



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

TESIS

**SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
MICROBICIDA DE NANOMATERIALES DE COBRE**

PRESENTA

ALDO AXEL MUÑOZ HUERTA

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAestrÍA EN CIENCIAS ÁREA
TOXICOLOGÍA**

TUTORA

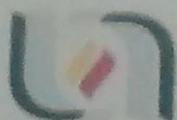
DRA. ILIANA E. MEDINA RAMIREZ

COMITÉ TUTORAL

MC. IRMA ADRIANA CASTRO GALLO

DR. ALEJANDRO ALATORRE ORDAZ

AGUASCALIENTES, AGS. 27 DE NOVIEMBRE DE 2014



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
Departamento de Química



ANIVERSARIO
uaa

M. EN C. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS
DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS
P R E S E N T E

Por medio del presente, y en mi calidad de Tutor designado del estudiante **Aldo Axel Muñoz Huerta** con ID 107713 quien realizó la tesis titulada: "**SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD MICROBICIDA DE NANOMATERIALES DE COBRE**" y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que el alumno pueda continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATE NTAMENTE

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 21 de noviembre de 2014.

Dra. Iliana Ernestina Medina Ramírez
Tutor de tesis

c.c.p - Interesado
c.c.p - Secretaria de Investigación y Posgrado
c.c.p - Jefatura del Depto. de Química
c.c.p - Consejo Académico
c.c.p - Minuta Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES
CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
Departamento de Química



ANIVERSARIO
UAA

M. EN C. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS
P R E S E N T E

Por medio del presente, y en mi calidad de asesor del estudiante **Aldo Axel Muñoz Huerta** con ID 107713 quien realizó la tesis titulada: "SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD MICROBICIDA DE NANOMATERIALES DE COBRE" y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que el alumno pueda continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATE NTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 21 de noviembre de 2014.

M en C. Irma Adriana Castro Gallo
Asesor de tesis

c.c.p. - Interesado
c.c.p. - Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p. - Jefatura del Depto. de Química
c.c.p. - Consejo Académico
c.c.p. - Minuta Secretario Técnico



Universidad
de Guanajuato

Dr. Alejandro Alatorre Ordaz
Profesor Titular A

Departamento de Química-Unidad La Venada
DCNE-Campus Guanajuato
Universidad de Guanajuato
Cerro de la Venada S/N, Col. Pueblito de Rocha
Guanajuato, Gto. 36250, México

Tel. (52)-473-73-275-55
Correo: alatorre@ugto.mx
alejandro.alatorre.ordaz@gmail.com

Guanajuato, Gto. A 21 de Noviembre de 2014

M. EN C. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE AGUASCALIENTES
P R E S E N T E

Por medio del presente, y en mi calidad de revisor del trabajo del estudiante **Aldo Axel Muñoz Huerta** con ID 107713 quien realizó la tesis titulada: **"SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD MICROBICIDA DE NANOMATERIALES DE COBRE"** y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que el alumno pueda continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

Atentamente

Dr. Alejandro Alatorre Ordaz
Profesor Investigador Titular A



LA VERDAD OS HARÁ LIBRES



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

**L.A.Q.B. ALDO AXEL MUÑOZ HUERTA
ALUMNO (A) DE LA MAESTRÍA EN
CIENCIAS EN EL ÁREA DE TOXICOLOGÍA
P R E S E N T E .**

Estimado (a) alumno (a) Muñoz;

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **"SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD MICROBICIDA DE NANOMATERIALES DE COBRE"**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE
Aguascalientes, Ags., 26 de noviembre de 2014
"SE LUMEN PROFERRE"
EL DECANO

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS



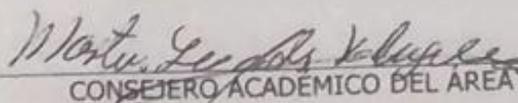
c.c.p.- Archivo
JJRG,mjda

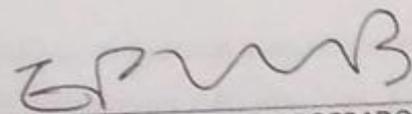
DICTAMEN DE REVISIÓN DE LA TESIS / TRABAJO PRÁCTICO

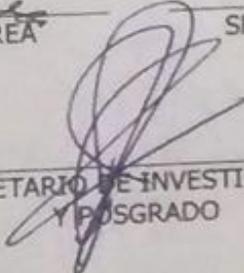
DATOS DEL ESTUDIANTE	
NOMBRE: ALDO AXEL MUÑOZ HUERTA	ID (No. de Registro): 107713
PROGRAMA: MAESTRÍA EN CIENCIAS	ÁREA: TOXICOLOGÍA
TUTORA: ILIANA ERNESTINA MEDINA RAMÍREZ COMITÉ TUTORAL: M en C IRMA ADRIANA CASTRO GALLO Dr. ALEJANDRO ALATORRE ORDAZ	
TESIS (<input checked="" type="checkbox"/>)	TRABAJO PRÁCTICO (<input type="checkbox"/>)
OBJETIVO:	
DICTAMEN	
CUMPLE CON CRÉDITOS ACADÉMICOS:	(<input checked="" type="checkbox"/>)
CONGRUENCIAS CON LAS LGAC DEL PROGRAMA:	(<input checked="" type="checkbox"/>)
CONGRUENCIA CON LOS CUERPOS ACADÉMICOS:	(<input checked="" type="checkbox"/>)
CUMPLE CON LAS NORMAS OPERATIVAS:	(<input checked="" type="checkbox"/>)
CONINCIDENCIA DEL OBJETIVO CON EL REGISTRO:	(<input checked="" type="checkbox"/>)

Aguascalientes, Ags. a 27 de NOVIEMBRE de 2014

FIRMAS


CONSEJERO ACADÉMICO DEL ÁREA


SECRETARIO TÉCNICO DEL POSGRADO


SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN
Y POSGRADO

AGRADECIMIENTOS

De ante mano le agradezco a Conacyt por el apoyo económico brindado tanto para cursar el posgrado como para la elaboración del presente proyecto.

A mis asesores, la M en C Irma Adriana Castro Gallo y el Dr. Alejandro Alatorre Ordaz, les agradezco el apoyo brindado para la realización de este trabajo, desde sus observaciones, sus motivaciones para seguir adelante, el lugar de trabajo y el material necesario para desarrollarlo. A la Dra. Iliana E. Medina Ramírez, de una forma especial, le agradezco que más que mi tutora o maestra, se convirtió en una amiga y una luz en mi camino, me abrió los ojos a una realidad que nunca me hubiese imaginado que existía y mucho menos poder vivir, gracias por su confianza para desarrollar un trabajo de relevancia en materia de salud, social y científica, gracias por instruirme, por hacerme aspirar a cosas más altas en la vida y por ayudarme a creer en mí, en pocas palabras por formarme no solo de forma científica, sino humana también, gracias por tener esa gran calidad humana y transmitirla a los demás, gracias de verdad doctora.

Les agradezco a las personas que me apoyaron técnicamente en la elaboración y desarrollo de los experimentos, sobre todo en la parte microbiológica al Dr. Francisco Morales y a la M en C Cristina Garcidueñas.

Quiero agradecerle a Dios el permitirme vivir esta etapa de mi vida, donde conocí gente extraordinaria, por acompañarme en todo momento, aun cuando sentía que no podía más, Él estaba conmigo, me dio compañeros de maestría que se convirtieron en amigos que no solo me apoyaron en el estudio de las materias, sino en cuestiones personales también.

Gracias a mi familia por su apoyo moral, económico, emocional y espiritual en todo momento. A mi mamá le agradezco su confianza en mí, su apoyo incondicional, y si bien dicen que los hijos son un reflejo de los padres, en lo personal considero que mi madre es mucho más de lo que yo puedo o pudiese llegar a reflejar algún día. A mi hermano Alan le agradezco que estuviera conmigo escuchándome y alentándome con su sabiduría "oriental". A Gladys mi hermana, le agradezco su apoyo, su palabra de aliento, su ayuda

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

económica en algunos casos, su sonrisa, el hacerme sentir como “José el soñador”, su cariño y afecto en este caminar, creo que la vida no sería la misma sin ella, por eso y todo lo que me falta por decirle y agradecerle, gracias hermanita.

A mis amigos de maestría, Ana Rosa, Juan Pablo, Jamón, Ileri, Moni, Chai, Carlitos y Yessi, todos ellos grandes personas que me enseñaron muchísimas cosas como ver la vida de diferentes formas, la importancia del deporte (aunque no hice mucho caso), el equilibrio en la vida, el que se puede hacer todo siempre y cuando te organices bien, el no estresarte más de lo que es, el que es necesaria la recreación, el creer en las personas, el que no importa cuántos compromisos tengas, si tu meta es clara y cumples los pasos para llevarla a cabo, lo lograras. De una forma muy especial le agradezco a Crixs, por enseñarme a luchar por lo que se quiere, el buscar los medios necesarios para conseguir lo que te propones, el no desalentarse y motivarme con su ejemplo, el escucharme siempre que lo necesité, por aguantarme cuando ni yo mismo me aguantaba, Crixs, de verdad que eres una persona única, especial e importante en mi vida, gracias por tu amistad y apoyo incondicional.

