura de 37 °C y se observaron para analizar la presencia de un posible halo, el cual indique una nula resistencia de la bacteria a nuestro material.

Para valorar la capacidad bactericida de los materiales se realizara la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), donde a tubos inoculados con una cantidad de la bacteria se le incorporaran distintas cantidades del material.

Se emplearon dos controles: el primero fue el control positivo (caldo de soya tripticaseína al que se añadió la suspensión bacteriana) y el segundo fue el control negativo (caldo de soya tripticaseína sin antimicrobiano y sin suspensión bacteriana). Los tubos inoculados con una cantidad calibrada de los microorganismos y los materiales bactericidas se incubaron por 24 h a una temperatura de 37 °C. En aquellos tubos donde la bacteria se desarrolló, se observa turbidez.

La CMI fue interpretada como la concentración de antimicrobiano contenida en el tubo de la serie que inhibió el crecimiento visible de la bacteria, para lo cual fue necesario comparar cada uno de los tubos con los controles positivo y negativo.

Los tubos en donde no hubo crecimiento fueron sembrados en agar MH, para determinar la concentración mínima bactericida (CMB) como se aprecia en la Figura 6.1.

Para determinar la CMB se extrajeron 100 µL de los tubos en los cuales no se observó crecimiento visible de la bacteria (inhibición de crecimiento); esta suspensión fue inoculada en

placas Petri con agar soya tripticaseína debidamente rotuladas con la concentración correspondiente. Se utilizó como control positivo agar soya tripticaseína con 100 μL de inóculo sin antimicrobiano, y como control negativo, agar MH sin inóculo y sin antimicrobiano. Las placas se dejaron incubar durante 24 h a 37 °C. La lectura de los resultados se realizó en aquellas placas donde el antimicrobiano fue capaz de eliminar completamente el desarrollo bacteriano o que eliminó al 80% de bacterias, comparándolo con el control positivo.

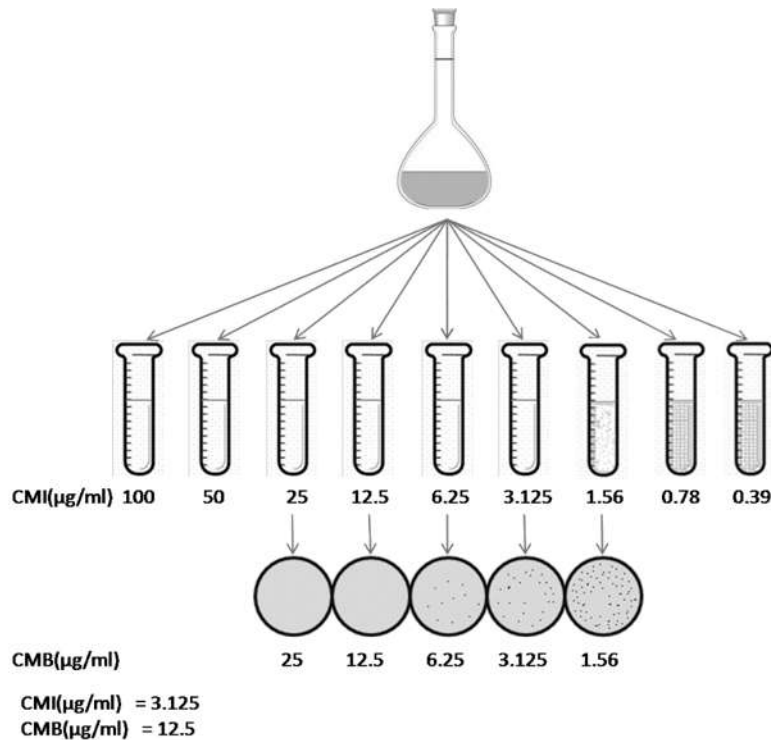


Figura 6.1. Esquema para la determinación de la CMI y CMB.

6.6.7. CRECIMIENTO BACTERIANO EN PRESENCIA DE LOS MATERIALES.

Se determinó el crecimiento de las bacterias en presencia de los materiales propuestos como biocidas. Para ello, se valoró la capacidad bactericida de los materiales en relación con el tiempo y la CMB promedio. Se enfrentó un inóculo normalizado a concentraciones fijas de antimicrobiano en un caldo. Se inoculó 0.1 ml de muestra de los sistemas líquidos con bacterias (*E. coli*), en 10 ml de caldo de soya tripticaseína contenido en tubos de ensaye con tapa rosca. Se agregó una cantidad de material bactericida a cada tubo y se sometieron a una agitación de 30 rpm. Se tomaron muestras a diferentes tiempos (0, 5, 15, 30, 60, 90 y 120 min). La muestra

tomada se sembró en cajas Petri con 20 ml de agar McConkey por la técnica de estriado en placa.

Como control, una placa se inoculó con cultivo sin material bactericida, al comienzo y al final. Las placas se incubaron invertidas a 37°C por 24 horas para posteriormente llevar a cabo el conteo de colonias.

7. RESULTADOS.

Los resultados obtenidos para este trabajo nos han permitido conocer y evaluar las capacidades con las que cuentan los materiales sintetizados para eliminar las bacterias, y también nos ha podido realizar un estudio comparativo de los efectos del métodos de síntesis sobre dichas propiedades bactericidas.

7.1. DIFRACCION DE RAYOS X (DRX)

Los patrones de difracción de rayos X, se han obtenido en un difractómetro que está acoplado a un sistema informático que permite el control del difractómetro, la adquisición y el posterior tratamiento de los datos. En la figura 7.1 se aprecian los patrones de difracción de rayos X correspondientes a las muestras sin plata $\text{CeO}_2\text{-S}$, $\text{CeO}_2\text{-H}$, así como las muestras con plata $\text{CeO}_2\text{-Ag1.5\%-S}$ y $\text{CeO}_2\text{-Ag1.5\%-H}$, los cuales presentan picos definidos correspondientes a la fase cristalina de óxido de cerio en su forma de cerianita, además se percibe también la presencia de picos de muy baja intensidad que se atribuyen a la plata.

La figura 7.2 muestra los patrones de difracción de rayos X, donde se exhiben picos de gran intensidad asociados a la zeolita clinoptilolita, también se encuentran picos atribuidos a la fase cristalina de óxido de cerio en su forma de cerianita y se encuentran picos de corta intensidad que corresponden a la plata.

Se compararon los patrones de difracción de la zeolita original y de la modificada con CeO_2 . Se observa que parte de la cristalinidad se altera cuando usamos el método de depósito-precipitación, las razones principales son las características de la solución empleada para el intercambio, es decir, el Ce^{+4} en solución tiene un pH ácido mismo que destruye parte de la red cristalina de la zeolita. Para el método de impregnación húmeda incipiente, los difractogramas indican que la estructura de la zeolita se conservó después de la deposición del óxido de cerio y la plata.

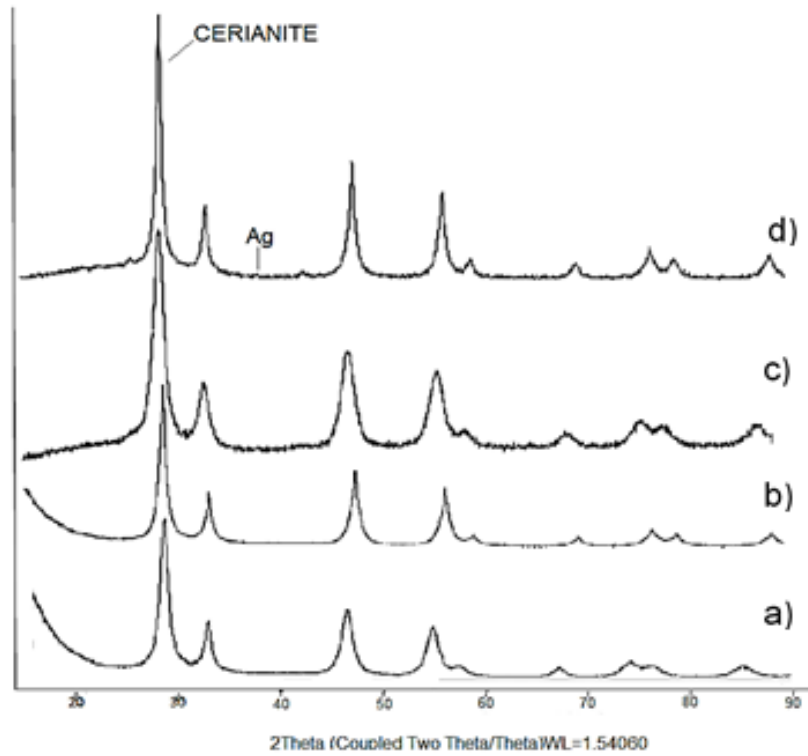


Figura 7.1. Patrones de difracción de rayos X; a) $\text{CeO}_2\text{-S}$, b) $\text{CeO}_2\text{-H}$, c) $\text{CeO}_2\text{-Ag 1.5\%-S}$, d) $\text{CeO}_2\text{-Ag 1.5\%-H}$

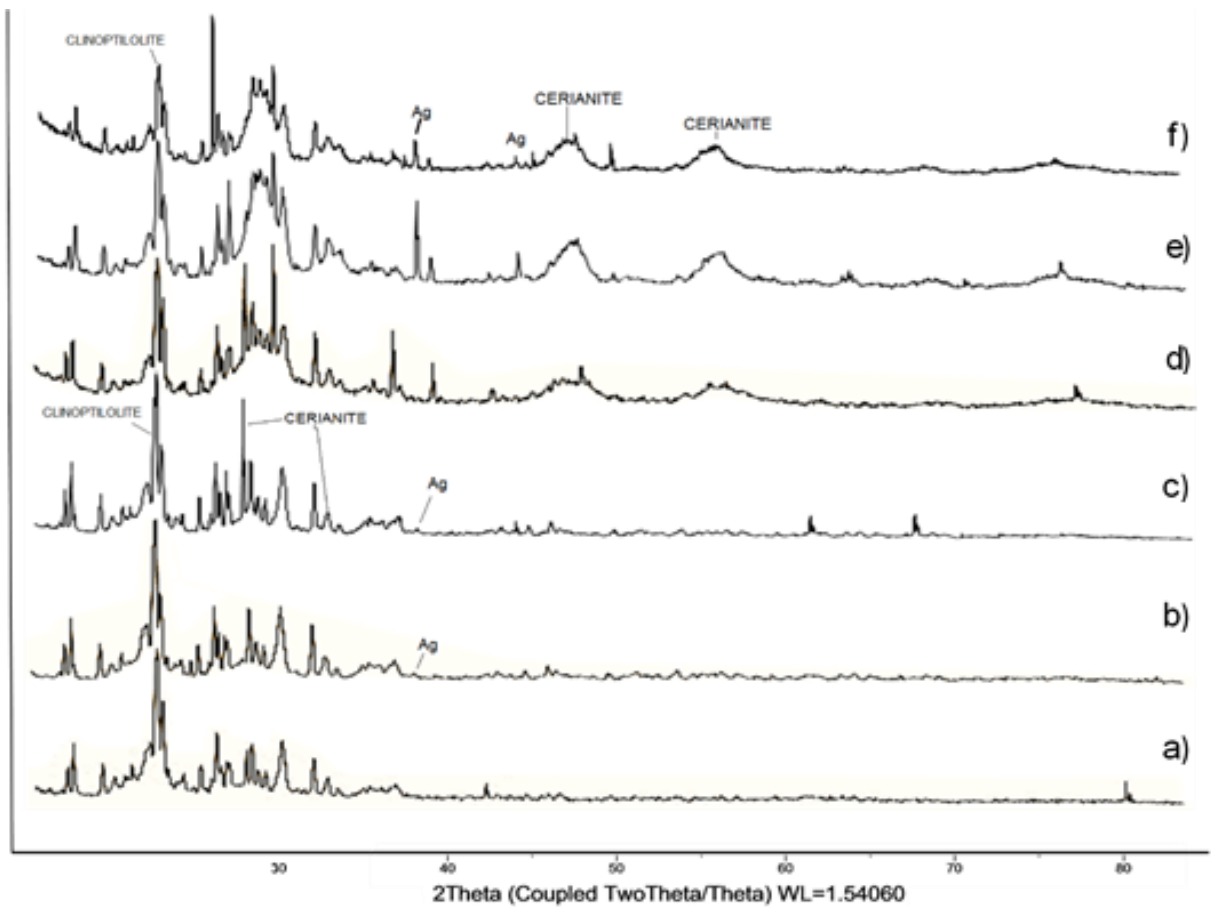


Figura 7.2. Patrones de difracción de rayos X; a) CLIPCeO₂-I, b) CLIPCeO₂-Ag1.5%-I, c) CLIPCeO₂-AG1.5%-IR, d) CLIPCeO₂-P, e) CLIPCeO₂-Ag1.5%-P, f) CLIPCeO₂-Ag1.5%-PR

7.2. MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO (SEM)

Por microscopía electrónica de barrido se estudió la morfología de los diferentes materiales en estudio. El análisis de los soportes se muestra en las figuras 7.3 donde se observa la micrografía que exhibe cristales que se caracterizan por tener caras cúbicas, hexagonales y rectangulares del orden de 1 a 2.1 μm en el caso de la zeolita. Para $\text{CeO}_2\text{-H}$ se aprecia una superficie irregular con aglomerados en forma esférica o de bastones que oscilan entre 0.09 - 1.4 μm . Para el $\text{CeO}_2\text{-S}$, se observa en las micrografías una morfología semejante a la apreciada en $\text{CeO}_2\text{-H}$, sin embargo, estas se distinguen por la predominancia de formas esféricas de un tamaño aproximado entre 0.2 - 0.7 μm , y aglomerados en forma de barras de tamaños de a 1 - 7.6 μm .

El análisis del CeO_2 soportado en la zeolita del tipo clinoptilolita por SEM nos muestra para ambos métodos de síntesis del CeO_2 un cambio en la morfología, debido a que no se perciben los patrones que se encontraban originalmente en las micrografías correspondientes a la zeolita. En figura 7.4 se presentan micrografías de CLIP $\text{CeO}_2\text{-I}$ en la cual se observa una superficie irregular, así como, la presencia de gránulos de 6.4 - 10.8 μm , y sobre estos gránulos se perciben pequeños aglomerados de un tamaño entre 0.16 - 0.75 μm .

En la figura 7.5 se muestra la micrografía de CLIP $\text{CeO}_2\text{-P}$ donde al igual que la anterior muestra exhibe cristales amorfos y con una superficie irregular, lo que impide determinar el tamaño del gránulo, sin embargo, se observa la presencia de aglomerados en la superficie del material, los cuales presentan tamaños alrededor de 0.130 – 0.869 μm .

La superficie de los materiales de $\text{CeO}_2\text{-Ag}$ se analizó con microscopio eléctrico de barrido como se muestra en las figuras 7.6 y 7.7, en las que se observó una superficie irregular con tamaños y formas variables, con tamaños de grano que oscilan entre 2 y 19.4 μm y pequeños cúmulos sobre la superficie de estos que van de 0.3 – 0.7 μm .

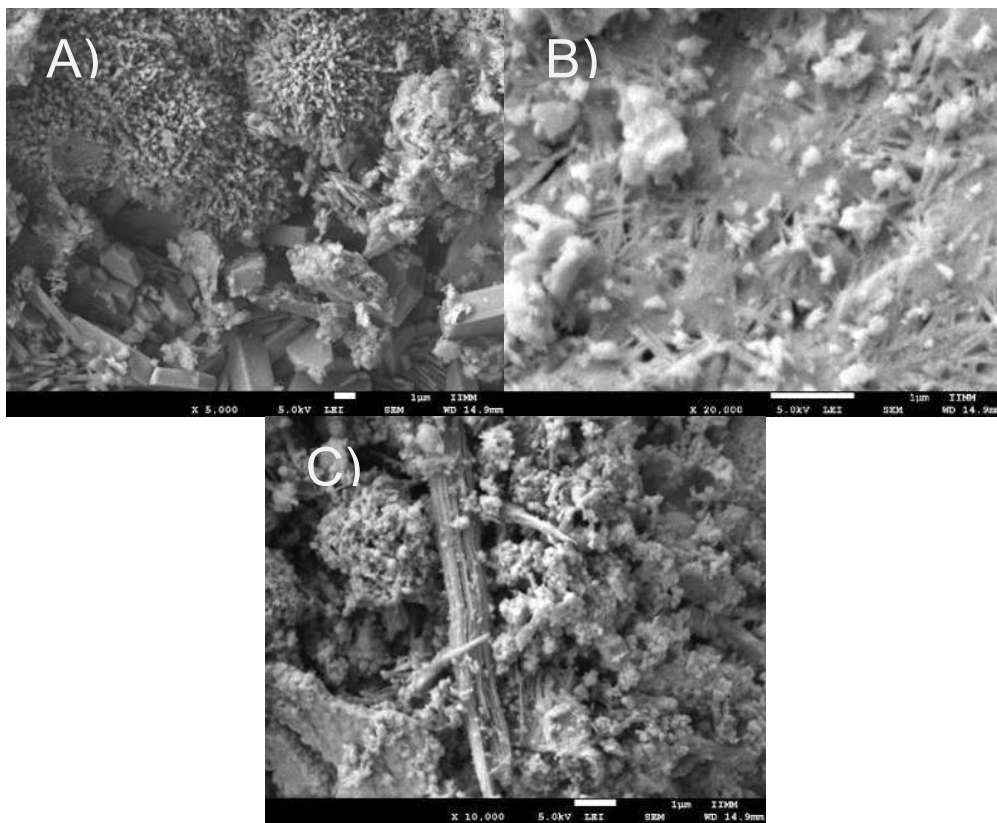


Figura 7.3. Micrografías de; A) zeolita clinoptilolita, B) $\text{CeO}_2\text{-S}$ y C) $\text{CeO}_2\text{-H}$