A mi amiga Gladis le agradezco su apoyo técnico, personal y emocional, creo que sin ella, el trabajo en el laboratorio no sería el mismo, no simplemente porque siempre estaba al pendiente de que no hiciera falta algo en el laboratorio, sino porque además es una persona que está comprometida con la excelencia. Gladis gracias por tu amistad, escucharme y por todo tu apoyo en estos más de 5 años de amistad, quien diría que todo empezó en el laboratorio de Química Organometálica y Materiales.

A Víctor Hugo, que recientemente se ha convertido en un gran amigo, y excelente compañero de trabajo. A Marce que de alguna forma u otra hemos compartido grandes cosas, y de forma general, pero no por eso menos especial, a los alumnos de 9° y 7° semestre de AQB, que han hecho más divertido este último semestre de la maestría.

En resumen le doy gracias a la vida por permitirme vivir esta etapa de dos años, que en el corazón pareció más tiempo, por la madurez adquirida, por brindarme la oportunidad de conocer magnificas personas, por los accidentes que me pasaron y por las fuerzas para enfrentarlos, por todo lo vivido en el transcurso de preparación para ser lo que muy pronto seré, un maestro en ciencias, área toxicología.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

DEDICATORIAS

Este trabajo está dedicado a mi familia, a mis amigos, a mis tutores y a todas esas personas que me acompañaron en su momento en este proceso de formación y que dejaron una huella en mi vida.



ÍNDICE GENERAL

Índice general.....1

Índice de tablas.....3

Índice de figuras.....5

Acrónimos.....8

Resumen.....9

Abstract.....10

Introducción.....11

1. Marco teórico.....12

1.1. Nanociencia, Nanotecnología y Nanomateriales.....12

1.2. Síntesis y caracterización de nanopartículas.....16

1.2.1. La nanotecnología verde y la química verde en la síntesis de nanopartículas.....16

1.2.2. Caracterización de nanomateriales.....18

1.2.2.1. Espectrofotometría UV-Vis.....19

1.2.2.2. Microscopía electrónica de Barrido (SEM).....19

1.2.2.3. Potencial zeta y radio hidrodinámico20

1.3. La familia del cobre y sus aplicaciones.....22

1.3.1. Oro.....22

1.3.2. Plata.....23

1.3.3. Cobre.....23

1.4. Problemática ambiental que se sufre actualmente.....24

1.4.1. Contaminación.....24

1.4.2. Consecuencias de la contaminación por fármacos.....26

1.4.3. Resistencia bacteriana.....26

1.5. Análisis microbiológico del agua.....28

1.5.1. *Escherichia coli*.....28

1.5.2. *Staphylococcus aureus*.....29

1.6. Acción bactericida de nanopartículas.....30

1.6.1. Nanopartículas de plata.....30

1.6.2. Nanopartículas de cobre.....	31
1.7. Nanotoxicología.....	32
2. Antecedentes.....	34
3. Justificación.....	39
4. Objetivos.....	40
5. Hipótesis.....	40
6. Metodología.....	41
7. Resultados.....	46
8. Discusiones.....	74
Conclusiones.....	82
Glosario.....	84
Bibliografía.....	86



INDICE DE TABLAS

1. Tabla 1.1.1 Propiedades y usos comunes de los nanomateriales14

2. Tabla 1.2.1.1 Traslape de los doce principios de la química verde a la práctica de la nanociencia verde17

3. Tabla 1.4.3.1 Mecanismo de acción y de resistencia de los principales antibacterianos27

4. Tabla 7.6.1 Resultados del análisis del radio hidrodinámico de las nanopartículas de cobre y cobre-quitosano suspendidas en PBS 0.05M a un pH de 755

5. Tabla 7.8.1 Prueba de resistencia antimicrobiana para Gram-negativos59

6. Tabla 7.8.2 Prueba de resistencia antimicrobiana para *Staphylococcus aureus* ...60

7. Tabla 7.8.3 Prueba de resistencia antimicrobiana para *Enterococcus faecalis* ...61

8. Tabla 7.9.1 Comparación del tiempo de exposición (8 y 24 horas) en la evaluación de la actividad bactericida de las nanopartículas de cobre para la *E. coli* aislada de la planta de tratamiento62

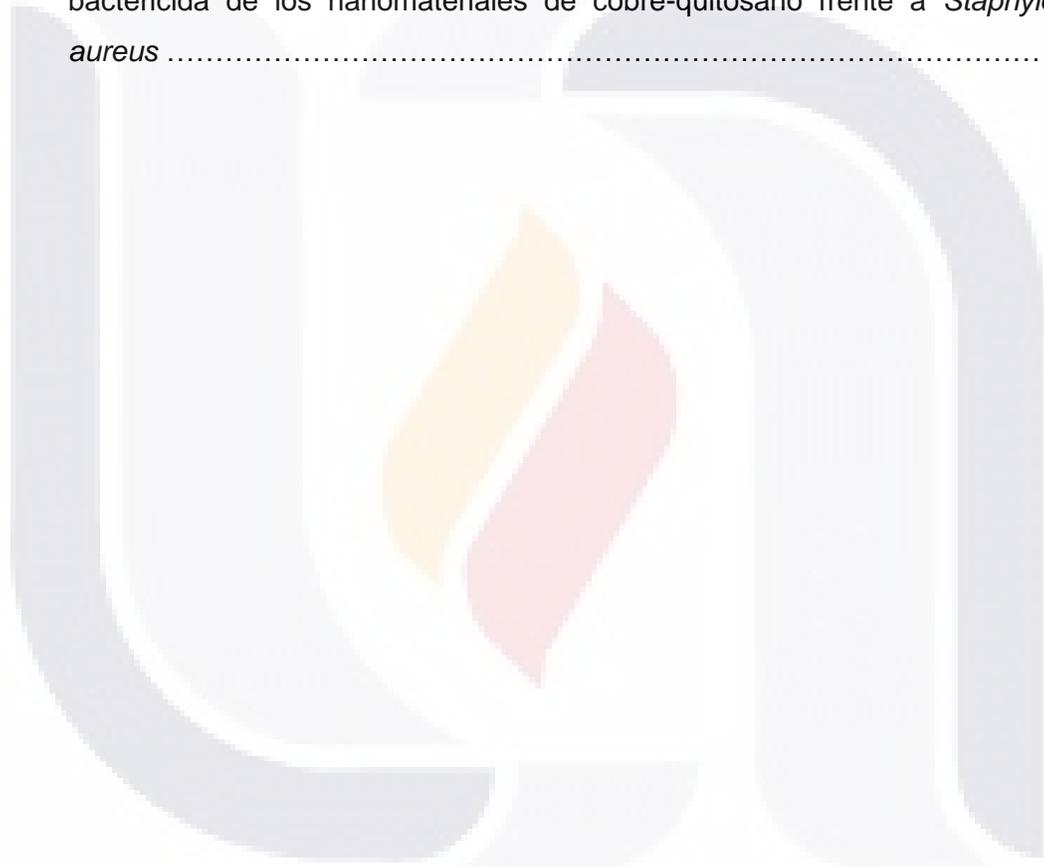
9. Tabla 7.9.2 Comparación del tiempo de exposición (8 y 24 horas) en la evaluación de la actividad bactericida de nanopartículas de cobre-quitosano para la *E. coli* aislada de la planta de tratamiento64

10. Tabla 7.9.3 Comparación del tiempo de exposición (8 y 24 horas) en la evaluación de las nanopartículas de cobre frente la cepa de *E. coli* multirresistente66

11. Tabla 7.9.4 Comparación del tiempo de exposición (8 y 24 horas) en la evaluación de las nanopartículas de cobre-quitosano para la *E. coli* multirresistente68

12. Tabla 7.9.5 Comparación del tiempo de exposición (8 y 24 horas) en la evaluación de la actividad bactericida de nanopartículas de cobre frente a *Staphylococcus aureus* 70

13. Tabla 7.9.6 Comparación del tiempo de exposición en la evaluación de la actividad bactericida de los nanomateriales de cobre-quitosano frente a *Staphylococcus aureus*72



ÍNDICE DE FIGURAS

1. Figura 1.1.1 Imagen de la copa de Lycurgus.....13

2. Figura 1.2.2.2.1 Esquema de señales y funciones de un microscopio electrónico de barrido de superficies.....20

3. Figura 1.2.2.3.1 Dos maneras de visualizar la doble capa.....22

4. Figura 1.7.1 Complejo conjunto de temas relacionados con la toxicidad de nanopartículas.....33

5. Figura 7.1.1 Soluciones coloidales de nanopartículas de cobre usando síntesis convencional y goma arábica partiendo de diferentes precursores.....47

6. Figura 7.1.2. Soluciones coloidales de nanopartículas de cobre-quitosano empleando una síntesis convencional y partiendo de diferentes precursores.....47

7. Figura 7.2.1 Soluciones coloidales de nanopartículas de cobre usando microondas y partiendo de diferentes precursores.....49

8. Figura 7.2.2 Soluciones coloidales de nanopartículas de cobre-quitosano empleando microondas y partiendo de diferentes precursores.....49

9. Figura 7.3.1 Espectro UV-Vis de las soluciones coloidales de cobre sintetizadas a partir de diferentes precursores de cobre por una ruta convencional.....50

10. Figura 7.3.2 Espectro UV-Vis de las soluciones coloidales de cobre sintetizadas a partir de diferentes precursores empleando microondas.....51

11. Figura 7.4.1	Nanopolvos de cobre y cobre-quitosano a partir de dos rutas diferentes.....	52
12. Figura 7.5.1	Caracterización por SEM de nanopartículas de cobre empleando sulfato cúprico como precursor de cobre.....	53
13. Figura 7.5.2	Caracterización por SEM de nanopartículas de cobre-quitosano empleando sulfato cúprico como precursor de cobre.....	53
14. Figura 7.6.1	Curva de distribución de tamaño de nanopartículas de cobre y cobre-quitosano en medio PBS 0.05M a pH de 7.....	56
15. Figura 7.7.1	Toma de muestra y tipificación bacteriana.....	57
16. Figura 7.7.2	Cultivos bacterianos aislados del efluente de la planta de tratamiento del hospital de la mujer.....	58
17. Figura 7.7.3	Prueba de la catalasa para <i>Staphylococcus aureus</i>	58
18. Figura 7.8.1	Antibiograma de cepas Gram-negativas.....	59
19. Figura 7.8.2	Antibiograma de <i>Staphylococcus aureus</i>	60
20. Figura 7.9.1	Comparación del tiempo de exposición en la actividad bactericida de nanopolvos de cobre frente a <i>E. coli</i> de la planta de tratamiento.....	62
21. Figura 7.9.2	Gráfica de comparación de los tiempos de exposición (8 y 24 horas) en la evaluación de la actividad bactericida de nanopartículas de cobre frente a la cepa de <i>E coli</i> aislada de la planta de tratamiento.....	63
22. Figura 7.9.3	Comparación del tiempo de exposición en la actividad bactericida de los nanopolvos de cobre-quitosano frente a <i>E. coli</i> aislada de la planta de tratamiento.....	64

23. Figura 7.9.4 Gráfica que muestra la influencia del tiempo de exposición (8 y 24 horas) en la evaluación de la actividad bactericida de nanopartículas de cobre-quitosano frente a la *E coli* de la planta de tratamiento65

24. Figura 7.9.5 Comparación del tiempo de exposición en la actividad bactericida de nanopulvos de cobre frente a *E. coli* multirresistente.....66

25. Figura 7.9.6 Gráfica que muestra la influencia del tiempo de exposición (8 y 24 horas) en la evaluación de la actividad bactericida de nanopartículas de cobre-quitosano frente a la cepa de *E coli* multirresistente.....67

26. Figura 7.9.7 Comparación del tiempo de exposición en la actividad de nanopartículas de cobre-quitosano frente a *E. coli* multirresistente68

27. Figura 7.9.8 Gráfica que muestra la influencia del tiempo de exposición (8 y 24 horas) en la evaluación de la actividad bactericida de nanopartículas de cobre-quitosano frente a cepa de *E. coli* multirresistente.....69

28. Figura 7.9.9 Comparación del tiempo de exposición de nanopartículas de cobre frente a *Staphylococcus aureus*.....70

29. Figura 7.9.10 Gráfica que muestra la comparación en el tiempo de exposición en la evaluación de la actividad bactericida de las nanopartículas de cobre frente a *S. aureus*71

30. Figura 7.9.11 Comparación del tiempo de exposición en la evaluación de la actividad bactericida de nanopartículas de cobre-quitosano frente a *S. aureus*.....71

31. Figura 7.9.12 Gráfica que muestra la comparación del tiempo de exposición (8 y 24 horas) en la evaluación de la actividad bactericida de nanopartículas de cobre-quitosano frente a *S. aureus*.....73

ACRONIMOS

ACS	American Chemistry Society
CAT	Cloranfenicol acetil-transferasa
CMB	Concentración mínima bactericida
CMI	Concentración mínima inhibitoria
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroadhesiva
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EPA	Agencia de protección ambiental (USA)
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotóxica
HAAs	Ácidos haloacéticos
LIA	Agar de hierro y lisina
MIO	Movilidad Indol Ornitina
NMP	Número más probable
NM(s)	Nanomaterial(es)
NP(s)	Nanopartícula(s)
PBS	Phosphate buffered saline
PPCP(s)	Fármacos y productos de cuidado personal
SEM	Microscopio Electrónico de Barrido
TEM	Microscopio de transmisión electrónica
THMs	Trihalometanos
TSI	Agar hierro-triple azúcar
UFC	Unidades formadoras de colonias

RESUMEN

Actualmente existe gran preocupación por la presencia de fármacos en el medio ambiente debido a que ésta puede ser una de las causas de que el número de microorganismos resistentes a múltiples agentes antimicrobianos se incrementara considerablemente. Actualmente se enfrenta este problema de diversas formas, una de ellas empleando nanomateriales que por su pequeño tamaño y alta superficie de contacto pueden interactuar con la membrana bacteriana de microorganismos patógenos. El objetivo central de este trabajo fue el sintetizar, caracterizar y evaluar la actividad microbici da de materiales nanoestructurados de cobre. Se sintetizaron soluciones coloidales de nanopartículas de cobre por dos rutas (convencional y microondas); además de emplear diferentes agentes precursores de cobre (CuSO_4 y $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$) y agentes estabilizantes (goma arábica y quitosano). Se caracterizaron las soluciones por espectrofotometría UV-Vis y las partículas precipitadas (nanopolvos) por microscopia electrónica de barrido (SEM). Se evaluó su eficiencia microbici da frente a bacterias aisladas del efluente de la planta de tratamiento del hospital general Tercer Milenio. Los resultados demuestran que se optimizaron las variables de reacción (temperatura, ruta sintética, precursor de cobre y agente estabilizante), se encontró que las soluciones coloidales presentan un máximo de absorción a $570\pm 10\text{nm}$ y que las nanopartículas de cobre tienen un tamaño de $10\pm 2\text{nm}$. Las bacterias aisladas presentan resistencia hacia algunos agentes antimicrobianos por lo cual se sometieron al material sintetizado (Nano-Cu), encontrándose que éste es capaz de inhibir el crecimiento de éstos microorganismos. Se concluye que se logró sintetizar nanopartículas de cobre, que el material sintetizado presenta el tamaño deseado y que es posible emplearlo como un agente bacterici da en la desinfección de superficies o aguas contaminadas.

ABSTRACT

Nowadays, there is a great concern about the presence of drugs in the environment due to the fact that it can be a cause for the considerable increment in the number of microorganisms resistant to multiple antimicrobial agents. This problem is currently dealt with in diverse ways; one of them is by the use of nanomaterials, which due to their small size and high contact surface can interact with the bacterial membrane of pathogenic microorganisms. The central objective of this work was to synthesize, characterize and evaluate the microbicidal activity of nano-structured copper materials. Colloidal solutions of copper nano-particles were synthesized by using two different routes (conventional and microwaves); added to the use of different copper precursor's agents (CuSO_4 and $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$) and stabilizing agents (arabic gum and chitosan). The solutions were characterized by means of spectrophotometry UV-Vis, and the precipitated particles (nanopowder) through Scanning Electron Microscopy (SEM). Its microbicidal efficiency was evaluated with isolated bacteria from the effluent of the Hospital Tercer Milenio's treatment plant. The results demonstrate that the reaction variables (temperature, synthetic route, copper precursor and stabilizing agent) were optimized. It was also found that that the colloidal solutions present an absorption maximum of $570 \pm 10 \text{ nm}$ and that copper nanoparticles have a size of $10 \pm 2 \text{ nm}$. The isolated bacteria show resistance to multiple antimicrobial agents, reason why they were tested with the synthesized material (Nano-Cu). Our results indicate that Nano-Cu was able to inhibit the growth of these microorganisms. It can be concluded that the copper nano-particles synthesis was successful, that the synthesized material presents the size desired and that it is possible to use it as a bactericidal agent in the disinfection of surfaces or contaminated waters.