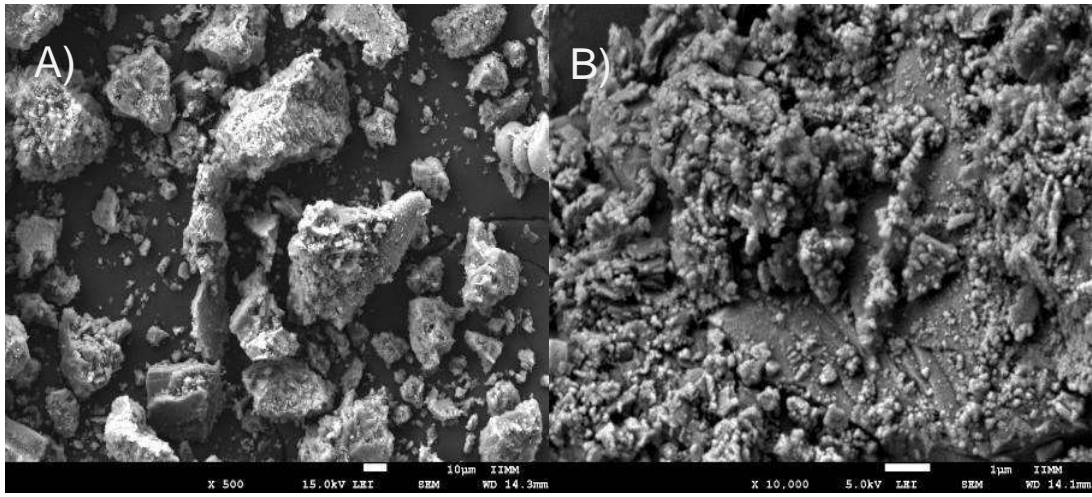


Figura 7.4. Micrografías de CLIPCeO₂ | A) 500X B) 10000X

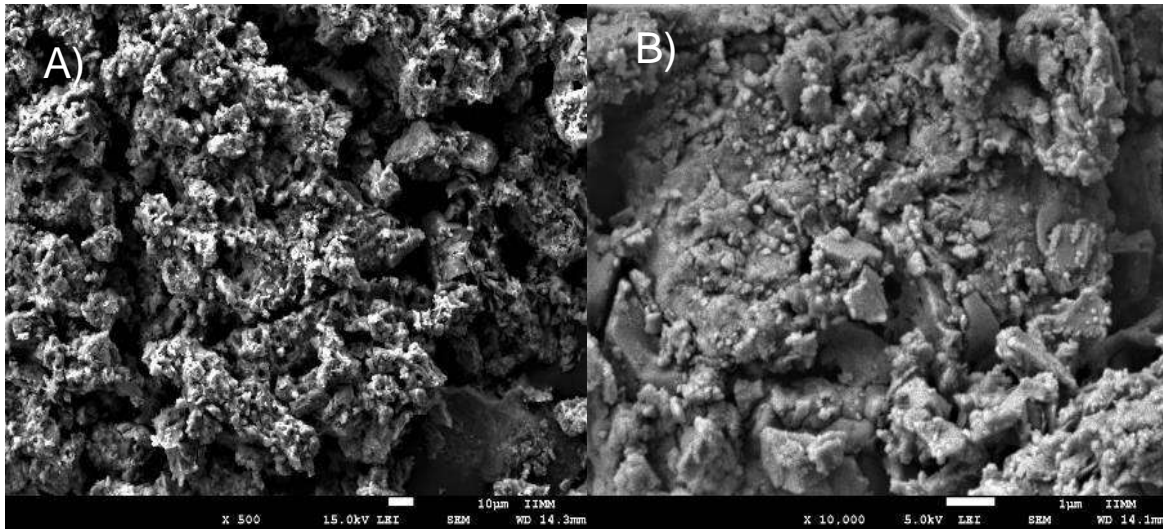


Figura 7.5. Micrografías de CLIPCeO₂ P A) 500X B) 10000X

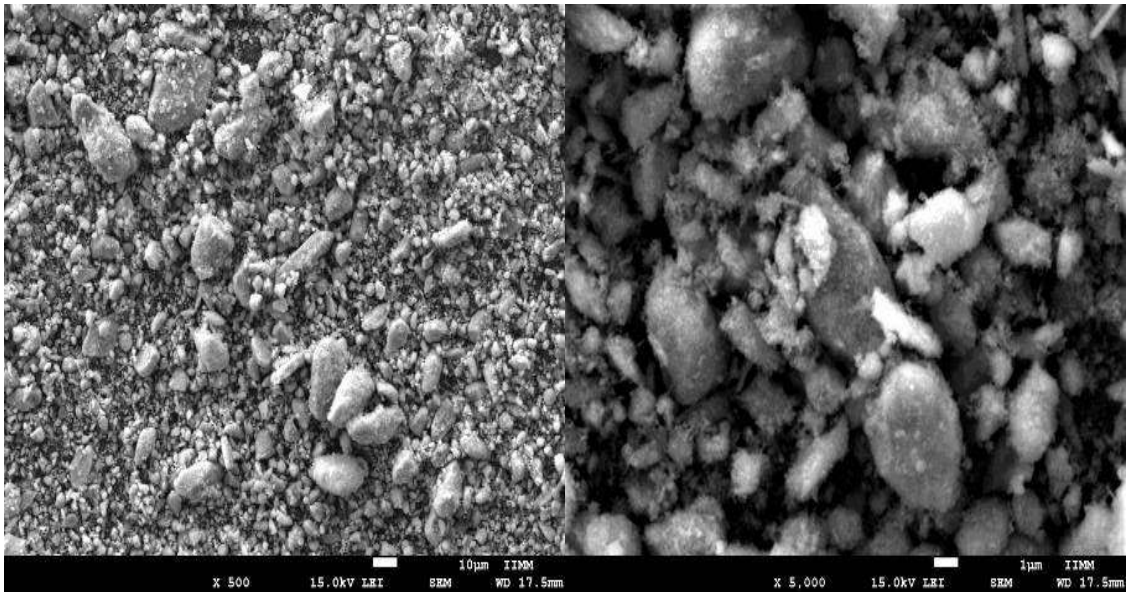


Figura 7.6. Micrografías de CeO₂-Ag1.5%H A) 500X B) 5000X

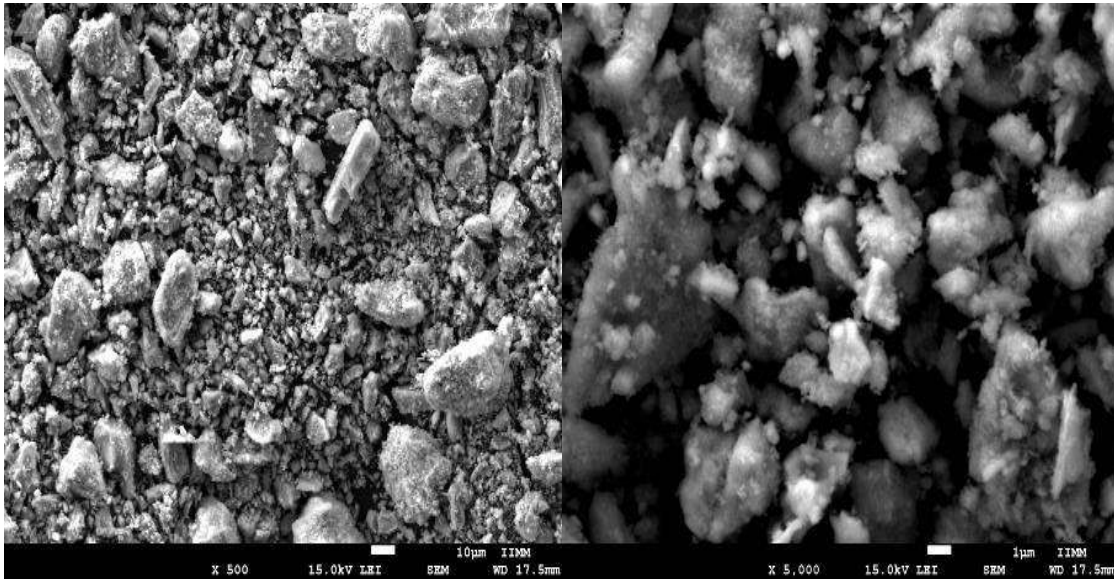


Figura 7.7. Micrografías de $\text{CeO}_2\text{-Ag1.5\%S}$ A) 500X B) 5000X

La figura 7.8 nos muestra las micrografías correspondientes a CLIPCeO₂-Ag1.5%-P donde las partículas más grandes presentan estructuras semejantes a las encontradas en las micrografías de la zeolita. Mientras que las partículas más pequeñas que se encuentra sobre la superficie más grande presentan morfologías diferentes, lo que nos permite sugerir que tanto el CeO₂ como las nanopartículas de plata se localizan en la superficie del soporte sin cambiar la morfología de las partículas más grandes. Además, se aprecian estructuras cilíndricas entrecruzadas, así como, aglomerados de 1.6 – 6.8 µm.

Para CLIPCeO₂-Ag1.5%-PR se percibe una disminución de estructuras cilíndrica entrecruzadas y la presencia de aglomerados que miden entre 0.6 – 2.8 µm, como se puede visualizar en la figura 7.9.

Las figuras 7.10 y 7.11 muestran las micrografías correspondientes al material CLIPCeO₂-Ag1.5%-I y de este mismo material pero sometido a un proceso de reducción con flujo de hidrogeno a 400°C, donde se muestra la formación de cúmulos con superficies rugosas constituido por estructuras cilíndricas entrecruzadas. Se puede concluir que la reducción de los materiales no genera cambios significativos en la estructura de las partículas más grandes, pero si cambios en el tamaño de los aglomerados más pequeños presentes en la superficie del soporte.

Cabe mencionar que los materiales fueron recuperados después de su exposición con la bacteria, con la finalidad de realizarles una caracterización buscando la existencia de alguna variación o modificación en la estructura o composición de los materiales, pero no se encontraron modificaciones en tamaño y forma. Como se puede observar en la figuras 7.12 y 7.13 que representan las micrografías de los materiales recuperados después de realizarles una evaluación para conocer su capacidad bactericida, se aprecian estructuras cubicas y rectangulares como las que se encuentran en la morfología de la zeolita original, previo a la impregnación con oxido de cerio y plata.

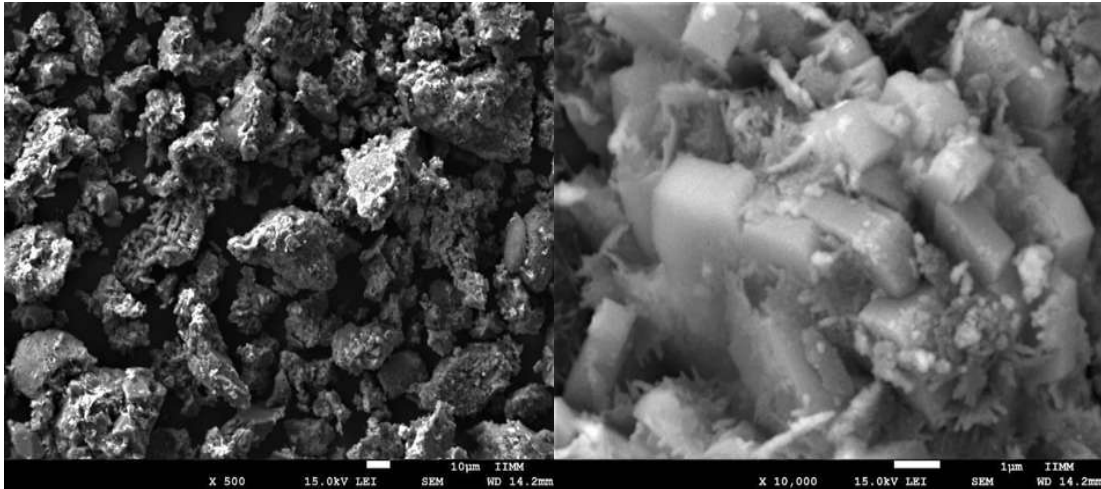


Figura 7.8. Micrografía de CLIPCeO₂-Ag1.5%P; A) 500X y B) 10000X

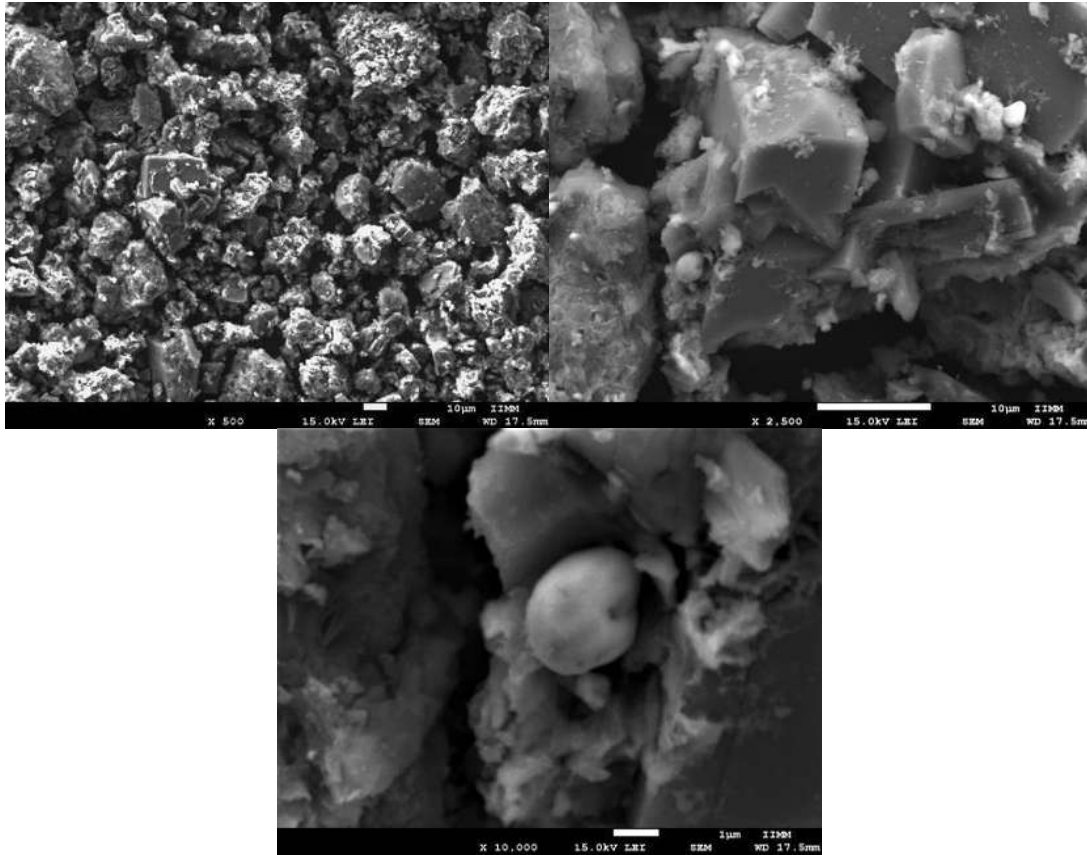


Figura 7.9. Micrografías de CLIPCeO₂-Ag1.5% P(R) A) 500X B) 2500X, C) 10000X

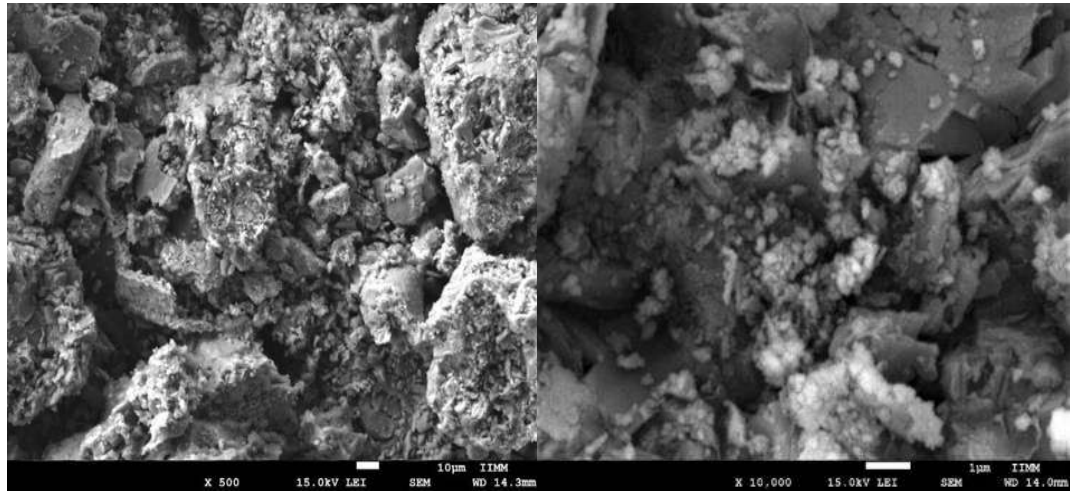


Figura 7.10. Micrografías de CLIPCeO₂-Ag1.5%I; A) X500 y B) X10000

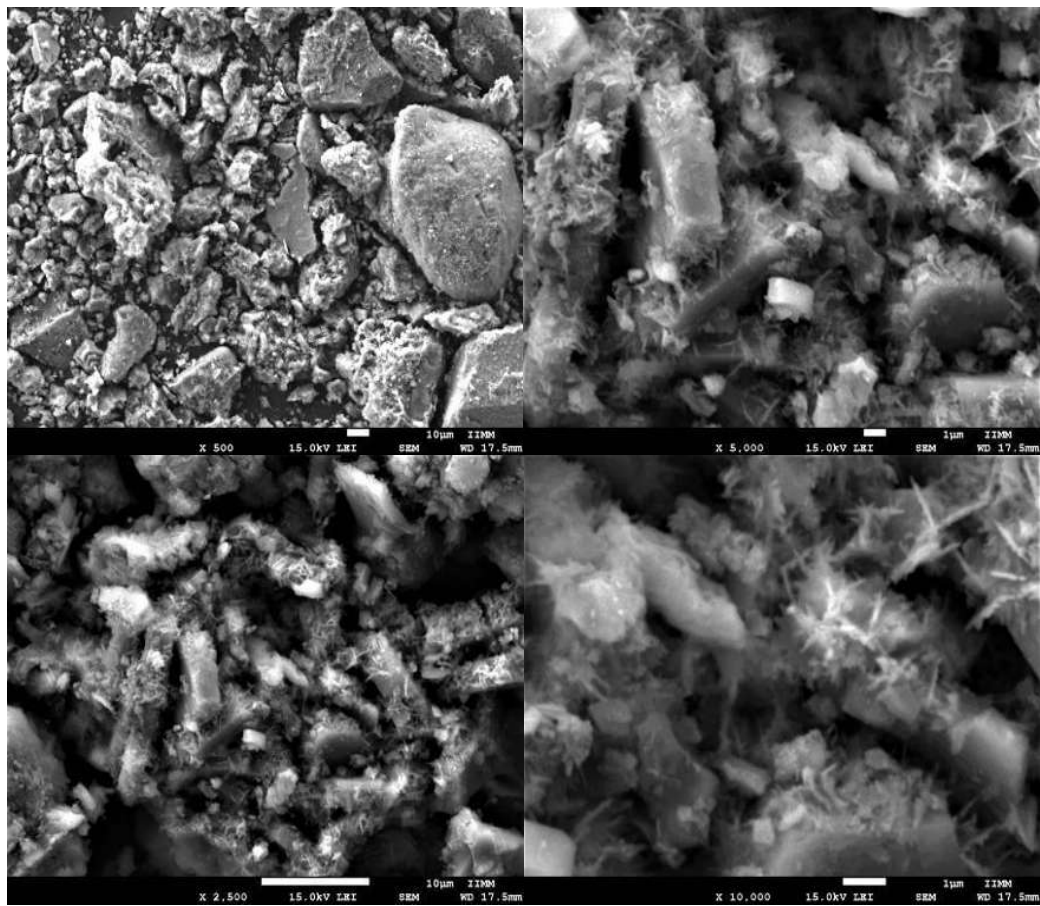


Figura 7.11. Micrografías de CLIPCeO₂-Ag1.5% I(R) A) 500X B) 5000X, C) 2500X, D) 10000X

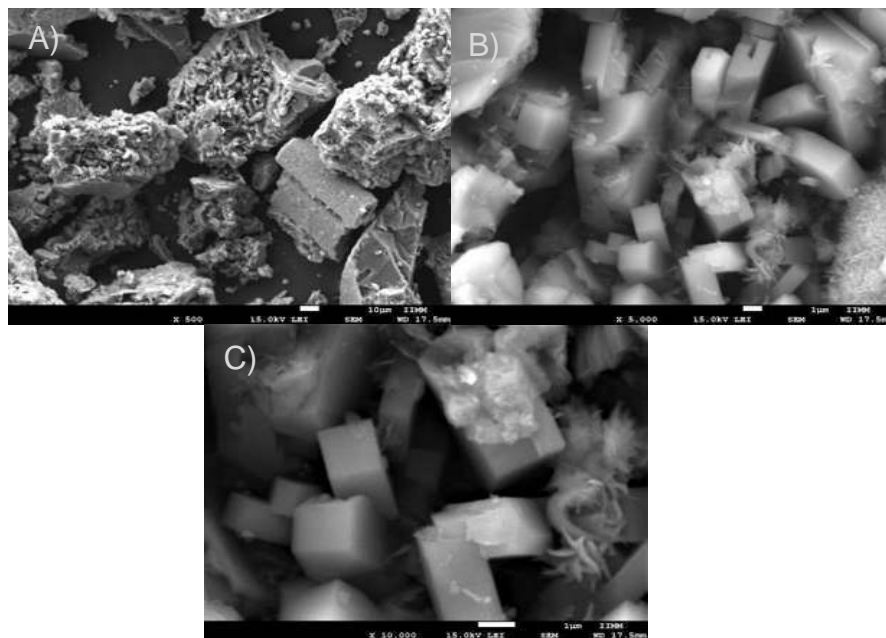


Figura 7.12. Micrografías de CLIPCeO₂-Ag1.5% I(R) recuperado después de su evaluación para eliminar *E. coli* A) 500X B) 5000X, C) 10000X.

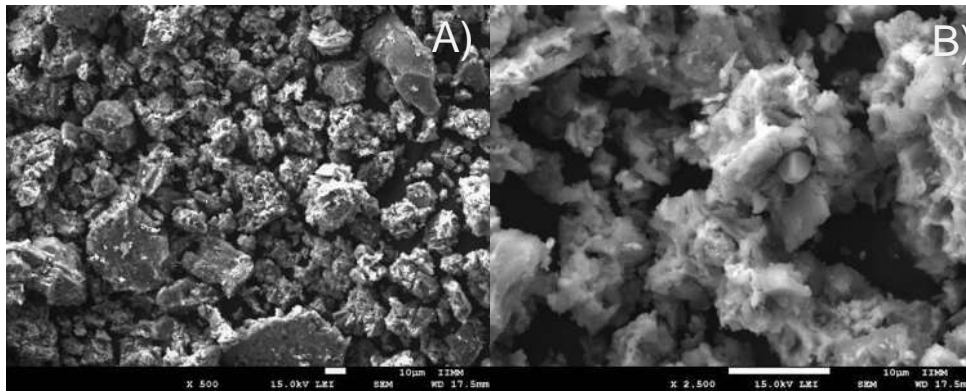


Figura 7.13. Micrografías de CLIPCeO₂-Ag1.5% P(R) recuperado después de su evaluación para eliminar *E. coli* A) 500X B) 2500X.

7.3. Espectroscopia de Dispersión de Energía de Rayos X (EDS)

El análisis elemental por EDS de las superficies de las muestras se obtuvo de los espectros de rayos X producidos por el barrido de electrones en lugares puntuales de algunas micrografías. Para la zeolita, el análisis elemental nos indicó la presencia; O, Si, Al, Mg, Na, Ca y K, elementos que conforman las zeolitas del tipo clinoptilolita, como se muestra en la figura 7.14 a). donde aparece el espectro correspondiente al microanálisis de la zeolita natural.

Al incorporarle CeO_2 a la zeolita, no se observan cambios en la composición química de los materiales, ya que los elementos observados en la clinoptilolita original se encuentran presentes en ambos casos, y solo varían en intensidad los picos de los espectros correspondientes, como se muestra en la figura 7.14 b). Al incorporarle la plata a estos soportes, no se observan cambios en la composición química ni de la clinoptilolita ni del CeO_2 , sin embargo, el pico correspondiente a la plata se presenta en muy baja intensidad, esto debido a la baja concentración de esta que se le fue incorporada, en la figura 7.15 se muestra el espectro de CLIP CeO_2 -Ag1.5%-P .

En el caso del CeO_2 , para ambos casos (método hidrotérmico y sol-gel) los espectros correspondientes a su microanálisis elemental muestran gran semejanza, encontrando picos que concuerdan con los átomos Ce y O, siendo el de oxígeno el que presenta mayor intensidad, como se muestra en la figura 7.16. Los espectros obtenidos del óxido de cerio a los cuales se les incorporo plata, continúan siendo semejantes y en los cuales se observa un pico de poca intensidad, que corresponde a la plata presente en estos materiales, lo cual nos indica la presencia de un bajo porcentaje de este metal. En la figura 7.17 se muestra como referencia de estos dos materiales el espectro de EDS de CeO_2 -Ag1.5%-H sin haber estado en contacto con la bacteria.

Con la finalidad de apreciar la existencia de alguna modificación en la composición química de la superficie de los materiales, se realizó el análisis elemental por EDS de los materiales recuperados después de haber entrado en contacto con la bacteria, encontrando cambios en la información de la composición elemental arrojada por los espectros de EDS, ya que en los materiales CeO_2 -Ag1.5%-S, CeO_2 -Ag1.5%-H, CLIP CeO_2 -Ag1.5%-IR, CLIP CeO_2 -Ag1.5%P y CLIP CeO_2 -Ag1.5%-PR se visualiza la presencia de fósforo, solo en el análisis del CLIP CeO_2 -Ag1.5%-I no muestra la presencia de fósforo, un ejemplo de esto se muestra en la figura 7.18,

donde se observa el espectro EDS correspondiente a $\text{CeO}_2\text{-Ag1.5\%-H}$ recuperado después de la evaluación como bactericida.

La presencia de fósforo en los materiales sugiere la posible interacción de las nanopartículas de plata y el fosforo, ya que como mencionan Lok y colaboradores, el posible sitio de acción de las nanopartículas de Ag es en la membrana celular, la cual contiene cadenas de fosfolípidos (Lok et al., 2006).

Igualmente se tiene que contemplar que el porcentaje de fosforo presente en los materiales es variable dependiendo del material, ya que en el material donde el cerio se depositó por el método de impregnación ($\text{CLIPCeO}_2\text{-Ag1.5\%-I}$) no se observa la presencia de fosforo, en el espectro EDS de este material pero sometido al proceso de reducción con flujo de H, se puede apreciar un pico de fósforo de muy baja intensidad, lo que podría deberse a que la cantidad de fósforo es la suficiente como para ser detectado por esta técnica.

Lo anterior sugiere que el óxido de cerio es partícipe importante en el proceso bactericida y la posterior captación del fosforo en la superficie de los materiales bactericidas, esto debido a que dependiendo del método de síntesis utilizado se observa la intensidad del pico característico de fosforo en los espectros de EDS, siendo el espectro de $\text{CeO}_2\text{-Ag1.5\%-H}$ el que presenta un pico de mayor intensidad.

Cabe recordar, que el análisis elemental por EDS es una técnica puntual, lo que nos indica que los resultados de este análisis corresponden a zonas específicas de los materiales estudiados, y queda fuera del alcance de esta tesis el estudio con una técnica que permita llegar a conclusiones acerca del comportamiento sobre toda la superficie del material.