INTRODUCCIÓN

Debido a la problemática ambiental que se sufre actualmente con el incremento en el número de microorganismos que presentan multirresistencia a antibióticos surge la necesidad de producir nuevos y mejores agentes desinfectantes. Hoy por hoy los nanomateriales han adquirido una gran importancia en la industria y no es de sorprender que los materiales con base metálica (que han sido usados como agentes químicos de desinfección), estén siendo explotados para eliminar dichos microorganismos.

Gracias a su eficiencia como agentes bactericidas, los nanomateriales basados en plata se encuentran actualmente en el mercado formando parte de diferentes y muy variados productos, sin embargo, estudios recientes han reportado que el material nanoestructurado de plata es capaz de ocasionar daños a la salud humana, es por esto, que en este manuscrito se propone sustituir a los nanomateriales de la plata por nanomateriales de cobre.

El objetivo del proyecto se centró en la síntesis y caracterización de materiales nanoestructurados de cobre, así como su posible aplicación como agente microbicida. Los resultados que se obtuvieron son muy alentadores y se observó que a dosis relativamente pequeñas los efectos en las bacterias son lo bastante eficientes para considerar al material como un agente bactericida y no como bacteriostático.

Antes de que el material pueda tomar parte en el mercado de productos desinfectantes es importante realizarle pruebas de toxicidad para evaluar si su efecto es exclusivo para las células patógenas o si es generalizado.

1. MARCO TEÓRICO

El presente trabajo aborda el desarrollo de nanomateriales de cobre que pretenden dar una posible solución a problemas que se sufren actualmente como lo es el del incremento en el número de microorganismos que son resistentes a múltiples agentes antimicrobianos; debido a que éstos ya no pueden ser tratados con la misma eficiencia por los antibióticos que actualmente son usados, la necesidad de nuevos agentes antimicrobianos se hace más urgente. Por esto el presente trabajo intenta explotar la actividad bactericida del cobre frente a dichas bacterias.

1.1. NANOCIENCIA, NANOTECNOLOGÍA Y NANOMATERIALES

La nanociencia es el estudio de los procesos fundamentales que ocurren en las estructuras de un tamaño entre 1 y 100 nanómetros, las cuales se conocen como nanoestructuras. La nanotecnología es el área de investigación que estudia, diseña y fabrica materiales o sistemas a escalas nanoscópicas y les da una aplicación práctica. Sin embargo, en muchas ocasiones se denomina nanotecnología a la habilidad de controlar la materia átomo por átomo (Takeuchi, 2009). El rango de tamaño para la nanociencia y nanotecnología es de menos de 100nm (aunque no es una división estricta), debido a que a estas dimensiones, los materiales pueden realzar sus propiedades o adquirir otras completamente diferentes (Guadalupe Mendoza Uribe, 2007).

Las referencias iniciales a la nanotecnología fueron presentadas en 1959 por el físico norteamericano Richard Feynman en una conferencia titulada: "There's Plenty of Room at the Bottom", en la cual vislumbró la posibilidad de manipular los materiales a escala atómica y molecular.

El término "nanotecnología" fue empleado por primera vez en 1974 por Norio Tanguchi, un investigador de la universidad de Tokio, quien señalaba así la

capacidad de manejar materiales a nivel nanométrico. El ser humano ha utilizado en algunos casos, las “nanotecnologías” durante siglos, por ejemplo, las nanopartículas de oro y plata se han utilizado como pigmentos colorantes para cristales desde el siglo X d.C., según el tamaño de las nanopartículas, éstas pueden parecer azules, rojas o doradas. Un ejemplo muy conocido es el de la copa de Lycurgus que se muestra a continuación en la siguiente figura:



Figura 1. 1.1 La copa de Lycurgus (siglo IV d.C.): parece verde cuando se ilumina desde el exterior, pero se ve roja si se ilumina desde el interior. El vidrio contiene nanopartículas que le confieren estas propiedades singulares. Imagen tomada de <http://someinterestingfacts.net/wp-content/uploads/2013/01/Lycurgus-Cup.gif>

La Agencia del Medio Ambiente (EPA) de Estados Unidos, ha clasificado a los nanomateriales (NMs) dentro de tres grupos de acuerdo con su fuente, las cuales pueden ser natural, accidental o fabricadas (intencional). Los cuales pueden ser liberados al ambiente por sus aplicaciones industriales y ambientales. Las propiedades únicas de los NMs les permiten ser usados en varias aplicaciones, tal como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 1.1.1. Propiedades y usos comunes de los nanomateriales. Tomada de la clasificación de la EPA (Environmental Protection Agency)

Tipos de NM (origen)	Ejemplo	Propiedades físicas	Propiedades químicas	Usos
A base de carbón (natural o sintetizados)	Fullerenos/ buckyesferas (carbono 60, carbono 20, carbono 70), nanotubos de carbono, nanodiamantes y nanocables	Existen como esferas huecas (buckyesferas), elipsoides, tubos, nanoalambres, o estructuras hexagonales (nanodiamantes). Excelente conductividad térmica y eléctrica.	Estables, reactividad limitada, están compuestos enteramente de carbono y son antioxidantes fuertes.	Aplicaciones biomédicas, supercondensadores, sensores y en energía fotovoltaica.
Óxidos metálicos (natural o sintetizados)	Dióxido de titanio, óxido de zinc, óxido de cerio	Algunos tienen propiedades fotocatalíticas y otros tienen la capacidad de bloquear la luz ultravioleta. Cuando son usados en bloqueadores solares, Nano TiO ₂ y Nano ZnO parecen transparentes al ser aplicados en la piel.	Alta reactividad, propiedades fotolíticas.	Fotocatalizadores, pigmentos, liberación de fármacos, diagnósticos médicos, cosméticos, bloqueadores solares, diesel y remediación.
Metales de valencia cero (sintetizados)	Nano Fe con valencia cero, emulsiones de hierro y partículas bimetálicas. Partículas bimetálicas nanométricas incluyendo hierro elemental y catalizadores metálicos (como oro, níquel, paladio o platino)	Las propiedades pueden ser controladas variando el agente reductor y las condiciones de reducción.	Alta superficie de reacción. Los materiales de partida para sales férricas o ferrosas con borohidruro son comunes	Remediación de agua, suelo y sedimentos en los que se reducen contaminantes como nitratos, tricloroetileno y tetracloroetileno
Puntos cuánticos (sintetizados)	Los puntos cuánticos están hechos de seleniuro de cadmio, telururo de cadmio y	Para el tamaño de 10-50nm, el núcleo reactivo controla las propiedades ópticas del material.	Los extintores del semiconductor están estrechamente empaquetados (pares	Imágenes medicas, terapias dirigidas, en fotovoltaica, sensores y telecomunicaciones.

	seleniuro de zinc	Cuanto mayor sea el punto (la energía más baja), mas roja será su espectro de fluorescencia	hueco-electrón) que están confinados en las tres dimensiones espaciales. Las posibles estructuras metálicas para el núcleo incluyen seleniuro de cadmio, telururo de cadmio, seleniuro de zinc, fosforo de indio o seleniuro de plomo, y para el exterior sulfuro de cadmio o sulfuro de zinc.	
Dendrímeros (sintetizados)	Polímeros hiperramificados, polímeros en forma de dendritas y dendrones	Los de tamaño de 2-20nm son polímeros altamente ramificados. Tienen formas comunes como conos, esperas y estructuras parecidas a discos.	Altamente ramificados; polímeros multifuncionales	Drogas dirigidas, sensores químicos, electrodos modificados y agentes de transferencia en el DNA.
Compósitos de NMs (sintetizados)	Producidos usando dos NMs diferentes o NMs combinados con otros más grandes. Estos pueden ser hechos combinando NMs o con polímeros sintéticos o resinas.	Los compósitos de NMs tienen características eléctricas, magnéticas, mecánicas y térmicas novedosas	Componentes multifuncionales, características catalíticas	Aplicaciones potenciales en drogas dirigidas y detección de cáncer. También son usadas en autopartes y materiales de embalaje para mejorar las propiedades mecánicas y retardantes inflamables.
Nano-plata (sintetizada)	Las formas incluyen, plata coloidal, hilos de plata, nano-polvos de plata y compósitos de plata.	El tamaño va desde los 10-200nm. Compuestas de muchos átomos de plata en la forma de iones plata.	Alta reactividad superficial, fuertes propiedades antimicrobianas	Aplicaciones en medicina, purificación de agua y usos microbicidas. Ellas pueden ser usadas para una amplia variedad de productos comerciales.

1.2 SÍNTESIS Y CARACTERIZACION DE NANOPARTICULAS

La síntesis de nanopartículas se puede realizar por métodos tanto físicos como químicos. A los métodos físicos se les conoce comúnmente como “top-down” o de “arriba-abajo”, dentro de estos métodos se encuentra la radiólisis gama, la microemulsión y la alta energía de molienda por bolas. A los métodos químicos se les conoce como “bottom-up” o de “abajo a arriba”, y dentro de este conjunto se encuentra la reducción en líquido y los procesos sol-gel. La reducción en líquido es la más usada por su simplicidad y por la habilidad del agua para solubilizar una gran variedad de iones y estabilizar moléculas (Wen J., 2011).