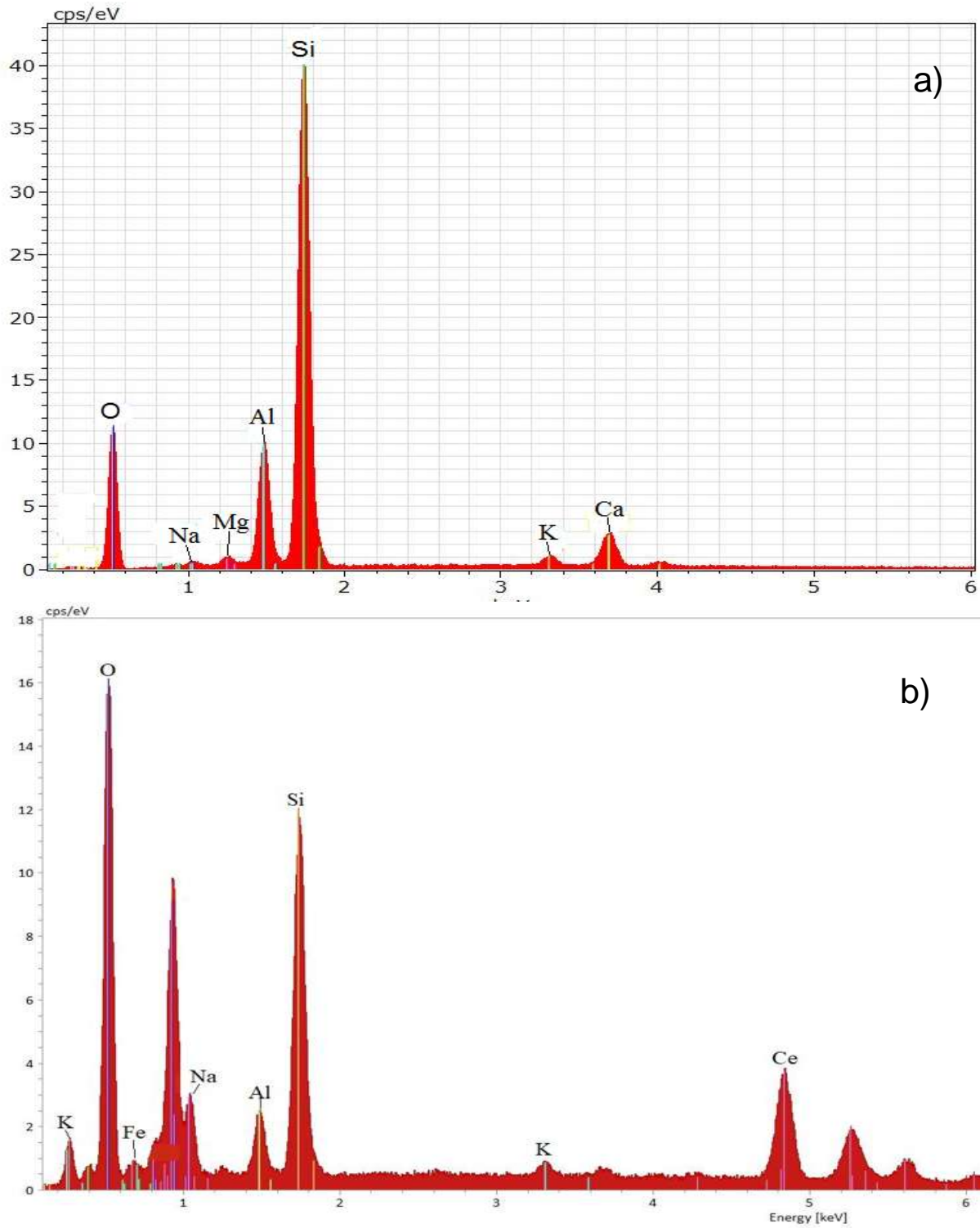


Figura 7.14. Espectro EDS de; a) zeolita clinoptilolita, b) CLIPCeO₂-P

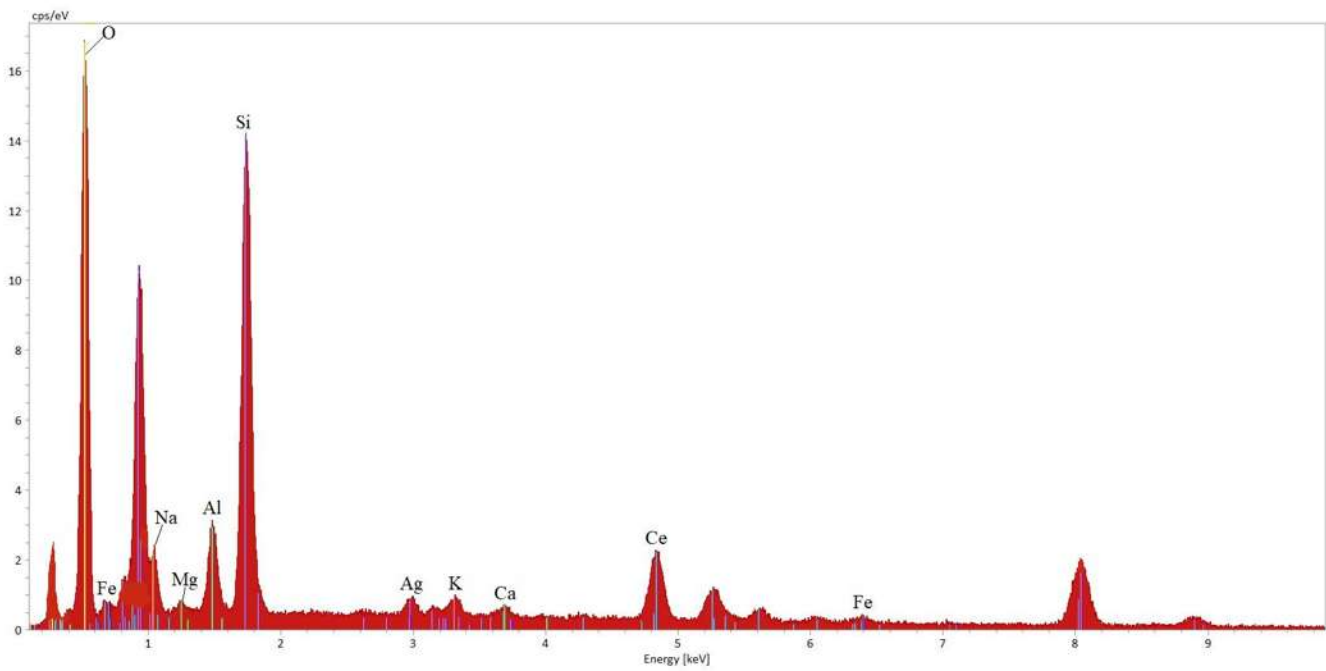


Figura 7.15. Espectro EDS de la muestra CLIPCeO₂-Ag1.5%-P

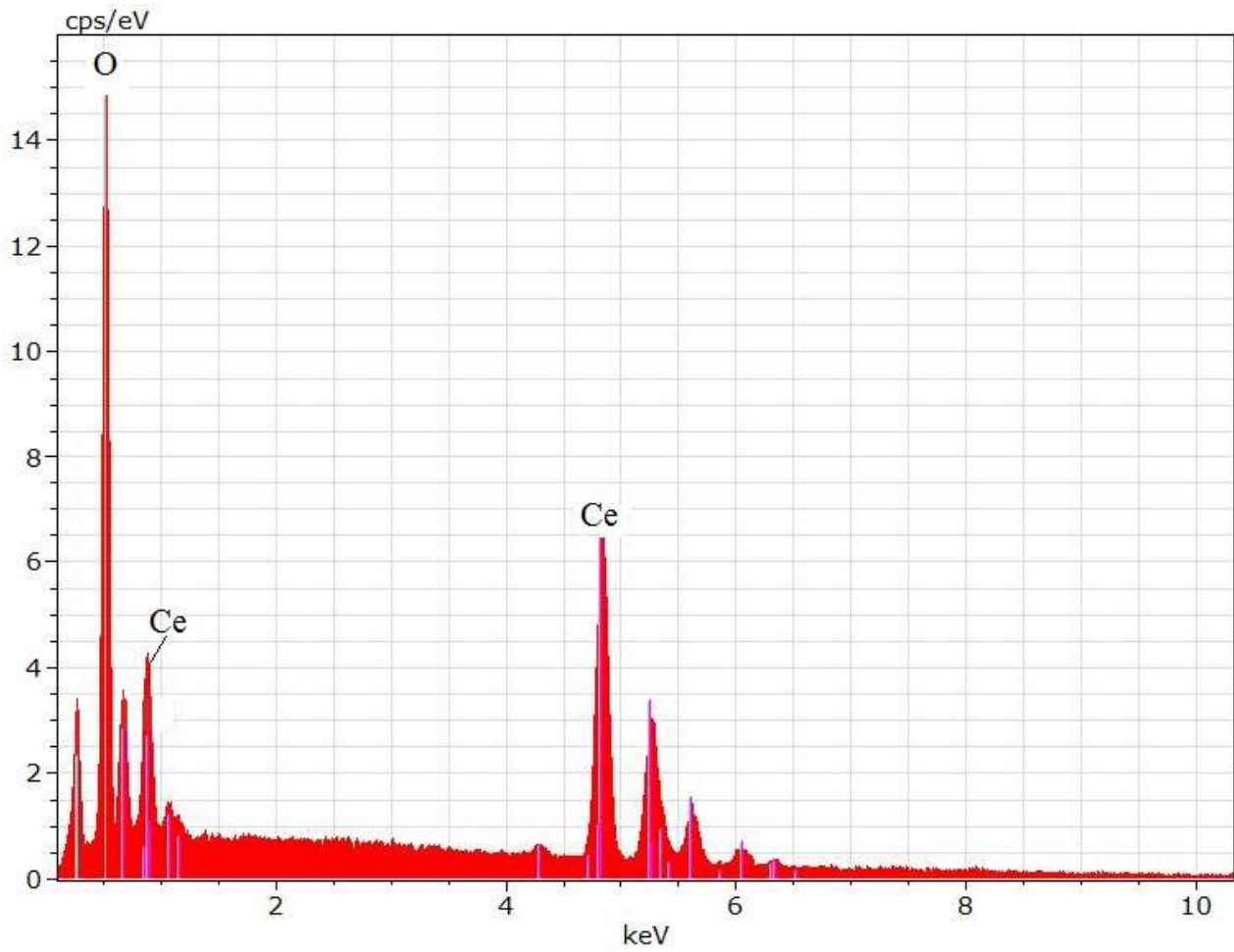


Figura 7.16. Espectro EDS de la muestra $\text{CeO}_2\text{-S}$

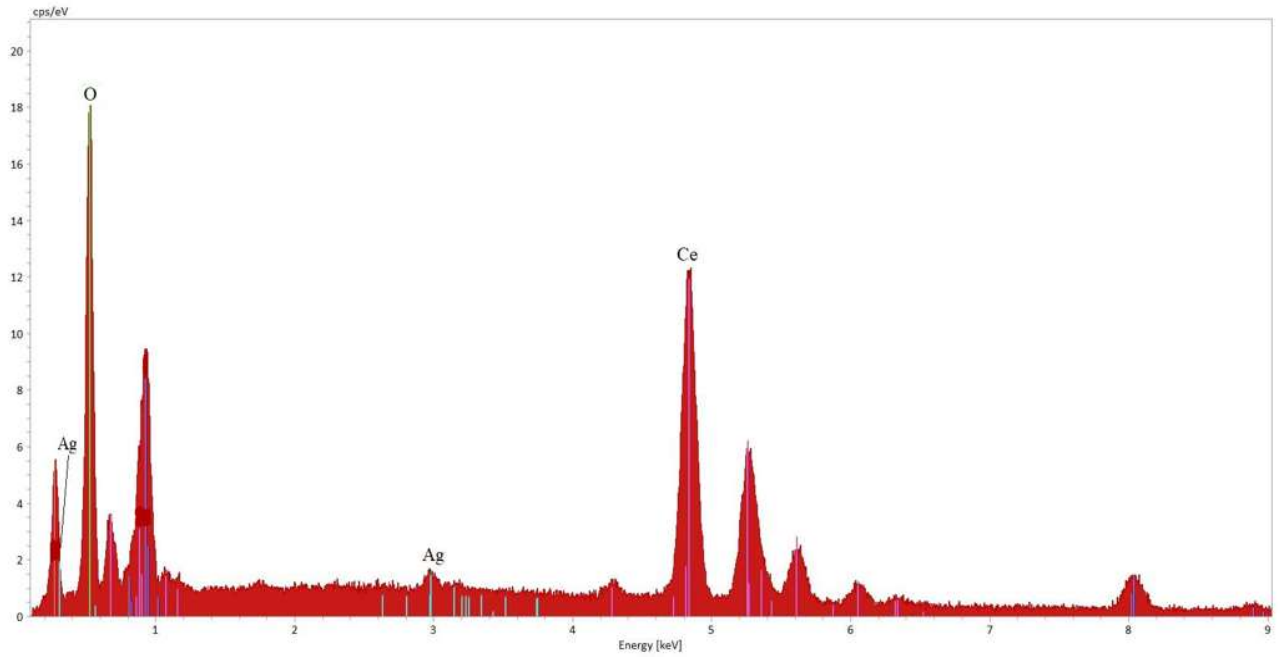


Figura 7.17. Espectro EDS de la muestra $\text{CeO}_2\text{-Ag1.5\%-H}$

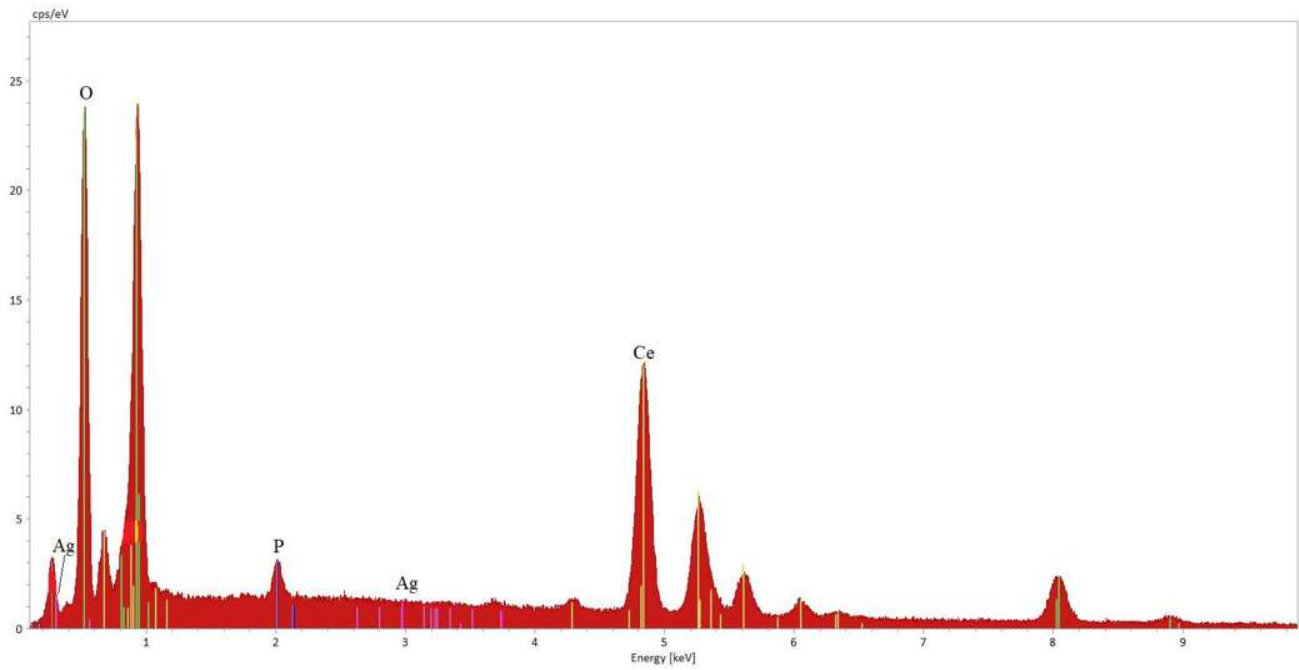


Figura 7.18. Espectro EDS de la muestra $\text{CeO}_2\text{-Ag1.5\%-H}$
(recuperado)

Con el objetivo de conocer la distribución del CeO_2 en la zeolita y apreciar la influencia del método de deposición aplicado en la dispersión del CeO_2 en la superficie del soporte, se realizó un mapeo químico por EDS de la superficie. En la figura 7.19 se visualiza la distribución de Ce sobre la superficie de la zeolita, y se aprecia una mayor concentración y dispersión de cerio en CLIP CeO_2 -P por lo que se podría sugerir que el método de depósito-precipitación brinda una deposición más homogénea.

Por otra parte, el mapeo químico por EDS de la superficie de las muestras permitió ver que estos presentan una distribución homogénea de plata sobre la superficie de los distintos soportes aquí utilizados, esto se puede apreciar en la figura 7.20 donde se presenta un comparativo de dispersión de plata en cada uno de los materiales. Se observa una distribución homogénea en todos los materiales, sin embargo, se aprecia la presencia de aglomerados de plata en los materiales CeO_2 -Ag1.5%H, CLIP CeO_2 -Ag1.5%P y CLIP CeO_2 -Ag1.5%P-R de alrededor de $1.05 \mu\text{m}$, lo que probablemente podría influenciar en su eficiencia para la eliminación de las bacterias.

Con la finalidad de apreciar si existe alguna variación en la superficie de los materiales, estos fueron recuperados después de ser evaluados como bactericidas, y sometidos a un análisis elemental EDS con el cual se obtuvo un mapeo químico elemental, así se aprecia nuevamente una distribución uniforme de plata sobre el soporte, así como, la presencia de aglomerados de plata en los materiales CLIP CeO_2 -Ag1.5%P y CLIP CeO_2 -Ag1.5%-PR, mientras que en CeO_2 -Ag1.5%H disminuyó considerablemente la presencia de estos aglomerados, como se puede apreciar en la figura 7.21.

El análisis químico cualitativo por EDS arrojaron la presencia de fósforo en la superficie de los materiales que fueron recuperados después de la interacción con la bacteria, a excepción de CLIP CeO_2 -Ag1.5%-I como se muestra en la figura 7.22, donde se muestra la distribución del fósforo sobre los materiales que presentan esta especie atómica.

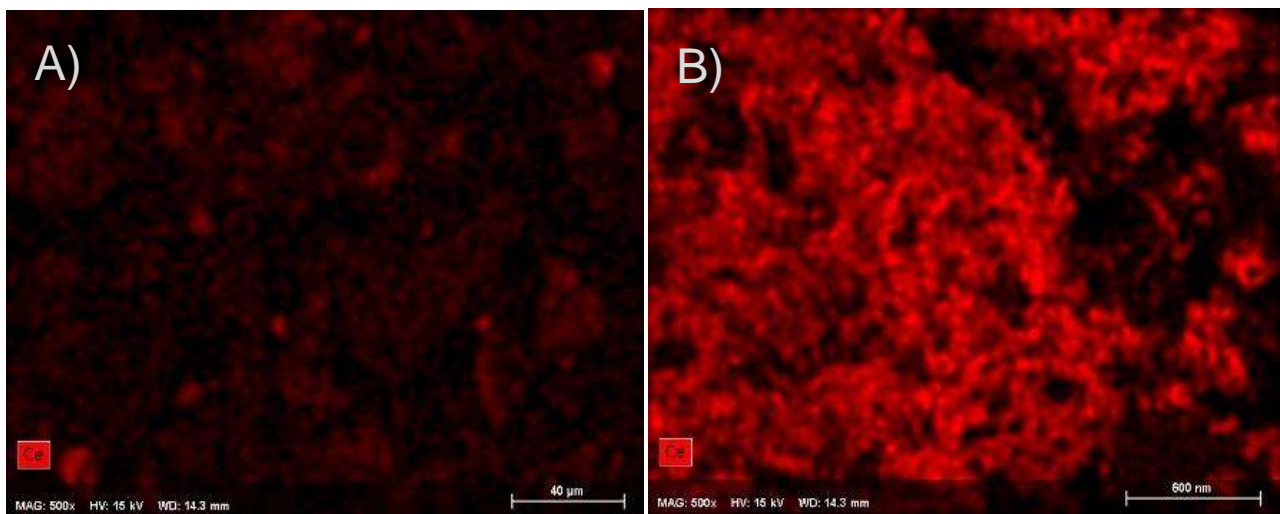


Figura 7.19. Análisis elemental EDS de cerio sobre la superficie de los soportes; A) CLIPCeO₂-I, B) CLIPCeO₂-P

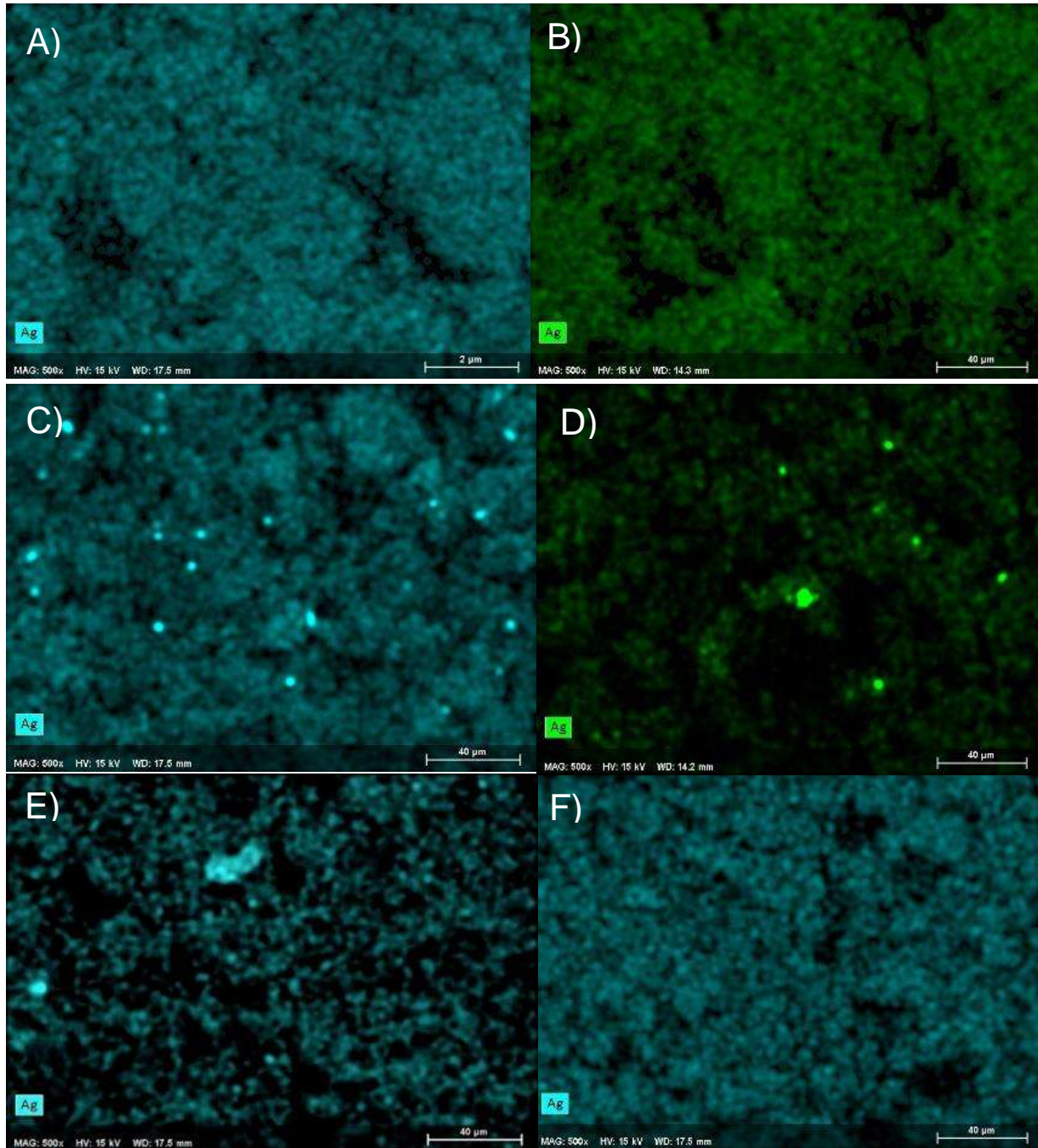


Figura 7.20. Análisis elemental EDS de plata sobre la superficie de los materiales A) CLIPCeO₂-Ag1.5%-IR, B) CLIPCeO₂-Ag1.5%-I, c) CLIPCeO₂-Ag1.5%-PR, D) CLIPCeO₂-Ag1.5%-P, E) CeO₂-Ag1.5%-H, F) CeO₂-Ag1.5%-S