En general, la reducción en líquido consta de tres elementos; la sal precursora, el agente reductor y el surfactante (Tolaymat T. M., et al 2010). Se lleva a cabo en dos etapas, la nucleación y el crecimiento sucesivo. Durante la nucleación, los cationes de la sal metálica contenidos dentro de la solución son reducidos a átomos metálicos. Éstos se mueven aleatoriamente en la solución y la colisión entre cationes y átomos da como resultado la formación de grupos. El núcleo se sigue formando a través de una colisión continua de cationes, átomos y grupos. El núcleo sigue creciendo hasta alcanzar un tamaño crítico, dando lugar a NPs. Es decir, se construye el nanomaterial átomo por átomo (Zhang R, 2011).

1.2.1 LA NANOTECNOLOGÍA VERDE Y LA QUIMICA VERDE EN LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS

La nanotecnología verde tiene dos objetivos: la producción de NMs y productos sin dañar el medio ambiente o la salud humana, y la producción de nano-productos que ofrecen soluciones a los problemas ambientales. Utiliza los principios de la química verde y la ingeniería verde para hacer nanomateriales y nano-productos sin ingredientes tóxicos, a bajas temperaturas usando menos energía e insumos renovables siempre que sea posible (Marcilla R., 2005)

La química verde consiste en el esfuerzo colectivo para reducir al máximo, o de ser posible eliminar por completo la contaminación producida en procesos químicos evitando al máximo el desperdicio o uso indiscriminado de materias primas no renovables, así como el empleo de materiales peligrosos o contaminantes en la elaboración de productos químicos "limpios", que no atenten contra la salud o el ambiente sin sacrificar el avance científico y tecnológico (Salinas E. P., 2012). Nuestro laboratorio no solo se especializa en la síntesis de nanomateriales y sus aplicaciones, sino que además intenta cumplir con los principios de la química verde en todos sus procesos. Particularmente, en la síntesis desarrollada en el presente trabajo, el solvente usado es agua, se minimizan los residuos y la mayoría de los elementos involucrados forman parte del producto final.

La interacción entre la química verde y la nanociencia verde se puede observar en la siguiente tabla, donde se enlistan los principios de la química verde, se muestra un enfoque general para el diseño y producción de NM, así como ejemplos específicos de los enfoques que han sido implementados en la nanociencia verde. La tabla fue tomada con permiso de la ACS (American Chemical Society, 2007) de (Hutchison, 2008).

Tabla 1.2.1.1. Traslape de los 12 principios de la química verde a la práctica de la nanociencia verde.

Principios de la Química Verde	Diseño de nanomateriales verdes y sus métodos de producción	Practica de la nanociencia verde
<p>P1. Prevenir residuos</p> <p>P2. Incorporación completa</p> <p>P3. Síntesis química menos peligrosa</p>	<p>Diseño de nanomateriales seguros (P1 y P2)</p>	<p>Determinación del impacto biológico de la nanopartícula, tamaño, área superficial, funcionalidad de la superficie; utiliza este conocimiento para diseñar materiales seguros y efectivos que posean las propiedades deseadas; impidiendo la incorporación de elementos tóxicos en la composición de la nanopartícula</p>
<p>P4. Diseño de productos químicos más seguros</p>	<p>Diseños para la reducción del impacto ambiental (P7 y P10)</p>	<p>Estudio de la degradación del material y destino en el ambiente; diseño de materiales degradables y subproductos inofensivos. Un enfoque importante involucra la eliminación del uso de elementos peligrosos en la elaboración de la nanopartícula; el uso de materia prima a base biológica puede ser la clave.</p>

P5. Medios de reacción y solventes más seguros	Diseño para la reducción de residuos (P1, P5 y P8)	Eliminación de la purificación intensiva de solventes mediante el uso de síntesis selectivas, resultando en mayor pureza y monodispersidad; desarrollo de nuevos métodos de purificación, por ejemplo la nano filtración, que minimiza el uso de solventes; el uso de la síntesis de “abajo-arriba” se enfoca en mejorar la eficiencia del material y eliminar pasos.
P6. Diseñar rutas para tener eficiencia energética	Diseño de procesos seguros (P3, P5, P7 Y P12)	Diseño y desarrollo de síntesis avanzadas que utilizan más reactivos y solventes benignos; utilizan mas materias primas benignas, que se obtienen de fuentes renovables, si es posible; identificar el reemplazo de reactivos altamente tóxicos y pirofóricos.
P7. Uso de recursos renovables	Diseño de materiales eficientes (P2, P5, P9 y P11)	Desarrollo de nuevas, y compactas estrategias sintéticas; incorporación óptima de materias primas en productos a través del enfoque de “abajo-arriba”, uso alternativo de medios de reacción y catalizadores para mejorar la selectividad de la reacción; desarrollo de monitoreo en tiempo real para guiar el control del proceso en síntesis de nanopartículas complejas.
P8. Reducción de derivados	Diseños para la eficiencia energética (P6, P9 y P11)	Perseguir rutas sintéticas eficientes que se puedan llevar a cabo a temperatura ambiente en lugar de a elevadas temperaturas; utiliza métodos de ensamblaje no covalentes y de “abajo-arriba” a temperaturas cercanas a las del ambiente, utiliza el monitoreo en tiempo real para optimizar la reacción química y minimizar los costos energéticos.
P9. Uso de catalizadores		
P10. Diseño de productos biodegradables		
P11. Control del proceso y monitoreo en tiempo real		
P12. Químicos inocuos más seguros		

1.2.2 CARACTERIZACION DE NANOMATERIALES

La caracterización de materiales demanda obtener información detallada acerca del arreglo espacial de los átomos e identificar de manera precisa que tipo de átomos ocupan los lugares específicos de la red. Esto implica poder identificar imperfecciones, impurezas, inhomogeneidades, defectos, etc. Actualmente existe una gran variedad de técnicas de caracterización que permiten obtener información detallada del material analizado, dentro de los métodos utilizados para la caracterización de NPs se encuentran la espectrofotometría UV-Visible, el microscopio electrónico de barrido (SEM, por sus siglas en inglés), la

determinación del radio hidrodinámico y el potencial zeta, de los cuales se habla a continuación.

1.2.2.1 ESPECTROFOTOMETRIA UV-Vis

La espectrofotometría UV-Vis se aplica principalmente a la espectroscopia de absorción electromagnética de la región de longitudes de onda comprendidas entre los 160 y 780 nanómetros. Las medidas de absorción de la radiación ultravioleta y visible encuentran una enorme aplicación en la determinación cuantitativa de una gran variedad de especies tanto orgánicas como inorgánicas. Se basa en la medida de la transmitancia T o de la absorbancia A de disoluciones que se encuentran en cubetas transparentes que tienen un camino óptico de b cm. Normalmente, la concentración c de un analito absorbente está relacionada linealmente con la absorbancia como representa la ecuación de la ley de Beer.

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P} = \epsilon bc$$

La ley de Beer describe el comportamiento de absorción de un medio que contiene concentraciones de analito relativamente bajas, en este sentido, es una ley límite. A concentraciones altas ($>0.01M$), la distancia media entre las moléculas responsables de la absorción disminuye hasta el punto en que cada molécula altera la distribución de carga de las moléculas vecinas. Como la magnitud de la interacción depende de la concentración, la aparición de este fenómeno da lugar a desviaciones de la linealidad de la absorbancia y la concentración (Douglas A. Skoog, 1992).

1.2.2.2 MICROSCOPIA DE BARRIDO ELECTRÓNICO (SEM)

El microscopio electrónico de barrido fue desarrollado principalmente para vencer las limitaciones que presenta el microscopio óptico (baja resolución y limitada profundidad de campo). Con esta técnica se colectan los electrones secundarios y de retroceso que son emitidos de la superficie del material bajo

observación. De forma típica se enfoca un haz de electrones de 5nm de diámetro con una corriente de 10-11A hacia una superficie. Inicialmente, cuando el electrón aun tiene suficiente energía, se producen excitaciones tipo Auger. En esta etapa se produce la emisión de los llamados electrones secundarios y la dispersión de retroceso es poco probable debido a las pequeñas secciones de dispersión de Rutherford. La energía del haz comienza a disiparse en el material en torno a $\approx 1\mu\text{m}$ dentro de la superficie. Los electrones emitidos más fáciles de detectar son los secundarios porque salen en un gran número y a bajas energías. Los electrones de retroceso (*backscattering electrons*) son particularmente útiles, ya que, de acuerdo con la teoría de dispersión de Rutherford, la sección de dispersión elástica depende del número atómico del sistema. Por lo tanto, materiales que contengan diferentes átomos (diferente número atómico) producirán distintos espectros de electrones de retroceso. Aquí podemos darnos cuenta de la utilidad de la técnica, pues es un medio para contrastar o diferenciar un tipo de átomo de otro dentro del material (López, 2012). La siguiente figura explica de forma gráfica las señales, funciones y resolución de un microscopio de barrido electrónico.

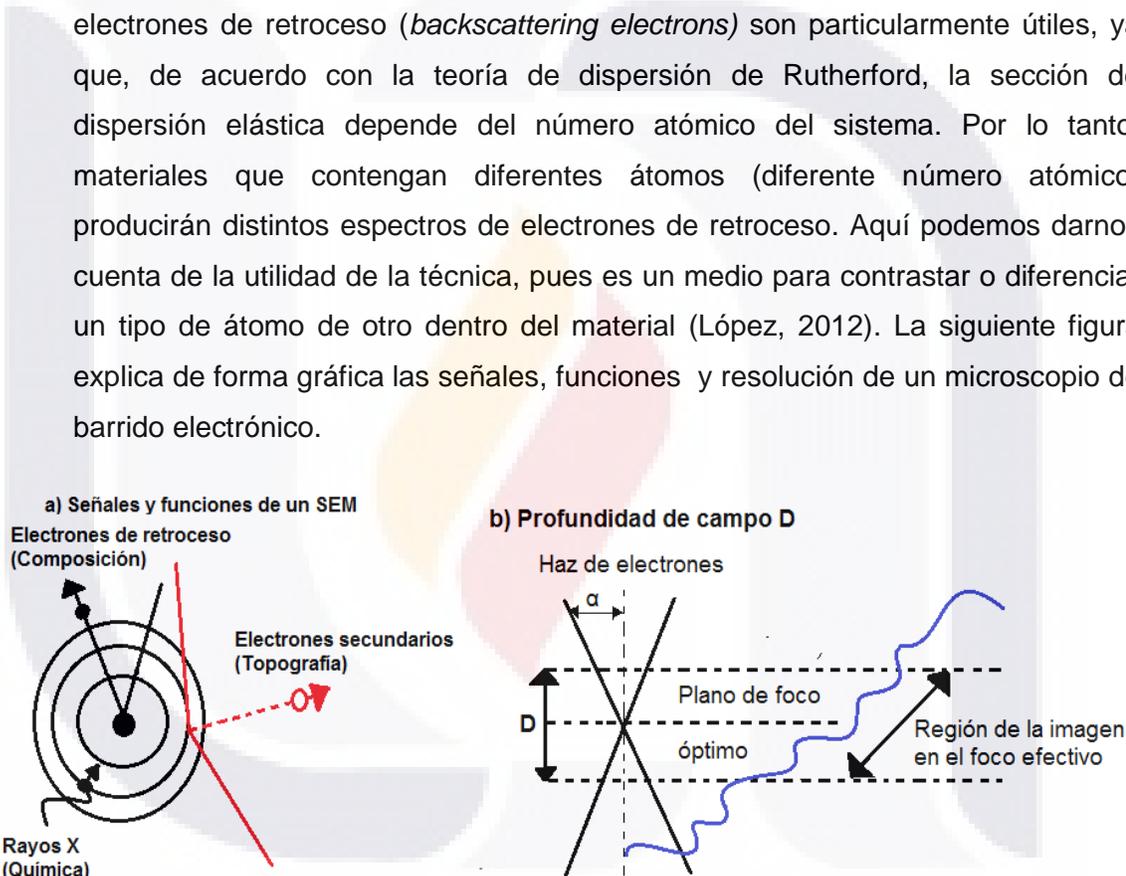


Figura 1.2.2.2.1 a) esquema de las señales y funciones de un microscopio electrónico de barrido de superficies. b) La profundidad del campo es la capacidad que tiene el instrumento de mantener una imagen bien enfocada sobre cambios grades de la topografía de la superficie del espécimen bajo estudio. Imagen adaptada de (López, 2012).

1.2.2.3 POTENCIAL ZETA Y RADIO HIDRODINÁMICO

El potencial zeta es la medida de la estabilidad de una partícula e indica el potencial que se requiere para penetrar la capa de iones circundante en la

partícula para desestabilizarla. Por lo tanto, el potencial zeta es la potencia electrostática que existe entre la separación de las capas que rodean a la partícula. Se usa el modelo de la doble capa para visualizar la atmosfera iónica en la proximidad del coloide cargado y para explicar cómo actúan las fuerzas eléctricas de repulsión. Inicialmente, la atracción del coloide negativo hace que algunos iones positivos formen una rígida capa adyacente alrededor de la superficie del coloide; esta capa de contra-iones es conocida como la capa de Stern. Otros iones positivos adicionales son todavía atraídos por el coloide negativo, pero estos son rechazados por la capa de Stern, así como los iones positivos que intentan acercarse al coloide. Gracias a este equilibrio dinámico, surge la formación de una capa difusa de contraiones, éstos tienen una alta concentración cerca de la superficie, la cual disminuye gradualmente con la distancia, hasta que se logra un equilibrio con la concentración de los contraiones en el seno de la disolución. En la capa difusa hay un déficit de iones negativos, llamados co-iones pues tienen la misma carga que el coloide. Su concentración se incrementa gradualmente al alejarse del coloide. La densidad de carga es mayor cerca del coloide y gradualmente disminuye a cero cuando las concentraciones de iones positivos y negativos se asemejan (Luciano Sandoval Yoval, 2000). La figura 1.2.2.3.1 muestra dos formas de visualizar la doble capa, obsérvese como actúan las fuerzas de repulsión entre los iones, en los cuales se lleva un equilibrio dinámico.

La medición del diámetro hidrodinámico de las partículas se realiza a partir de la medida del movimiento browniano de éstas, es decir a partir del movimiento al azar de las partículas dentro del solvente por efecto del choque con las moléculas del medio que las rodea. Al incidir la luz del láser sobre las partículas en suspensión, éstas dispersan luz en todas las direcciones llegando al detector la radiación dispersada a un ángulo determinado. Este detector registrará las fluctuaciones de la intensidad de la luz a lo largo del tiempo que son debidas al movimiento de las partículas. Un correlador digital compara las fluctuaciones a lo largo del tiempo con respecto a la primera señal creando una función de correlación que tras la aplicación de diversos algoritmos da como resultado el diámetro hidrodinámico de las partículas y su distribución (Fin & Mart, 2013.).

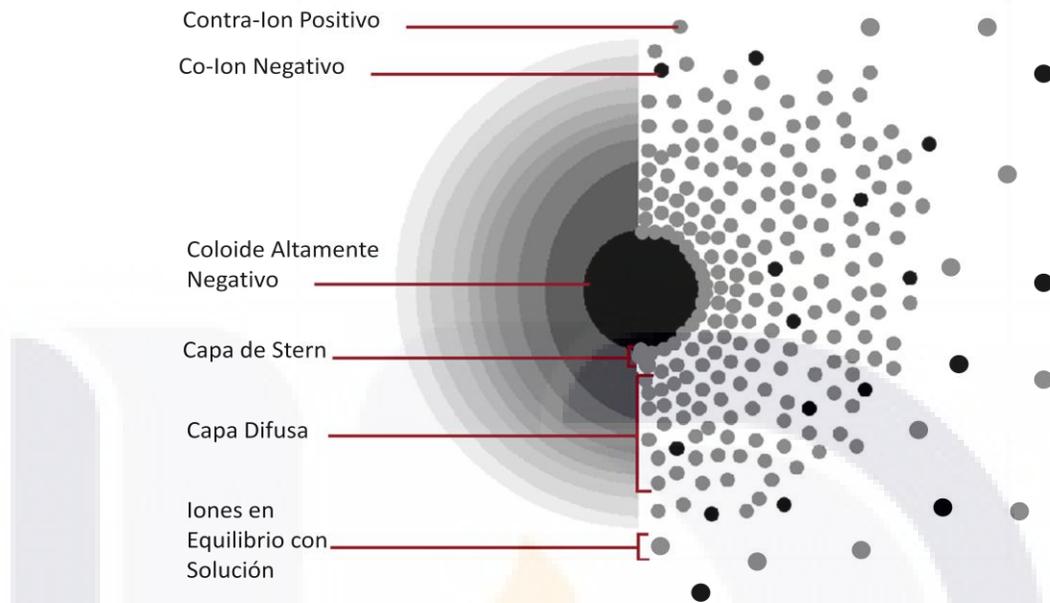


Figura 1.2.2.3.1 Dos maneras de visualizar la doble capa. La vista izquierda muestra el cambio en la densidad de carga alrededor del coloide. La derecha muestra la distribución de iones positivos y negativos alrededor del coloide cargado. Imagen adaptada de (Zeta-Meter, 1993).