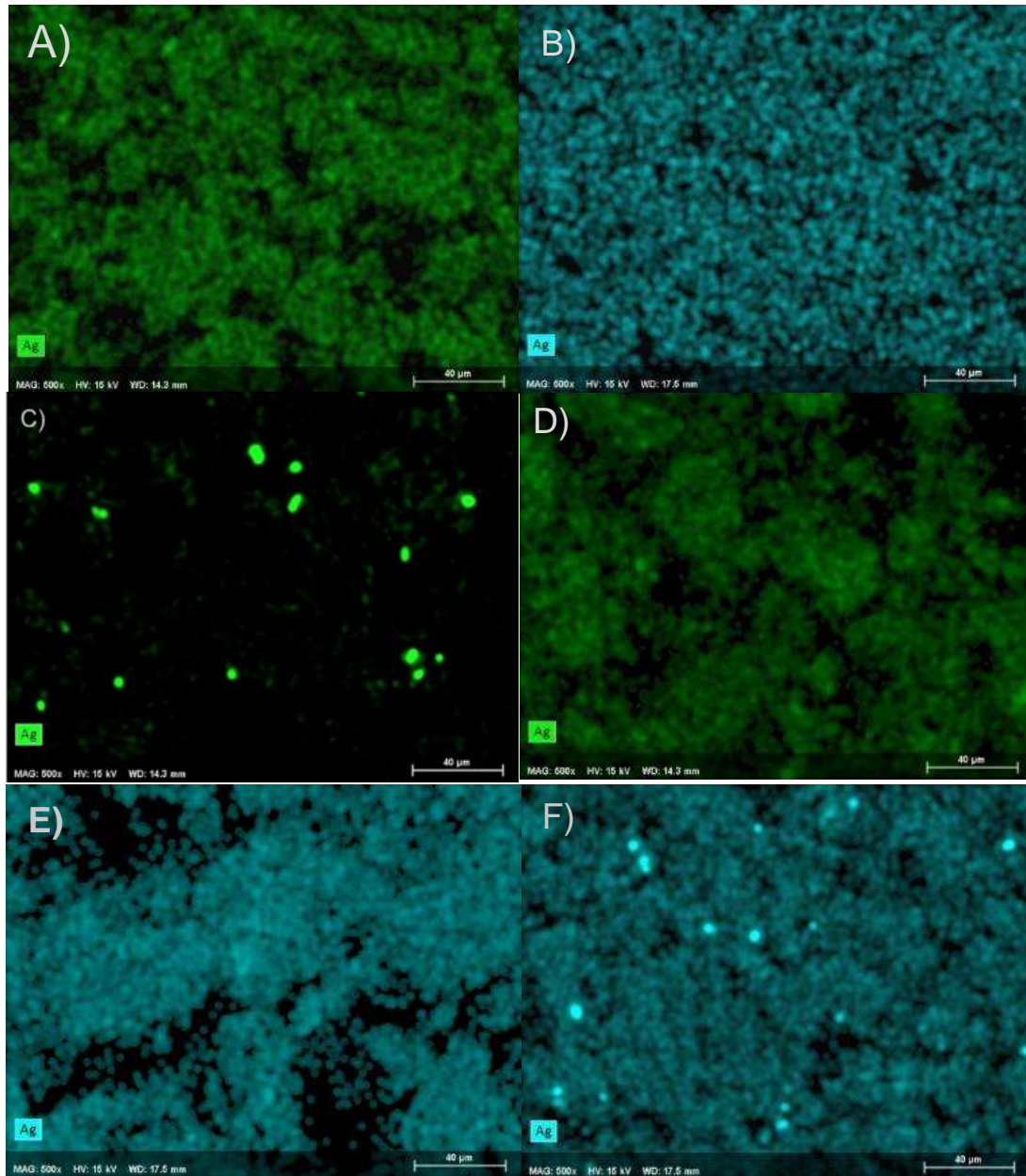


Figura 7.21. Análisis elemental EDS de plata sobre la superficies de los materiales recuperados después de su evaluación para eliminar *E. coli*
A) $\text{CeO}_2\text{-Ag1.5\%H}$, B) $\text{CeO}_2\text{-Ag1.5\%S}$, C) $\text{CLIPCeO}_2\text{-Ag1.5\%P}$, D) $\text{CLIPCeO}_2\text{-Ag1.5\%I}$,
E) $\text{CLIPCeO}_2\text{-Ag1.5\%I-R}$, F) $\text{CLIPCeO}_2\text{-Ag1.5\%P-R}$.

En la tabla 7.1 se muestra un análisis de los elementos que conforman los distintos materiales antes y después de la interacción con la bacteria, permitiendo cuantificar los distintos elementos presentes. La ausencia de fósforo en CLIPCeO₂-Ag1.5%-I nos permite intuir que esto se debe a que este material muestra una efectividad muy baja para eliminar la bacteria (como se observara más adelante en los estudios microbiológicos), dado que otros autores llegaron a la conclusión de que el CeO₂ es el que atrae electrostáticamente la membrana de célula bacteriana a las nanopartículas bactericidas (Thill et al., 2006), y al ser el CLIPCeO₂-Ag1.5%-I el que contiene menor cantidad de CeO₂, la interacción con la bacteria es menor reduciendo su efectividad al momento de eliminar la bacteria, lo que se traduce en la ausencia del fósforo al realizar el análisis EDS.

El análisis de los materiales recuperados también mostró un menor contenido de átomos de plata y cerio, y un aumento del contenido de oxígeno, pero cuando agregamos la pérdida total de átomos de plata y cerio, coinciden con la ganancia total de átomos de oxígeno y fósforo, y las ganancias / pérdidas totales entre ambas nanopartículas son muy similares, lo que se espera ya que ambas muestras matan a todas las bacterias, y se proporcionó un número similar de bacterias al comienzo del proceso bactericida. Este análisis indica que después de la interacción de las nanopartículas de plata con las células de *E. coli*, existe la formación de un material en la parte superior de las nanopartículas de plata que contienen fósforo y oxígeno, que cubre la nanopartículas de plata y alguna superficie adicional que contiene la superficie de óxido de cerio.

Entonces, la relación entre el fósforo y el oxígeno formados sobre la superficie es más o menos entre PO₂ y PO₃, estructuras que probablemente son el resultados de la destrucción de las cadenas de fosfolípidos de la membrana (Fabrega et al., 2009; Hurk & Evoy, 2015).

La presencia de la estructura de fosfato después de la interacción con la bacteria gana credibilidad si se considera el mecanismo de acción propuesto de las nanopartículas de plata en el proceso bactericida, que implica la formación de especies reactivas de oxígeno; (CHANG, HE, QU, et al., 2008; Chang, He, Zhao, et al., 2008).

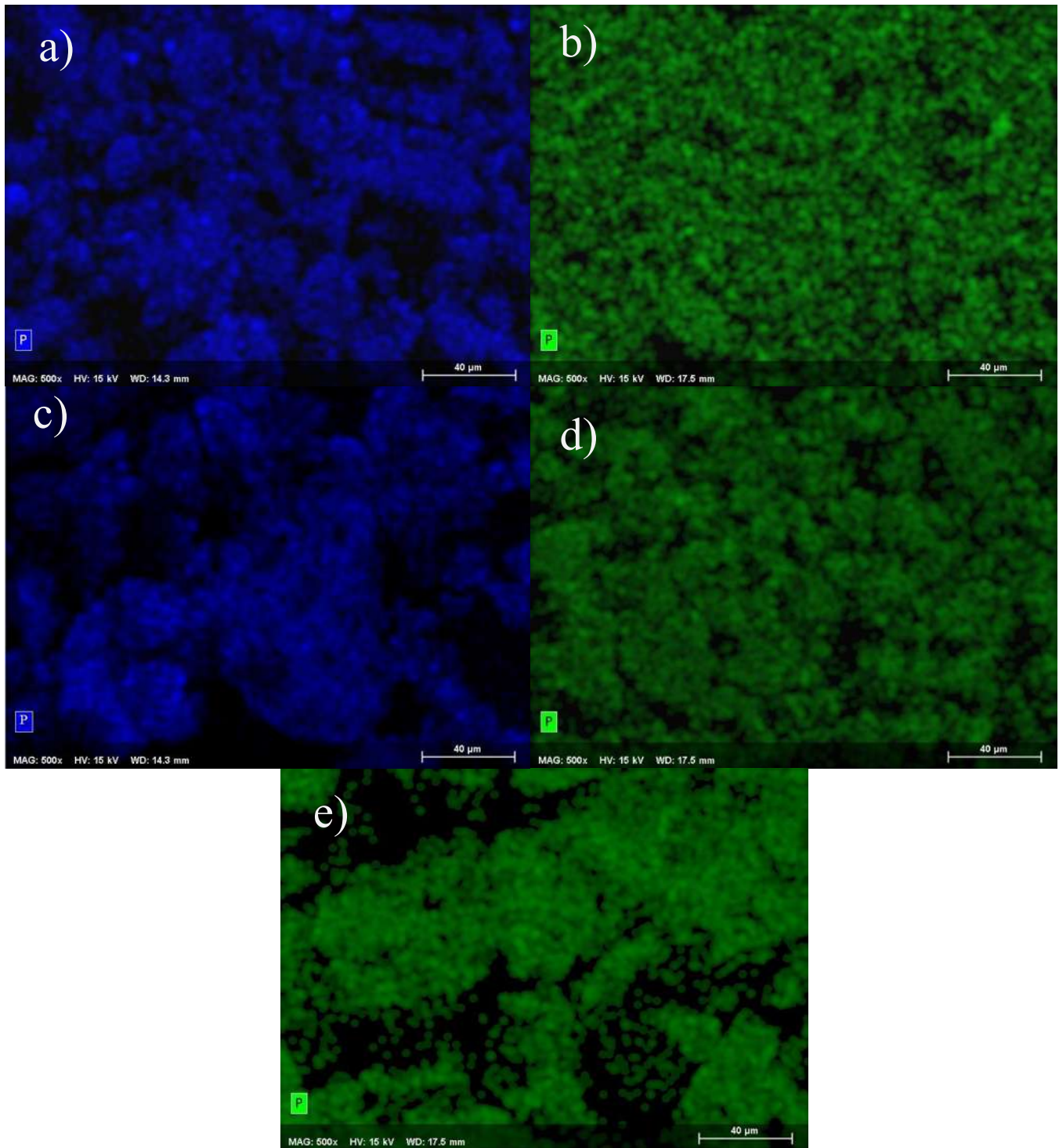


Figura 7.22. Análisis elemental EDS de fósforo sobre la superficies de los materiales recuperados después de su evaluación para eliminar *E. coli*
a) $\text{CeO}_2\text{-Ag1.5\%H}$, b) $\text{CeO}_2\text{-Ag1.5\%S}$, c) $\text{CLIPCeO}_2\text{-Ag1.5\%P}$, d) $\text{CLIPCeO}_2\text{-Ag1.5\%P-R}$, e) $\text{CLIPCeO}_2\text{-Ag1.5\%I-R}$.

Tabla 7.1. Análisis elemental (% molar) de los materiales CeO₂-Ag1.5%S y CeO₂-Ag1.5%H, antes y después de la interacción con E. coli ATCC 25922.

	CeO ₂ - Ag1.5%S	CeO ₂ - Ag1.5%H	CeO ₂ - Ag1.5%S	CeO ₂ - Ag1.5%H	CeO ₂ - Ag1.5%S	CeO ₂ - Ag1.5%H
ELEMENTO	Antes de la interacción con la bacteria		después de la interacción con la bacteria		Ganancia	
Ag	1.18	1.02	0.34	0.44	-0.84	-0.58
Ce	42.33	39.11	38.58	35.15	-3.75	-3.96
O	56.49	59.87	57.46	61.42	0.97	1.55
P			3.61	2.97	3.61	2.97
Perdida de Ag + Ce					-4.59	-4.54
Ganancia de O + P					4.58	4.52

7.4. AREA SUPERFICIAL (BET)

En la tabla 7.2, se muestran los resultados obtenidos del análisis del área superficial. Se encontró una reducción en el área superficial después de incorporársele óxido de cerio a la zeolita por el método de impregnación húmeda incipiente, este resultado coincide con los resultados encontrados por Núñez y colaboradores (Núñez et al., 2013), donde se encontró la disminución en el área superficial de AlO_3 dependiendo del porcentaje de CeO_2 depositado por el método de impregnación en relación peso, ya que sugieren que entre mayor sea la concentración de óxido de cerio se presenta una mayor disminución en el área superficial. Contrario a lo anterior, se obtuvo un incremento de $4.774 \text{ m}^2/\text{g}$ en el área superficial de la clinoptilolita al utilizar el método depósito-precipitación para la deposición de CeO_2 en la zeolita, lo que nos sugiere que estos dos métodos generan una distribución de poros diferente, y pensamos que la zeolita que incrementa su área superficial está constituida por una mayor cantidad de meso o macro poros que cuando adsorben las partículas de CeO_2 , estas contribuyen a incrementar el área superficial total, por el otro lado la zeolita que disminuye su área superficial probablemente esté formada por microporos.

Tabla 7.2. Área superficial de los soportes

MATERIAL	m^2/g
ZEOLITA	23.15843
CeO_2-S	60.44511
CeO_2-H	62.36635
CLIP CeO_2-I	6.856
CLIP CeO_2-P	27.932

7.5. PRUEBAS MICRIBIOLÓGICAS PARA EVALUAR LA INHIBICION.

Se realizaron tres pruebas microbiológicas a los materiales bactericidas, en la primera se determinó la sensibilidad de las bacterias hacia esos materiales, en la segunda determinamos las concentraciones mínimas inhibitorias y bactericidas, y finalmente en la tercera se determinó el perfil dinámico de los agentes bactericidas.

En la prueba de sensibilidad, transcurrido el tiempo de incubación se logró establecer la sensibilidad bactericida de los materiales, y esto se reconoce por la presencia de un halo de inhibición de crecimiento como se aprecia en la figura 7.23.

Para $\text{clipCeO}_2\text{-I}$, $\text{CLIPCeO}_2\text{-P}$, $\text{CeO}_2\text{-S}$ y $\text{CeO}_2\text{-H}$ no mostraron sensibilidad bactericida en el crecimiento de *E. coli*. Por otra parte, los materiales que contienen plata indicaron tener propiedades antimicrobianas debido a que mostraron zonas de inhibición de entre 10 - 13 mm en el ensayo de difusión en disco. Este resultado, confirma visualmente que las nanopartículas de plata incorporadas en los distintos soportes cuentan con una actividad bactericida eficaz como se corroboró después con los resultados de Concentración mínima inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB).

Al aplicar la técnica de dilución se determina la CMI, la cual se expresa usualmente en microgramos por mililitro ($\mu\text{g/ml}$). Esta técnica puede realizarse en agar o en caldo, y tiene como ventaja que determina la sensibilidad y la dosis para la eliminación de la bacteria.

En la tabla 7.3, se muestran los valores de las CMI de los materiales como inhibidores de la *E. coli*, utilizando el método de diluciones y siembra en agar. La reproducibilidad se estimó realizando por triplicado cada una de las pruebas. La turbidez en los tubos inoculados, permitió determinar la CMI después de las 24 horas de exposición de las bacterias frente a los diferentes materiales bactericidas, como se aprecia en la Figura 7.24. La cuantificación de colonias bacterianas que crecieron en placas con agar MH, se realizó después de 18 y 24 horas de incubación a 37 °C.

Con el fin de comprobar que las CMI promedio de los materiales como inhibidores para *E. coli* son las adecuadas, se realizó un análisis de CMB en función del tiempo de exposición, efectuando los correspondientes conteos de colonias.

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

Estimamos que la CMI para las nanopartículas de plata en los distintos soportes, será mayor de 3×10^{-3} g/ml, mientras que el valor de CMB es superior a 5×10^{-3} g/ml para CeO₂-Ag1.5%-H y CeO₂-Ag1.5%-S, mientras que para CLIPCeO₂-Ag1.5%-P, CLIPCeO₂-Ag1.5%-PR, CLIPCeO₂-Ag1.5%-I y CLIPCeO₂-Ag1.5%-IR, será mayor a 9×10^{-3} g/ml, y el valor de CMB es superior a 12×10^{-3} g/ml. Lo anterior representa concentraciones plata aproximadamente de 45 y 90 µg / ml, y de 135 y 180 µg / ml, respectivamente. Los resultados publicados de nanopartículas de plata suspendidas usando tamaños de nanopartículas de plata entre 5 y 100 nm, y aplicadas en *E. coli* ATCC 25922, encontraron un rango de valores de CMI y CMB dependiendo del tamaño de la nanopartícula usada (Agnihotri et al., 2014). Los valores reportados de CMI y CMB son 20 - 110 y 30 - 140 µg / ml, respectivamente. Los valores encontrados en este trabajo concuerdan con las concentraciones reportadas previamente, que corresponden a tamaños de nanopartículas de plata suspendidas entre 20 - 30 nm (CMI) y 30 - 50 nm (CMB), y las diferencias probablemente se pueden atribuir al uso de un soporte en este trabajo. Resultados similares para las nanopartículas de plata suspendidas que actúan sobre *E. coli* ATCC 25922 también fueron reportadas previamente (Dasgupta et al., 2016; Ruparelia et al., 2008). Los compuestos de plata-quitosano que actúan sobre *E. coli* ATCC 8739 y 11775 (Nithya et al., 2015) tienen valores bajos de CMI y CMB, probablemente debido a la gran área superficial de quitosano y la cepa utilizada. Las nanopartículas de plata soportadas sobre sílice que actúan sobre una cepa de *E. coli* no identificada también muestran valores bajos de CMI y CMB, similares a los de los compuestos de plata-quitosano (Egger et al., 2009).

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

También, es importante mencionar que la técnica turbidimétrica empleada no distingue entre células viables y no viables, por lo que a pesar de que en las curvas de crecimiento se observa una disminución en la población bacteriana, la tendencia en los valores de turbidez es a permanecer constante.

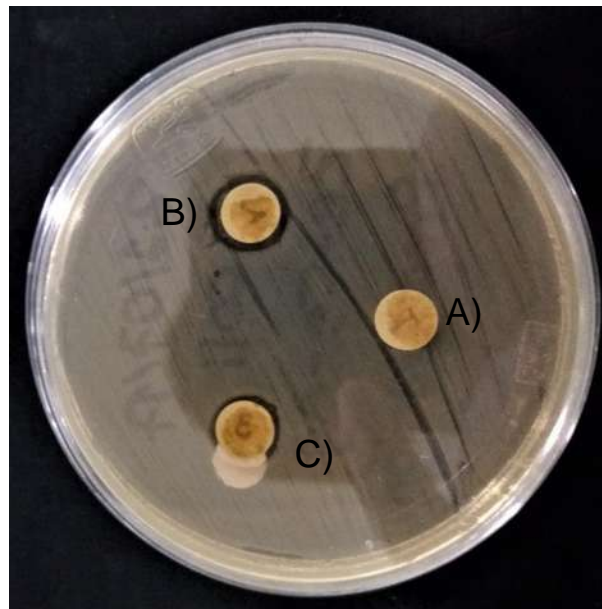


Figura 7.23. Halos de inhibición representados por zonas claras que indican nulo crecimiento de *Escherichia coli*, producidos por; A) CLIPCeO₂-P, B) CLIPCeO₂-Ag1.5%-P y C) CLIPCeO₂-Ag1.5%-PR



Figura 7.24. Determinación de la sensibilidad y la dosis para la eliminación de *E. coli* frente a $\text{CeO}_2\text{-Ag} 1.5\%$ -S a CMLs de: A) patrón, B) 1×10^{-3} , C) 3×10^{-3} , D) 5×10^{-3} , E) 7×10^{-3} , F) 9×10^{-3} (g/mL) y G) patrón sin inóculo.