1.3 LA FAMILIA DEL COBRE Y SUS APLICACIONES

La familia del cobre está compuesta por el cobre, la plata, el oro y el roentgenio, pero para los fines del presente trabajo solo hablaremos de los tres primeros elementos (oro, plata y cobre), haciendo énfasis principalmente en el cobre.

1.3.1 ORO

El oro es un metal amarillo, que posee la mayor conductividad y maleabilidad de todos los metales conocidos. Es muy poco reactivo, no es atacado ni por el oxígeno ni por el azufre. Sin embargo, reacciona con los halógenos y con las soluciones que los generan, por ejemplo, el agua regia (Cotton, 1981).

El oro se utiliza en joyería y decoración. Para ello suele estar aleado con otros metales, además, se usa en electrónica, actualmente recubre satélites artificiales ya que es un buen reflector de la radiación infrarroja y es bastante inerte. A pesar

de sus características, el oro en una escala nanométrica cambia sus propiedades y presenta actividad catalítica. Actualmente, sus propiedades ópticas y electrónicas han sido estudiadas y utilizadas en alta tecnología como sondas sensoriales, agentes terapéuticos, en aplicaciones médicas y biológicas, además se emplean como conductores electrónicos y catalizadores (Castillo, 2013).

1.3.2 PLATA

La plata es un metal lustroso, blando y maleable de color blanco. Su conductividad eléctrica y térmica es la mayor entre todos los elementos. Desde el punto de vista químico es menos reactiva que el cobre, salvo en lo que respecta a la reacción con sulfuro de hidrógeno, que ennegrece rápidamente la superficie de la plata. El metal se disuelve en ácidos oxidantes y en soluciones de cianuro en presencia de oxígeno o peróxido. La plata se obtiene generalmente como subproducto en el tratamiento de los minerales de cobre y plomo (Cotton, 1981).

La plata se emplea en joyería, platería artesanal, algunas aleaciones se emplean en soldaduras, baterías de plata-zinc y de plata-cadmio y en la fabricación de espejos. Las propiedades antimicrobianas de los iones de plata fueron conocidas desde tiempos ancestrales y por eso fueron usados como bactericidas en catéteres, heridas de quemaduras y trabajos dentales. La plata al interactuar con la membrana de bacterias patógenas interrumpe la cadena respiratoria, y colapsa la fuerza motriz de electrones a través de ésta, lo cual acaba con la producción de ATP y sus fuentes de energía (Morones Ramírez R., 2009)

1.3.3 COBRE

El cobre se halla muy ampliamente distribuido en la naturaleza, donde se le encuentra como tal, al estado libre, o en sulfuros, arseniuros, cloruros y carbonatos. Se le extrae por tostación oxidante y fusión, seguida por depósito a

partir de soluciones de sulfato. El cobre es un metal de color rojo, blando y dúctil, sus elevadas conductividades térmica y eléctrica son solo inferiores a las de la plata. El metal es miscible con el oro en todas proporciones. (Cotton, 1981)

El cobre se utiliza como cable de conducción eléctrica, forma parte de las aleaciones de gran importancia económica: bronce (cobre y estaño) y latón (cobre y zinc), el sulfato de cobre (II) se emplea como fungicida (veneno agrícola) y para eliminar algas en la purificación de aguas, el óxido de cobre (I) se emplea como pigmento de pinturas anticorrosión, como catalizador y en la obtención de vidrios y esmaltes rojos, el óxido de cobre (II) se emplea para obtener vidrios y esmaltes negros, verdes y azules, en vidrios ópticos y como abono.

El Cu es un metal esencial para todos los organismos vivos, especialmente para los mamíferos, ya que actúa como cofactor de importantes enzimas como la Cu/Zn superóxido dismutasa (Cu/Zn SOD), la citocromo c-oxidasa de la cadena de transporte electrónico mitocondrial y la ceruloplasmina que es sumamente ubicua. También se encuentra en las tirosinasas (que intervienen en la ruta de biosíntesis de melanina), en la proteína hefaestina (encargada de la eliminación del hierro en las células del intestino) y en las dopamina-monooxigenasas (necesarias para la producción de catecolaminas) (Arnal N., 2010).

1.4 PROBLEMÁTICA AMBIENTAL QUE SE SUFRE ACTUALMENTE

Los problemas que sufre el medio ambiente, son demasiado extensos, variados y algunos son consecuencia de otros. Por tal motivo y para los fines del manuscrito, solo se abordarán los contaminantes emergentes entre los que se encuentran los fármacos y las consecuencias de su presencia en el medio ambiente.

1.4.1 CONTAMINACIÓN

De una forma general, la contaminación es la introducción al ambiente de un agente físico, químico o biológico que propicia un desequilibrio ambiental, por

ende, la contaminación puede ser física, química o biológica. Los “contaminantes emergentes” corresponden en la mayoría de los casos a contaminantes no regulados, que pueden ser candidatos a regulación futura, dependiendo de investigaciones sobre sus efectos potenciales en la salud y los datos de monitoreo con respecto a su incidencia. Ejemplos de los compuestos que han emergido recientemente como particularmente relevantes, son los surfactantes, productos farmacéuticos, productos para el cuidado personal, aditivos de las gasolinas, retardantes de fuego, antisépticos, aditivos industriales, esteroides y hormonas y subproductos de la desinfección del agua (Becerril 2009). Dentro de los contaminantes emergentes, existe una clasificación denominada PPCPs y que son los fármacos y productos de cuidado personal (por sus siglas en inglés), en este grupo entran medicamentos y sus metabolitos, entre los que se incluyen los analgésicos/antiinflamatorios, antibióticos, antiepilépticos, β -bloqueantes, reguladores de lípidos, medios de contraste en rayos X, anticonceptivos orales, esteroides entre otros. (Hernando M.D., 2006).

Los fármacos pueden llegar a diferentes cuerpos de agua través del drenaje, puesto que los pacientes los desechan vía urinaria o por medio de las excretas (una vez que cumplen su función en el organismo), o bien pueden llegar al ambiente a través de la basura, debido a que no se tiene la cultura de llevar los fármacos caducos a algún centro de acopio apropiado. En muchos casos, las consecuencias de su presencia en el medio ambiente no están aún claras, pero en otros el riesgo es evidente y alarmante, un ejemplo, es el diclofenaco, que aparte de afectar a los riñones en los mamíferos, se ha asociado (como consecuencia de su uso en veterinaria) con la desaparición de los buitres blancos en India y Pakistán, lo que supone, según el autor de este estudio (Fent K., 2006), un desastre ecológico comparable al acontecido en el pasado con el DDT.

Un tipo primario de contaminación, ya sea física, química o biológica, puede dar lugar a un tipo secundario de contaminación, ya sea física, química o biológica, y este segundo tipo de contaminación consecuencial al primario, puede traer repercusiones aun mayores que el que le dio origen.

1.4.2 CONSECUENCIAS DE LA CONTAMINACIÓN POR FÁRMACOS.

Uno de los efectos de la contaminación del agua por los PPCPs es el aumento en el número de microorganismos resistentes a múltiples antibióticos, y es por esto que la contaminación microbiana del agua plantea una mayor amenaza para la salud pública y la economía, ya que el tratamiento de las enfermedades provocadas por estos microorganismos se incrementaría al no poder combatirlos con los medicamentos actuales. (Ruperalia J. P., 2008).

1.4.3 RESISTENCIA BACTERIANA

El desarrollo de resistencia a algún agente, ya sea físico o químico, temporal o permanente, es un mecanismo evolutivo de adaptación que pretende asegurar la supervivencia del organismo. Considerando en particular la resistencia hacia algún agente químico (como los antibióticos), ésta se genera mediante uno o una combinación de los siguientes mecanismos. El primero son las alteraciones de la permeabilidad celular que impide al agente penetrar en la bacteria y depende tanto del microorganismo como del fármaco. El segundo es la alteración del blanco, por ejemplo la resistencia a macrólidos-lincosamidas viene determinada por una simple metilación del ARN ribosómico. El tercero es la inactivación del antibiótico por enzimas, las más conocidas son β -lactamasas que rompen el anillo β -lactámico, inactivando al fármaco, ésta puede ser codificada por el cromosoma bacteriano o por fragmentos de ADN extracromosómico (plásmidos); las enzimas que inactivan a los aminoglucósidos (adenilasas, fosforilasas y acetilasas); y otra muy conocida es la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT). El cuarto es por reflujo, es decir, al entrar el antibiótico, éste es excretado por mecanismos dependientes de energía. El quinto es por bloqueo que impide que el antibiótico llegue a su diana, por tanto bloquea su acción (Alberto Delgado-Iribarren, 2001).

Las mutaciones en el propio ADN de microorganismos aleatorios no serían tan eficientes si éstos no compartieran su material genético con otros microorganismos

a sus alrededores. El uso de plásmidos es el caso más común en el desarrollo de resistencia a antibióticos. Los plásmidos son fragmentos de ADN extracromosómico independiente del ADN cromosómico, el cual contiene distintos tipos de información, en muchos casos “sabiduría” de resistencia a antibióticos específicos. Los plásmidos se pueden replicar y traspasar tanto a las células hijas como a otras células por conjugación.