Tabla 7.3. Determinación de CMI de los materiales para eliminar *E. coli*.

Material	Control 1	3 x 10 ⁻³ g/mL	5 x 10 ⁻³ g/mL	7 x 10 ⁻³ g/mL	9 x 10 ⁻³ g/mL	12 x 10 ⁻³ g/MI
CeO ₂ -H	+	+	+	+	+	+
CeO ₂ -S	+	+	+	+	+	+
CLIPCeO ₂ -I	+	+	+	+	+	+
CLIPCeO ₂ -P	+	+	+	+	+	+
CeO ₂ -Ag1.5%H	+	+	-	-	-	*
CeO ₂ -Ag1.5%S	+	+	-	-	-	*
CLIPCeO ₂ -Ag1.5%I	+	+	+	+	-	-
CLIPCeO ₂ -Ag1.5%P	+	+	+	+	-	-
CLIPCeO ₂ -Ag1.5%IR	+	+	+	+	-	-
CLIPCeO ₂ -Ag1.5%PR	+	+	+	+	-	-

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

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

Antes de evaluar el carácter bactericida de los materiales se realizaron los controles de calidad a las cepas de trabajo, las cuales nos garantizaron su viabilidad y pureza.

En la tabla 7.4, se reportan los valores promedio de colonias de *E. coli* obtenidos de los tres ensayos, para cada uno de los tiempos de exposición a los diferentes materiales con plata evaluados como bactericidas. Como una muestra de referencia, los materiales sin el agente bactericida también fueron evaluados. En la figura 7.25 se observa el efecto inhibitorio en placa microbiana de las bacterias en estudio expuestas a CeO₂-Ag1.5%, el resto de los demás materiales se pueden apreciar en el anexo 2.

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



















Tiempo	Patrón	CeO ₂ -Ag 1.5%. Microondas	CeO ₂ -Ag 1.5%. Hidrotermico
(0 minutos)			
(15 minutos)			
(30 minutos)			
(60 minutos)			
(90 minutos)			
(120 minutos)			

Figura 7.25. Efecto inhibitorio de los materiales CeO₂-Ag 1.5% sobre *Escherichia coli*.

Tabla 7.4. Número de colonias de *E. coli* que sobrevivieron frente a los materiales evaluados como biocidas.

TIEMPO	Patrón	CeO ₂ -S	CeO ₂ -H	CeO ₂ -Ag 1.5%-S	CeO ₂ -Ag 1.5% -H	CLIPCeO ₂ -I	CLIPCeO ₂ -P	CLIPCeO ₂ – Ag1.5%-I	CLIPCeO ₂ – Ag1.5%-P	CLIPCeO ₂ – Ag1.5%-IR	CLIPCeO ₂ – Ag1.5%-PR
0	250	189	235	37	250	57	109	314	305	280	277
15	280	227	286	34	180	163	126	229	61	226	57
30	292	263	257	13	58	238	150	207	16	150	28
60	310	195	220	6	0	302	198	138	0	130	0
90	328	257	267	0	0	350	348	84	0	103	0
120	344	306	245	0	0	350	350	26	0	0	0

La valoración del efecto bactericida de los materiales se realizó al medir la viabilidad celular a los 0, 5, 30, 60, 90 y 120 minutos después de la exposición e incubación de las bacterias con los distintos materiales. Las pruebas se realizaron por triplicado en placas con agar McConkey. Estas pruebas permitieron definir el momento en el que el agente bactericida actúa sobre el ciclo de replicación bacteriano, de tal forma que cada material presenta una gráfica diferente que va de acuerdo a su mecanismo de acción y que se puede observar en las figuras 7.26 y 7.27.

En la figura 7.28, se presenta la gráfica general donde se compara de viabilidad de las bacterias *E. coli* expuestas a los distintos materiales. Como una muestra de referencia, los materiales sin plata también fueron evaluados. La actividad de los materiales con Ag presentan un efecto bactericida. Los resultados de las curvas corresponden a la media de los tres experimentos. La pauta de administración de los materiales bactericidas está en función a la CMB promedio determinada para cada bacteria.

Las pruebas realizadas para examinar la capacidad de los materiales para inhibir el crecimiento de la bacteria se calculó teniendo en cuenta el número de colonias iniciales en la suspensión de microorganismos inoculados y las colonias crecidas en el transcurso del tiempo de exposición. Como una muestra de referencia, los materiales sin el agente bactericida también fueron evaluados.

Los materiales $\text{CeO}_2\text{-Ag1.5\%-S}$, $\text{CeO}_2\text{-Ag1.5\%-H}$, $\text{CLIPCeO}_2\text{-Ag1.5\%-P}$, $\text{CLIPCeO}_2\text{-Ag1.5\%-PR}$ eliminaron más del 70% de las colonias de *E. coli* en un tiempo de 30 minutos, en los siguientes 60 minutos, el efecto supresor de los materiales fue aún más claro, eliminando el 100% de colonias con las diferentes concentraciones utilizadas. El caso de $\text{CLIPCeO}_2\text{-Ag1.5\%-I}$ se produjo una disminución en el número de UFC con respecto al patrón, sin embargo, no logro eliminar al 100 % la bacteria en los 120 min., contrario a esto $\text{CLIPCeO}_2\text{-Ag1.5\%-IR}$ que logro eliminar la bacteria en 120 minutos.

Como se mencionó anteriormente $\text{CLIPCeO}_2\text{-I}$, $\text{CLIPCeO}_2\text{-P}$, $\text{CeO}_2\text{-S}$ y $\text{CeO}_2\text{-H}$ que fueron utilizados como soportes también fueron expuestos a interaccionar con la bacteria con la finalidad de indagar si cuentan con la capacidad para inhibir el crecimiento bacteriano o simplemente su función es la de soporte de las

nanopartículas, se apreció una ligera disminución en el crecimiento de la bacteria sin que este pudiera ser significativo, por lo que se podría considerar que estos cuentan tienen propiedades de un bacteriostático.

En los cultivos de *E. coli* en presencia de los materiales con plata, siempre se observó un efecto bactericida. De toda la serie de materiales evaluados, el material CeO₂-Ag1.5%-H tuvo el mayor efecto bactericida con una CMB de 6 mg/ml, eliminando el 100% del inóculo inicial en un tiempo de 60 min.

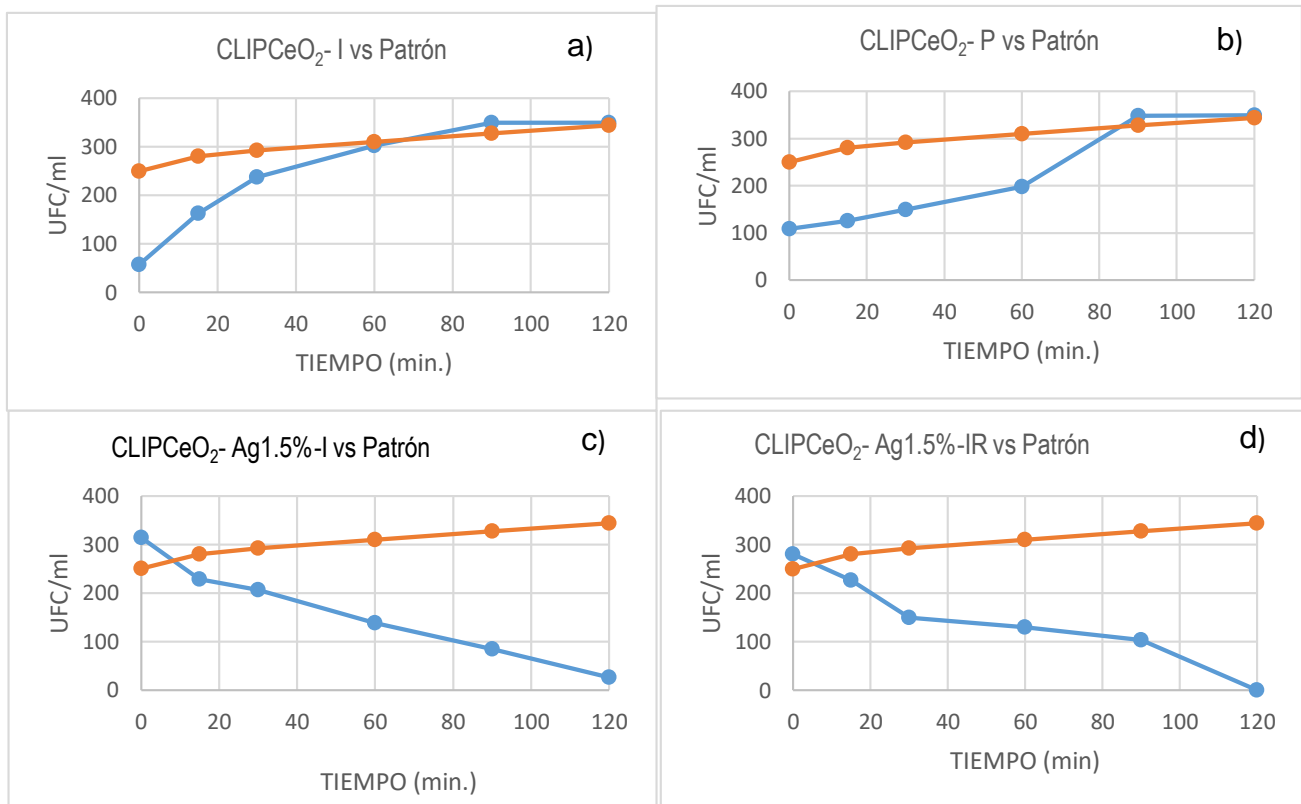


Figura 7.26. Efecto inhibitorio de a) CLIPCeO₂-I, b) CLIPCeO₂-P, c) CLIPCeO₂-Ag1.5%-I, d) CLIPCeO₂-Ag1.5%-IR sobre *E. coli*.

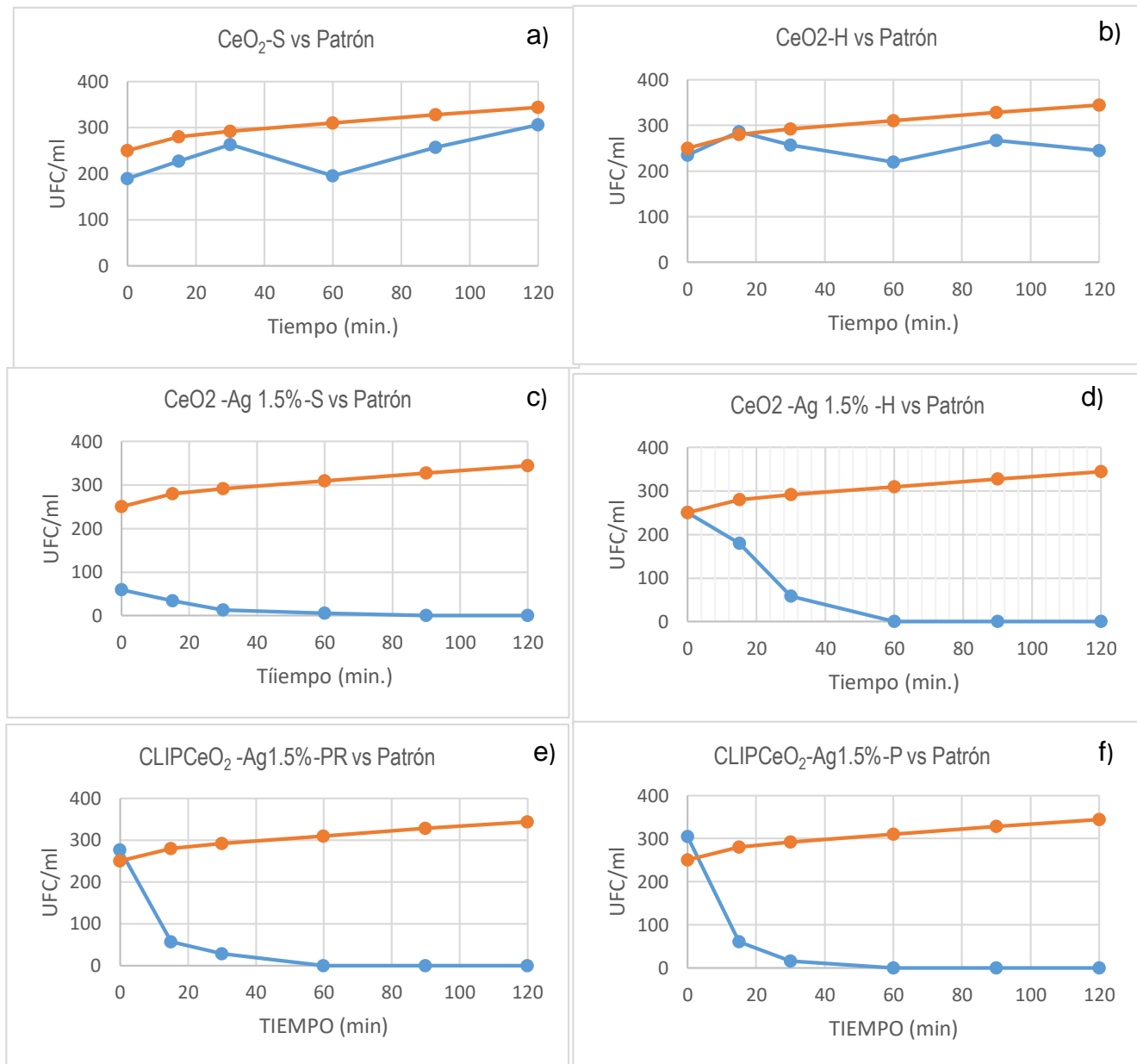


Figura 7.27. Efecto inhibitorio de a) CeO₂-S, b) CeO₂-H, c) CeO₂-Ag1.5%-S, d) CeO₂-Ag1.5%-H, e) CLIPCe-Ag1.5%-PR y f) CLIPCe-Ag1.5%-P sobre *E. coli*.

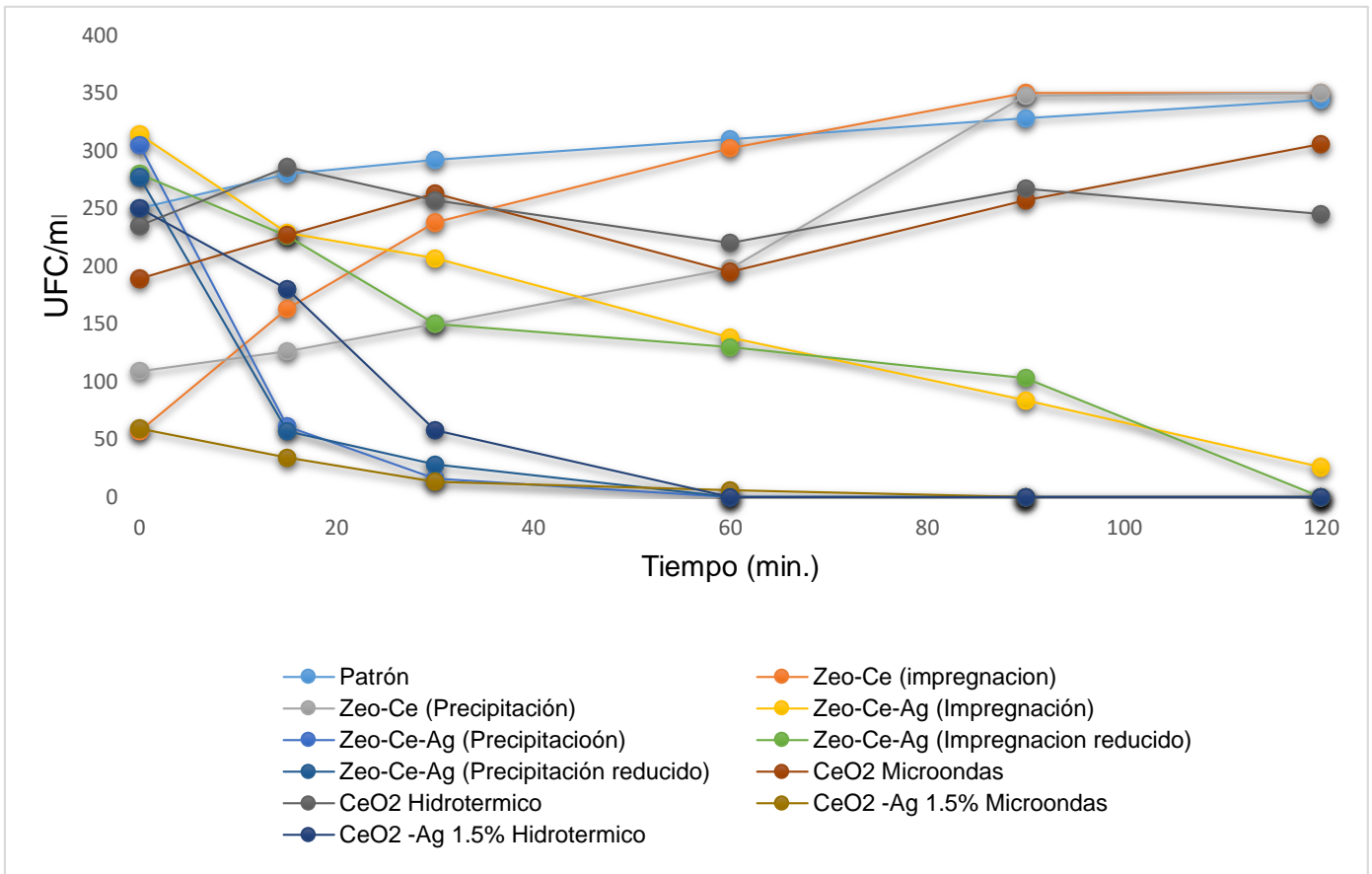


Figura 7.28. Comparativo del efecto inhibitorio que presentan los materiales sobre *E. coli*

8. CONCLUSIÓN.

Se encontró que el óxido de cerio puro sin ser soportado en otro material, dispersa apropiadamente nanopartículas de plata en su superficie, lo suficientemente homogéneo para hacer de estas un material muy eficiente como agente bactericida. La dispersión adicional del óxido de cerio sobre zeolita clinoptilolita no presentó ninguna ventaja adicional al soporte puro de óxido de cerio. En pruebas dinámicas bactericidas se encontró que las nanopartículas de plata soportadas en óxido de cerio puro eliminan hasta el 70% de las bacterias en periodos de 30 min, y el 100% de ellas en 60 min.

Por medio de BET, se apreció un incremento en el área superficial de la zeolita después de haber sido modificada con nanopartículas óxido de cerio mediante el método de deposición-precipitación, esto debido al pH ácido al que fue sometida la zeolita, lo que provoca una ruptura en la red cristalina de la zeolita y por lo tanto cambios mínimos y poco distinguibles en la morfología y estructura cristalina de esta. Lo anterior brinda una deposición de las nanopartículas de plata en la superficie del soporte de una manera homogénea lo que resultó en cúmulos de plata apreciables por SEM.

La eliminación de *Escherichia coli* a una concentración de 1.5% de plata en relación peso se logró en tiempos de 60 y 90 minutos dependiendo del soporte en el que fue depositada, sin embargo, la cantidad de material requerido para matar la bacteria fue distinta dependiendo de la técnica de síntesis utilizada para la obtención de cada uno de los soportes, considerando que las nanopartículas de plata soportada en cristales de óxido de cerio obtuvieron una acción bactericida a concentraciones menores.

El análisis de la composición superficial EDS realizado a los distintos materiales después de ser expuestos a una interacción con la bacteria, mostró la presencia de fósforo y un contenido ligeramente mayor de oxígeno, mientras que el contenido de cerio y plata disminuyó. El contenido obtenido debido a átomos adicionales de fósforo y oxígeno coincide con la pérdida de contenido de átomos de plata y cerio, lo que sugiere que una fase que incluye fósforo y oxígeno se formó encima de las

nanopartículas de plata, ocultando también partes de las nanopartículas de CeO_2 , sin embargo, también existe la pérdida de cantidades considerables de plata por disolución durante el experimento bactericida. Las estimaciones cuantitativas del análisis elemental indican que la estructura formada contiene fósforo y oxígeno, la cual podría corresponder a los fosfatos que forman los fosfolípidos, que probablemente están unidos a la plata a través de cadenas más cortas de fosfolípidos rotos.

La síntesis del soporte y la presencia de cúmulos de nanopartículas de plata influyen en la efectividad del material para inhibir el crecimiento de la bacteria, así como, la presencia de CeO_2 debido a que, aun cuando no se aprecia una eliminación significativa de la bacteria, se observa que la eliminación se favorece en aquellos material con mayor porcentaje de CeO_2 . Las condiciones del proceso de reducción con flujo de hidrogeno utilizado en este trabajo podría repercutir sobre la forma de las nanopartículas disminuyendo la capacidad bactericida de los materiales.

9. RECOMENDACIONES

- Para trabajos posteriores a este, se recomienda la caracterización de los materiales mediante técnicas de mayor sensibilidad que nos permitan obtener resultados más precisos, por ejemplo: se sugiere la caracterización de la composición química de la superficie de estos materiales para lo que se sugiere las siguientes técnicas; Espectrometría infrarroja por Transformadas de Fourier (FTIR) ya que Esta técnica proporciona un espectro de reflexión de las bandas de los grupos funcionales de las sustancias inorgánicas y orgánicas, por lo cual es posible realizar una identificación de los materiales. Por Espectroscopia Fotelectrónica de Rayos X (XPS) este análisis proporciona información sobre la composición elemental, el estado químico de cada elemento, la posición de los átomos con respecto a la estructura cristalina del material, la homogeneidad superficial y el estado de adsorbatos.), por espectrometría de emisión atómica con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP) y por último, por espectrometría de absorción atómica (FAAS), (ambas determinan la concentración de metal). También se propone el uso de técnicas que nos permitan conocer la estructura de nuestro material, su composición y tamaño de partículas debido a que la microscopia electrónica de barrido no nos permitió la identificación del tamaño de las nanopartículas de plata, lo que se esperaba encontrar por medio de técnicas como; el microscopio electrónico de transmisión (TEM) (determina el tamaño del núcleo metálico), el microscopio de fuerza atómica (AFM) (mide el tamaño de la NP y su distribución).
- También se sugiere el análisis sobre la forma de las nanopartículas soportadas, debido a que Pal y colaboradores sugieren que la forma de las nanopartículas también influye en la toxicidad. Se ha comprobado que las formas de triangulo truncado son más tóxicas que las formas esféricas y alargadas, ya que contienen más caras y por tanto son más reactivas (Pal et al., 2007). Siendo las esféricas las que presentan menor toxicidad.

- Realizar variaciones en la temperatura de reducción en flujo con hidrogeno, esto con la intención de buscar un incremento en el tamaño de las nanopartículas metálicas depositadas en los materiales, esto debido a que distintos trabajos realizados han reportado la influencia de la temperatura respecto a su tamaño, como es el caso del trabajo realizado por (Concepción-Rosabala et al., 2008) donde encontraron que el incremento en las temperaturas de reducción deriva en el aumento del tamaño de las nanopartículas. Con el aumento en el tamaño de las nanopartículas de plata se pretende mejorar la eficiencia en la eliminación de bacterias y probablemente una reducción en el tiempo de eliminación de estas, ya que, el trabajo realizado por Guerra y colaboradores (Guerra et al., 2012) donde evaluaron las propiedades bactericidas de varios materiales a distintas temperaturas y distintos tamaños de nanopartículas de plata soportados, llevándolos a deducir que el tamaño de partícula de la plata influye en la eficiencia de los distintos materiales como bactericida, ya que reportan que a mayor tamaño de partícula la eliminación de la bacteria es superior, por lo que, se propone investigar la influencia del tamaño de las nanopartículas de plata soportadas en la zeolita modificada, y así, poder deducir si la eliminación bacteriana se incrementa con el aumento del tamaño de las nanopartículas o disminuye .
- Por último, se recomienda el uso de distintos métodos para la deposición de la plata y el cerio, esto con la finalidad de encontrar un método que permita una efectividad mayor en la eliminación de bacterias. Para la deposición de cerio en la zeolita por el método de depósito-precipitación se propone realizar variables en su temperatura y pH, con la finalidad de encontrar las variables más óptimas para mejorar la funcionalidad de los materiales.

10. REFERENCIAS

- ❖ Agnihotri, S., Mukherji, S., & Mukherji, S. (2014). Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *RSC Advances*, 4(8), 3974-3983.
- ❖ Alpaslan, E., Geilich, B. M., Yazici, H., & Webster, T. J. (2017). pH-Controlled Cerium Oxide Nanoparticle Inhibition of Both Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria Growth. *Sci Rep*, 7.
- ❖ Asati, A., Santra, S., Kaittanis, C., & Perez, J. M. (2010). Surface-charge-dependent cell localization and cytotoxicity of cerium oxide nanoparticles. *ACS Nano*, 4(9), 5321-5331.
- ❖ Backhaus, K., Marugán, J., van Grieken, R., & Sordo, C. (2010). Photocatalytic inactivation of *E. faecalis* in secondary wastewater plant effluents. *Water Science and Technology*, 61(9), 2355-2361.
- ❖ Baerlocher, C., Olson, D., & Meier, W. (2001). *Atlas of Zeolite Framework Types (formerly: Atlas of Zeolite Structure Types)*: Elsevier.
- ❖ Bogdanchikova, N. E., Rosabal, B. C., Petranovskii, V. P., Boja, M. A., & Rodriguez-Fuentes, G. (2000). *Microbicide effect of AG-clinoptilolites: I. Preparation and investigation of structure of samples containing silver in different states*. Paper presented at the International Symposium on Optical Science and Technology.
- ❖ Bosch, P., & Schifter, I. (2003). LA ZEOLITA una piedra que hierve. México, D.F.: FONDO DE CULTURA ECONOMICA, SECRETARIA DE EDUCACION PUBLICA, CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA. (Reprinted from: 3°).
- ❖ Bosch, P., Schifter, I., & Pedro Boch, I. S. (2003). *La zeolita: una piedra que hierve*.
- ❖ Bozzola, J. J., & Russell, L. D. (1999). *Electron microscopy: principles and techniques for biologists*: Jones & Bartlett Learning.
- ❖ Carranza, C., & Montero, M. L. (2016). Producción de sulfato de aluminio y zeolita a partir de los lodos residuales de la empresa Extralum SA. *Revista Tecnología en Marcha*, 15(3), 49-54.
- ❖ Cervantes, C., & Silver, S. (1992). Plasmid chromate resistance and chromate reduction. *Plasmid*, 27(1), 65-71. doi: [https://doi.org/10.1016/0147-619X\(92\)90007-W](https://doi.org/10.1016/0147-619X(92)90007-W)
- ❖ Concepción-Rosabala, B., Pentón-Madrigal, A., Estévez-Ramsa, E., Bogdanchikov, N., & Avalos-Borjac, M. (2008). Estudio de la distribución de nanocristales de Ag en clinoptilolita natural. *Revista Cubana de Física*, 25(2B), 136-142.
- ❖ Contreras, A., Casals, E., Puentes, V., Komilis, D., Sánchez, A., & Font, X. (2015). Use of cerium oxide (CeO₂) nanoparticles for the adsorption of dissolved cadmium (II), lead (II) and chromium (VI) at two different pHs in single and multi-component systems. *Global Nest Journal*, 17(3), 536-543.
- ❖ Cooper, R. (2004). A review of the evidence for the use of topical antimicrobial agents in wound care. *World wide wounds*, 1-11.
- ❖ CHANG, Q., HE, H., QU, J., & ZHAO, J. (2008). Influencing Factors in Catalytically Bactericidal Process of Ag-Ce/AlPO₄ Catalyst in Water. *Chinese Journal of Catalysis*, 3, 004.
- ❖ Chang, Q., He, H., Zhao, J., Yang, M., & Qu, J. (2008). Bactericidal activity of a Ce-promoted Ag/AlPO₄ catalyst using molecular oxygen in water. *Environmental science & technology*, 42(5), 1699-1704.
- ❖ CHEUN, K. (1996). Antibacterial activity of A-type zeolite supporting silver ions in deionized distilled water. *J. Antibact. Antifung. Agent*, 24, 269-274.

- ❖ Damm, C., Münstedt, H., & Rösch, A. (2008). The antimicrobial efficacy of polyamide 6/silver-nano-and microcomposites. *Materials Chemistry and Physics*, 108(1), 61-66.
- ❖ Dasgupta, N., Ranjan, S., Rajendran, B., Manickam, V., Ramalingam, C., Avadhani, G. S., & Kumar, A. (2016). Thermal co-reduction approach to vary size of silver nanoparticle: its microbial and cellular toxicology. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(5), 4149-4163.
- ❖ Davidson, P., & Parish, M. (1989). Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food technology (USA)*.
- ❖ De la Rosa-Gómez, I., Olguín, M., & Alcántara, D. (2008). Bactericides of coliform microorganisms from wastewater using silver-clinoptilolite rich tuffs. *Applied Clay Science*, 40(1), 45-53.
- ❖ Dowding, J. M., Das, S., Kumar, A., Dosani, T., McCormack, R., Gupta, A., . . . Self, W. T. (2013). Cellular interaction and toxicity depend on physicochemical properties and surface modification of redox-active nanomaterials. *ACS Nano*, 7(6), 4855-4868. doi: 10.1021/nn305872d
- ❖ Echiguerra, J. L., Burt, J. L., Morones, J. R., Camacho-Bragado, A., Gao, X., Lara, H. H., & Yacaman, M. J. (2005). Interaction of silver nanoparticles with HIV-1.: J. Nanobiotechnology.
- ❖ Egger, S., Lehmann, R. P., Height, M. J., Loessner, M. J., & Schuppler, M. (2009). Antimicrobial properties of a novel silver-silica nanocomposite material. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(9), 2973-2976.
- ❖ Fabrega, J., Fawcett, S. R., Renshaw, J. C., & Lead, J. R. (2009). Silver nanoparticle impact on bacterial growth: effect of pH, concentration, and organic matter. *Environmental science & technology*, 43(19), 7285-7290.
- ❖ Feng, Q., Wu, J., Chen, G., Cui, F., Kim, T., & Kim, J. (2000). A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. *Journal of biomedical materials research*, 52(4), 662-668.
- ❖ Flanigen, E. M., Jansen, J. C., & van Bekkum, H. (1991). *Introduction to Zeolite Science and Practice*: Elsevier Science.
- ❖ Guerra, R., Lima, E., & Guzmán, A. (2013). Antimicrobial supported nanoparticles: Gold versus silver for the cases of Escherichia coli and Salmonella typhi. *Microporous and Mesoporous Materials*, 170, 62-66. doi: 10.1016/j.micromeso.2012.11.036
- ❖ Guerra, R., Lima, E., Viniegra, M., Guzmán, A., & Lara, V. (2012). Growth of Escherichia coli and Salmonella typhi inhibited by fractal silver nanoparticles supported on zeolites. *Microporous and Mesoporous Materials*, 147(1), 267-273. doi: 10.1016/j.micromeso.2011.06.031
- ❖ Hurk, R. v. d., & Evoy, S. (2015). A review of membrane-based biosensors for pathogen detection. *Sensors*, 15(6), 14045-14078.
- ❖ Inoue, Y., Hoshino, M., Takahashi, H., Noguchi, T., Murata, T., Kanzaki, Y., . . . Sasatsu, M. (2002). Bactericidal activity of Ag-zeolite mediated by reactive oxygen species under aerated conditions. *Journal of inorganic biochemistry*, 92(1), 37-42.
- ❖ Kawahara, K., Tsuruda, K., Morishita, M., & Uchida, M. (2000). Antibacterial effect of silver-zeolite on oral bacteria under anaerobic condition. (pp. 452-455.): Dent. Mater.
- ❖ Kesraoui-Ouki, S., Cheeseman, C. R., & Perry, R. (1994). Natural zeolite utilisation in pollution control: A review of applications to metals' effluents. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 59(2), 121-126.
- ❖ Khan, S., Ansari, A. A., Rolfo, C., Coelho, A., Abdulla, M., Al-Khayal, K., & Ahmad, R. (2017). Evaluation of in vitro cytotoxicity, biocompatibility, and changes in the

- expression of apoptosis regulatory proteins induced by cerium oxide nanocrystals. *Science and Technology of Advanced Materials*, 18(1), 364-373.
- ❖ KOURAI, H. (1994). Mode of bactericidal action of zirconium phosphate ceramics containing silver ions in the crystal structure. *J. Antibact. Antifung. Agents*, 22, 595-601.
 - ❖ Kumari, M., Singh, S. P., Chinde, S., Rahman, M. F., Mahboob, M., & Grover, P. (2014). Toxicity study of cerium oxide nanoparticles in human neuroblastoma cells. *International journal of toxicology*, 33(2), 86-97.
 - ❖ Lara, H. H., Ayala-Nuñez, N. V., Ixtepan-Turrent, L., & Rodriguez-Padilla, C. (2010). mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1: J. Nanobiotechnology.
 - ❖ Leyva-Ramos, R., Aguilar-Armenta, G., Gonzalez-Gutierrez, L. V., Guerrero-Coronado, R. M., & Mendoza-Barron, J. (2004). Ammonia exchange on clinoptilolite from mineral deposits located in Mexico. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79(6), 651-657.
 - ❖ Lin, K.-S., & Chowdhury, S. (2010). Synthesis, characterization, and application of 1-D cerium oxide nanomaterials: a review. *International journal of molecular sciences*, 11(9), 3226-3251.
 - ❖ Lin, W., Huang, Y.-w., Zhou, X.-D., & Ma, Y. (2006). Toxicity of cerium oxide nanoparticles in human lung cancer cells. *International journal of toxicology*, 25(6), 451-457.
 - ❖ Lok, C.-N., Ho, C.-M., Chen, R., He, Q.-Y., Yu, W.-Y., Sun, H., . . . Che, C.-M. (2006). Proteomic Analysis of the Mode of Antibacterial Action of Silver Nanoparticles. *Journal of Proteome Research*, 5(4), 916-924. doi: 10.1021/pr0504079
 - ❖ Mexicana, N. (2000). NOM-AA-42-SCFI-1987. "Calidad del agua determinación del número más probable (NMP) de coliformes totales, coliformes fecales (termotolerantes) y *Escherichia coli* presuntiva." Secretaría de Comercio y Fomento Industrial, Dirección General de Normas.
 - ❖ Mexicana, N. O. (1994). NOM-127-SSA1-1994, salud ambiental. *Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización, México, Secretaría de Salud.*
 - ❖ Miyoshi, H., Kourai, H., & Maeda, T. (1998). Light-induced formation of 2, 5-dihydroxy-p-benzoquinone from hydroquinone in photoirradiated silver-loaded zirconium phosphate suspension. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 94(2), 283-287.
 - ❖ Miyoshi, H., Kourai, H., Maeda, T., & Yoshino, T. (1998). Role of Cl⁻ adsorbed on silver-loaded zirconium phosphate for the photooxidation of OH⁻ to OH·. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 113(3), 243-250.
 - ❖ Montsoriu, T., & de Dios, J. (1996). *Ingeniería de aguas residuales: tratamiento, vertido y reutilización*: Metcalf & Eddy.
 - ❖ Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Tapia, J., & Yacaman, M. J. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles (Vol. 16, pp. 2346-2353): Nanotechnology.
 - ❖ Nataro, J. P. (2005). Enteroggregative *Escherichia coli* pathogenesis. *Current opinion in gastroenterology*, 21(1), 4-8.
 - ❖ Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*, 11(1), 142-201.
 - ❖ Nataro, J. P., Mai, V., Johnson, J., Blackwelder, W. C., Heimer, R., Tirrell, S., . . . Hirshon, J. M. (2006). Diarrheagenic *Escherichia coli* infection in Baltimore, Maryland, and New haven, Connecticut. *Clinical infectious diseases*, 43(4), 402-407.
 - ❖ Neidhardt, F. C., & Curtiss, R. (1999). *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*: ASM press Washington, DC:.

- ❖ Nithya, A., JeevaKumari, H. L., Rokesh, K., Ruckmani, K., Jeganathan, K., & Jothivenkatachalam, K. (2015). A versatile effect of chitosan-silver nanocomposite for surface plasmonic photocatalytic and antibacterial activity. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 153, 412-422.
- ❖ Nuñez, N. E., Bideberripe, H., Casella, M., & Siri, G. J. (2013). *Oxidación preferencial de CO mediante catalizadores de Cu y Pt sobre CeO₂-Al₂O₃*. Paper presented at the II Jornadas de Investigación y Transferencia de la Facultad de Ingeniería.
- ❖ Pal, S., Tak, Y. K., & Song, J. M. (2007). Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), 1712-1720.
- ❖ Palacios, M. P., Lupiola, P., Del Nero, E., Pardo, A., Rodriguez, F., Pita, M. L., & Tejedor, M. T. (1999). Primeros resultados del estudio de la persistencia de *Salmonella* en la zona no saturada del suelo agrícola. tenerife.
- ❖ Panacek, A., Kvittek, L., Pucek, R., Kolar, M., Vecerova, R., Pizurova, N., . . . Zboril, R. (2006). Silver colloid nanoparticles: synthesis characterization, and their antibacterial activity (pp. 16248-16253).
- ❖ Parish, M., Beuchat, L., Suslow, T., Harris, L., Garrett, E., Farber, J., & Busta, F. (2003). Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2(s1), 161-173.
- ❖ Patil, S., Sandberg, A., Heckert, E., Self, W., & Seal, S. (2007). Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential. *Biomaterials*, 28(31), 4600-4607.
- ❖ Pelletier, D. A., Suresh, A. K., Holton, G. A., McKeown, C. K., Wang, W., Gu, B., . . . Allison, M. R. (2010). Effects of engineered cerium oxide nanoparticles on bacterial growth and viability. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(24), 7981-7989.
- ❖ Pulido, M. d. P. A., de Navia, S. L. Á., Torres, S. M. E., & Prieto, A. C. G. (2005). Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua. *Nova*, 3(4).
- ❖ Ramos, R. L., Castillo, M. A. S., Sánchez, M. V. H., & Coronado, R. M. G. (2001). Remoción de metales pesados de solución acuosa por medio de clinoptilolitas naturales. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 17(3), 129-136.
- ❖ Rivera-Garza, M., Olguin, M., Garcia-Sosa, I., Alcántara, D., & Rodriguez-Fuentes, G. (2000). Silver supported on natural Mexican zeolite as an antibacterial material. *Microporous and Mesoporous Materials*, 39(3), 431-444.
- ❖ Rook, J. J. (1974). Formation of haloforms during chlorination of natural waters. *Water Treat. Exam.*, 23, 234-243.
- ❖ Ruparelia, J. P., Chatterjee, A. K., Duttgupta, S. P., & Mukherji, S. (2008). Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Acta biomaterialia*, 4(3), 707-716.
- ❖ Rüttler, M., Renna, N., Balbi, L., Garcia, B., Guidone, L., Fernandez, R., . . . Ortiz, A. (2002). Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from children with acute diarrhea, in Mendoza, Argentina. *Revista Argentina de microbiología*, 34(3), 167-170.
- ❖ Salazar-Banda, G. R., Moraes, S. R., Motheo, A. J., & Machado, S. A. (2009). Anticorrosive cerium-based coatings prepared by the sol-gel method. *Journal of sol-gel science and technology*, 52(3), 415-423.
- ❖ Shameli, K., Ahmad, M. B., Zargar, M., Yunus, W. M. Z. W., & Ibrahim, N. A. (2011). Fabrication of silver nanoparticles doped in the zeolite framework and antibacterial activity. *International journal of nanomedicine*, 6, 331.

- ❖ Shrivastara, S., Bera, T., Roy, A., Singh, G., Ramachandrarao, P., & Dash, D. (2007). Characterization of enhanced antibacterial affects of novel silver nanoparticles (Vol. 18, pp. 1-9): *Nanotechnology*.
- ❖ Silver, S. (1983). Bacterial interactions with mineral cations and anions: good ions and bad *Bio mineralization and biological metal accumulation* (pp. 439-457): Springer.
- ❖ Silver, S. (2003). Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS microbiology reviews*, 27(2-3), 341-353.
- ❖ Silver, S., Misra, T. K., & Laddaga, R. A. (1989). DNA sequence analysis of bacterial toxic heavy metal resistances. *Biological trace element research*, 21(1), 145-163.
- ❖ Skandamis, P., Koutsoumanis, K., Fasseas, K., & Nychas, G. E. (2001). Inhibition of oregano essential oil and EDTA on Escherichia coli O157: H7. *Italian Journal of Food Science*, 13(1), 65-75.
- ❖ Sondi, I., & Salopek-Sondi, B. (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria.
- ❖ Štangar, U. L., Opara, U., & Orel, B. (1997). Structural and electrochemical properties of sol-gel derived Mo: CeO₂, Si: Mo: CeO₂ and Si: CeO₂ nanocrystalline films for electrochromic devices. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 8(1), 751-758.
- ❖ Stoimenov, P. K., Klinger, R. L., Marchin, G. L., & Klabunde, K. J. (2002). Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents. *Langmuir*, 18(17), 6679-6686.
- ❖ Thill, A., Zeyons, O., Spalla, O., Chauvat, F., Rose, J., Auffan, M., & Flank, A. M. (2006). Cytotoxicity of CeO₂ nanoparticles for Escherichia coli. Physico-chemical insight of the cytotoxicity mechanism. *Environmental science & technology*, 40(19), 6151-6156.
- ❖ Thurman, R. B., Gerba, C. P., & Bitton, G. (1989). The molecular mechanisms of copper and silver ion disinfection of bacteria and viruses. *Critical reviews in environmental science and technology*, 18(4), 295-315.
- ❖ Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). *Introducción a la microbiología: Médica Panamericana*.
- ❖ Tuovinen, O. H., Puhakka, J., Hiltunen, P., & Dolan, K. M. (1985). Silver toxicity to ferrous iron and pyrite oxidation and its alleviation by yeast extract in cultures of Thiobacillus ferrooxidans. *Biotechnology letters*, 7(6), 389-394.
- ❖ UNICEF. (2006). *Progress for Children: A Report Card on Water and Sanitation: UNICEF*.
- ❖ Vargas, E., Álvarez, H., & Cervantes, C. (1998). Sistemas bacterianos de expulsión de metales tóxicos. *Revista latinoamericana de microbiología*, 40(1), 53-71.
- ❖ Yan, J., & Cheng, J. (2005). Antimicrobial yarn having nanosilver particles and methods for manufacturing the same: Google Patents.
- ❖ Zhang, Y.-W., Si, R., Liao, C.-S., Yan, C.-H., Xiao, C.-X., & Kou, Y. (2003). Facile alcoholthermal synthesis, size-dependent ultraviolet absorption, and enhanced CO conversion activity of ceria nanocrystals. *The Journal of Physical Chemistry B*, 107(37), 10159-10167.

ANEXO 1.

CeO₂ por síntesis sol-gel asistido por microondas

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

Para preparar 6 g de CeO₂.

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

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

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

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

Para 0.0348 moles de Etilenglicol

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

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

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

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

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

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

1g-10ml de agua

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

CeO₂ por síntesis hidrotérmico

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

Para preparar 6 g de CeO₂.

PM CeO₂ = 172.113 g/mol

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

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

Deposición de óxido de cerio y plata en clinoptilolita.

NaCl 5 M

PM NaCl = 58.44 g/mol

$$M = \frac{n}{L} = \frac{\frac{W}{PM}}{L}$$

$$V = \frac{W}{M * PM} = \frac{100 \text{ gr}}{5 \text{ mol/L} * 58.44 \text{ g/mol}} = 0.3422 \text{ Lt}$$

$$0.3422 \text{ L} \left(\frac{1000 \text{ ml}}{1 \text{ L}} \right) = 342.2 \text{ ml}$$

80 ml de NaOH al 0.5 N

PM NaOH = 40 gr/mol

$$N = \frac{\text{Equivalentes del soluto}}{\text{Volumen de solución}}$$

$$\text{Equivalentes} = \frac{\text{masa del soluto}}{\text{masa equivante}}$$

$$\text{Masa equivalente de una base} = \frac{\text{Peso molecular}}{\text{n}^\circ \text{ de OH}^-} = \frac{40 \text{ gr/mol}}{1 \text{ mol}} = 40 \text{ gr}$$

$$N = \frac{\frac{\text{masa del soluto}}{\text{masa equivalente}}}{\text{Volumen solución}}$$

$$\text{Masa del soluto} = N(\text{masa equivalente})(\text{Volumen de solución})$$

$$\text{Masa del soluto} = 0.5 N(40 \text{ gr})(0.08L)=1.6 \text{ gr}$$

50 ml de $(\text{NH}_4)_2[\text{Ce}(\text{NO}_3)_6]$ al 0.5N

PM de $(\text{NH}_4)_2[\text{Ce}(\text{NO}_3)_6]=588.22 \text{ gr/mol}$

$$\text{Masa equivalente sal} = \frac{PM}{\text{Carga del catión o anión}} = \frac{588.22 \text{ gr/mol}}{2} = 294.11 \text{ gr}$$

$$\text{Masa del soluto} = 0.5 N(294.11 \text{ gr})(0.05L) = 7.35 \text{ gr}$$

PLATA 1.5%

$$1.5\%/100\%= 0.015$$

$$\text{Ag} = 3\text{g} (0.015)= 0.045\text{g}$$

$$\text{Moles de plata de plata} = 0.045\text{g}/107.87\text{g/mol}=0.000417 \text{ mol}$$

$$\text{PM/PUREZA} = 169.89/0.9999 = 169.89$$

Gramos de sal

$$\text{Nitrato de plata} = 169.89 (0.000417)=0.070\text{g de Nitrato de Plata}$$

$$3\text{g}-0.070\text{g}=2.93\text{g de CeO}_2.$$

ANEXO 2.














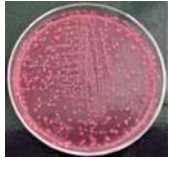




Tiempo	Patrón	CeO ₂ Microondas	CeO ₂ Hidrotérmico
(0 minutos)			
(15 minutos)			
(30 minutos)			
(60 minutos)			
(90 minutos)			
(120 minutos)			

Figura 12.1. Efecto inhibitorio de los materiales CeO₂ sobre *Escherichia coli*.





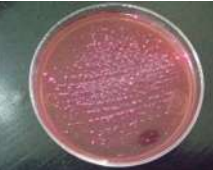





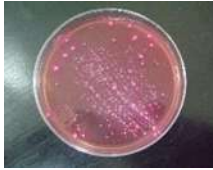







Tiempo	Patrón	CLIPCeO ₂ -I	CLIPCeO ₂ -P
(0 minutos)			
(15 minutos)			
(30 minutos)			
(60 minutos)			
(90 minutos)			
(120 minutos)			

Figura 12.2. Efecto inhibitorio de los materiales CLIPCeO₂ sobre *E. coli*.





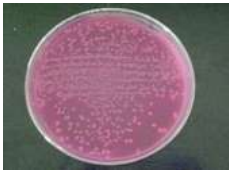
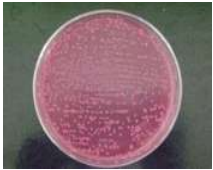


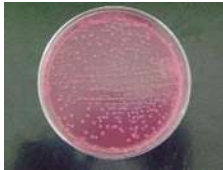









Tiempo	Patrón	CLIPCeO ₂ -Ag1.5%-I	CLIPCeO ₂ -Ag1.5%-IR
(0 minutos)			
(15 minutos)			
(30 minutos)			
(60 minutos)			
(90 minutos)			
(120 minutos)			

Figura 12.3. Efecto inhibitorio de los materiales CLIPCeO₂-Ag%-I sobre *E. coli*.















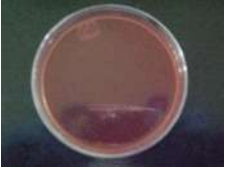



T i e m p o	P a t r ó n	CLIPCeO ₂ -Ag1.5%-P	CLIPCeO ₂ -Ag1.5%-PR
(0 minutos)			
(15 minutos)			
(30 minutos)			
(60 minutos)			
(90 minutos)			
(120 minutos)			

Figura 12.4. Efecto inhibitorio de los materiales CLIPCeO₂-Ag1.5%-P sobre *E. coli*.

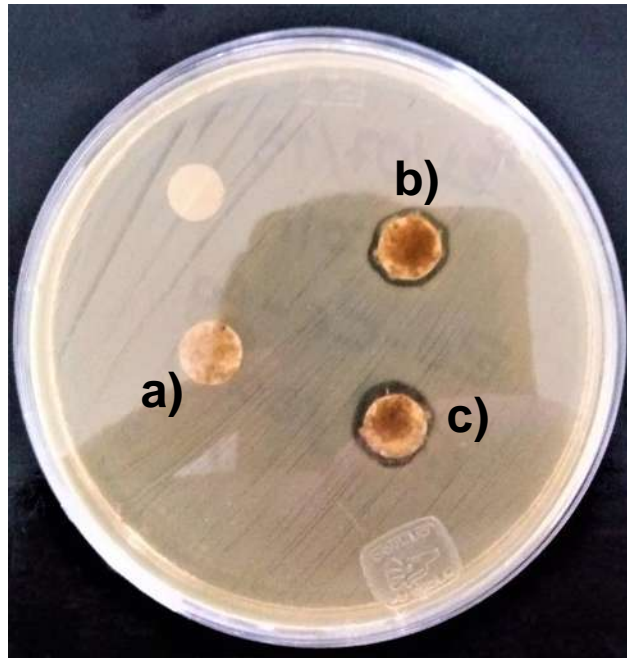


Figura 12.5. Halos de inhibición representados por zonas claras que indican nulo crecimiento de *E. coli*, producidos por; A) CLIPCeO₂-I, B) CLIPCeO₂-Ag1.5%-I y C) CLIPCeO₂-Ag1.5%-IR

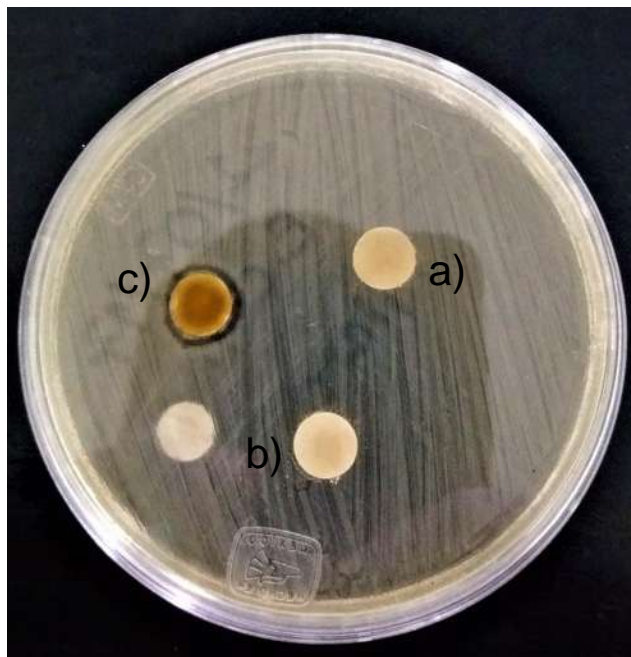


Figura 12.6. Halos de inhibición representados por zonas claras que indican nulo crecimiento de *E. coli*, producidos por; A) CeO₂-S, B) CeO₂-Ag0.5%-S y C) CLIPCeO₂-Ag1.5%-S

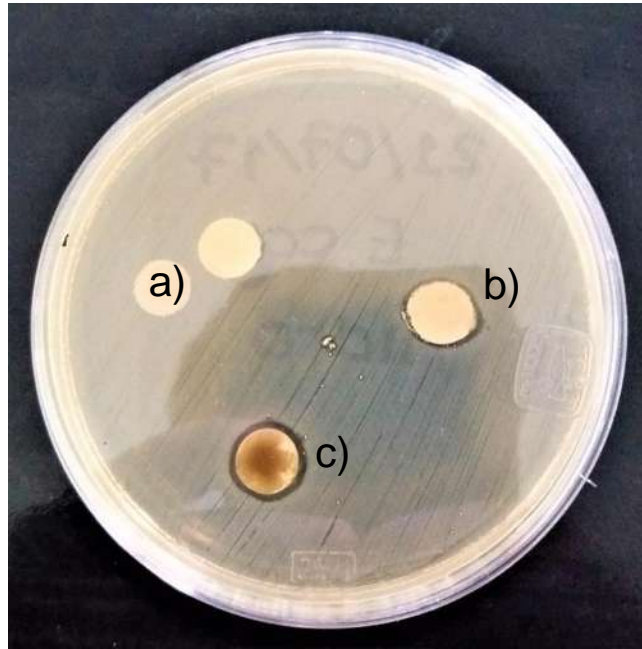


Figura 12.7. Halos de inhibición representados por zonas claras que indican nulo crecimiento de *E. coli*, producidos por; A) $\text{CeO}_2\text{-H}$, B) $\text{CeO}_2\text{-Ag}0.5\%\text{-H}$ y C) $\text{CLIPCeO}_2\text{-Ag}1.5\%\text{-H}$