La importancia clínica de la resistencia a antibióticos, es mayor en el caso de los beta-lactámicos, aminoglucósidos y glucopéptidos por constituir el tratamiento de elección de las infecciones enterocócicas graves. Aunque la mayoría de las infecciones nosocomiales son provocadas por *Enterococcus faecalis*, la especie *Enterococcus faecium* es la que con mayor frecuencia es multirresistente y presenta mayores porcentajes de resistencia adquirida a los antimicrobianos (Cercenado, 2011). En la siguiente tabla se resume el lugar de acción de algunos antimicrobianos así como su mecanismo de resistencia.

Tabla 1.4.3.1: Mecanismo de acción y de resistencia de los principales antibacterianos. Tabla tomada de (Alberto Delgado-Iribarren, 2001).

Agente	Lugar de acción	Mecanismo de resistencia	
		Principal	Secundario
Cloranfenicol	Síntesis proteica	Inactivación enzimática	Alteración de la permeabilidad
Tetraciclinas	Síntesis proteica	Alteración del blanco o diana y reflujo	Inactivación enzimática y alteración de la permeabilidad
Macrólidos	Síntesis proteica	Alteración del blanco o diana	Inactivación enzimática
Sulfamidas-trimetoprim	Síntesis de ácido fólico	Alteración del blanco o diana	-
Quinolonas	Replicación de ADN	Alteración del blanco o diana	Alteración de la permeabilidad
Rifampicina	Transcripción de ADN	Alteración del blanco o diana	Alteración de la permeabilidad
β -lactámicos	Pared celular	Inactivación enzimática	Alteración de la permeabilidad
Glucopéptidos	Pared celular	Bloqueo	
Aminoglucósidos	Síntesis proteica	Inactivación enzimática	Alteración del blanco o diana y alteración de la permeabilidad

1.5 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL AGUA

Muchas de las bacterias del agua, provienen del contacto con el aire, el suelo, animales o plantas vivas o en descomposición, fuentes minerales y materia fecal. La transmisión a través del agua de organismos patógenos ha sido la fuente más grave de epidemias, entre las enfermedades más conocidas cuyos gérmenes pueden ser transmitidos por el agua están las de origen bacteriano, las de parásitos patógenos y las de origen viral. El ensayo bacteriológico consta de algunas pruebas como: la estimación del número de bacterias de acuerdo con el conteo total en placa y la determinación, más significativa, de la presencia o ausencia del grupo coliforme que incluye las bacterias de forma bacilar, aerobias y facultativas anaerobias, Gram-negativas, no formadoras de esporas, las cuales fermentan lactosa con formación de gas en un periodo de 48 horas a 35°C (Rojas, 2005).

La calidad bacteriológica del agua depende del fin de consumo, de esta forma se tiene que: en aguas para uso recreacional o indirecto con el humano, el conteo promedio de coliformes fecales (NMP/100ml o UFC/ml) debe ser menor de 1000 colonias/100ml (NOM-003-ECOL-1997, 2003); mientras que en aguas para consumo humano el conteo de coliformes debe ser menor de 2NMP/100ml (NOM-127-SSA1-1994, 1994).

1.5.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli forma parte de la flora normal del colon de los humanos y otros animales, pero puede ser patógeno tanto dentro como fuera del tracto gastrointestinal (las diferencias en el grado de virulencia de distintas cepas de *E. coli* son resultado de plásmidos individuales y no del repertorio de probacteriófagos integrados asociados a cada uno). *E. coli* presenta fimbrias o pilis, que son de gran importancia para adherirse a las superficies mucosas del hospedador, y distintas cepas de esta bacteria pueden fermentar lactosa a diferencia de gran parte de los patógenos intestinales, como *Salmonella* y *Shigella*, que no pueden hacerlo.

Durante la fermentación de los carbohidratos *E. coli* produce ácido y gas. Fermenta glucosa y es capaz de generar energía al reducir los nitratos a nitritos. Carece de Citocromo oxidada (es decir, es oxidasa negativa). La identificación de las distintas cepas se basa en las diferencias entre tres antígenos estructurales: O, H y K.

La importancia clínica de *E. coli* se divide con base en la importancia de las enfermedades intestinales y extraintestinales provocadas por ésta. Se han identificado al menos cinco tipos de enfermedades intestinales que difieren en los mecanismos patógenos, entre las que se encuentran las cepas: enterotóxicas (ETEC), enteropatógenas (EPEC), enterohemorrágicas (EHEC), enteroinvasivas (EIEC) y las enteroadherentes (EAEC), en todas es prácticamente el mismo organismo, solo difieren por la adquisición de una de las características patógenas específicas. Las enfermedades extraintestinales son causadas con frecuencia por la propia flora del paciente, entre éstas se tienen las infecciones del tracto urinario, la meningitis del recién nacido y algunas infecciones hospitalarias (Richard A. Harvey, 2008).

1.5.2 ***Staphylococcus aureus***

Los estafilococos son cocos Gram-positivos dispuestos en racimos (aspecto de uvas). Son más redondeados que ovals, bastante exigentes, verdaderos anaerobios facultativos y algunos producen exotoxinas. Son fuertes y resistentes al calor y a la desecación. Gracias a ello pueden sobrevivir largos periodos de tiempo en vehículos de contagio, los cuales actúan como focos de infección. *S. aureus* ha sido considerado como el patógeno más significativo para el hombre, pero hoy en día se acepta más que los estafilococos coagulasa negativa también pueden causar infecciones. Por ejemplo, *S. epidermidis* es coagulasa negativa y es el más aislado de procesos infecciosos (Juan Ángel Basualdo, Celia E. Coto, Ramón Alberto de Torres, 1996).

La importancia clínica de *S. aureus* radica en que produce infecciones cutáneas localizadas superficiales (en piel), profundas (medula ósea), endocarditis aguda,

septicemia, neumonía, infecciones hospitalarias, dermatitis exfoliativa e intoxicaciones. Actualmente esta especie presenta principalmente resistencia a penicilina G, meticilina y vancomicina, por esto es importante desarrollar tratamientos más agresivos e incluso drenar del paciente el sitio de infección (Richard A. Harvey, 2008).

1.6 ACCIÓN BACTERICIDA DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

El efecto bactericida de las nanopartículas metálicas ha sido atribuido a su pequeño tamaño y alta superficie de contacto, lo que permite su interacción con la membrana bacteriana y no solamente se debe a la concentración del ion metálico en solución. Las nanopartículas metálicas con actividad bactericida pueden recubrir superficies con posibles aplicaciones en varios campos, por ejemplo instrumental médico, tratamiento de aguas y procesamiento de alimentos. Las nanopartículas metálicas pueden combinarse con polímeros para formar compósitos con una mejor utilización de su actividad antimicrobiana (Ruperalia J. P., 2008). A continuación se explicará el mecanismo de acción de las nanopartículas metálicas que se ha demostrado presentan actividad antimicrobiana.

1.6.1 NANOPARTÍCULAS DE PLATA

Desde hace tiempo se sabe del efecto bactericida que tiene la plata, y actualmente se emplea en un tamaño nanométrico. Hoy en día se realizan estudios sobre los factores que pueden afectar el efecto antimicrobiano de las nanopartículas, como su tamaño, su forma, su cristalinidad y su superficie química así como los factores medioambientales: el pH, fuerza iónica, presencia de ligandos, cationes divalentes y macromoléculas (Marambio Jones C., 2010).

El mecanismo de acción de la actividad bactericida de la plata se ha tratado de dilucidar mediante TEM (Transmission Electron Microscopy). Los resultados muestran que los iones plata (Ag^+) pueden formar complejos con las bases del

DNA haciendo que pierda su habilidad de replicación. La interacción entre los iones plata y los ribosomas suprime la expresión de enzimas y proteínas necesarias para la producción de ATP. La reacción de los iones plata con los grupos tiol, carboxilo, fosfato, hidroxil, amina, imidazol e indol, puede llevar a la inactivación enzimática y a la muerte celular. Los iones plata son reportados como inhibidores del consumo y cambio del grupo fosfato en *E. coli*. Los iones plata promueven la salida del fosfato acumulado así como del manitol, succinato, glutamina y prolina. Los iones de plata pueden colapsar la fuerza motriz de los protones en la bacteria y por esto causar la muerte celular (Lok C, 2006)

1.6.2 NANOPARTÍCULAS DE COBRE

Los iones cobre pueden reaccionar con los componentes de la pared celular cargados negativamente como el peptidoglicano a través de atracciones electrostáticas. Las reacciones redox entre Cu^{+2} y Cu^{+1} puede ocurrir en la superficie celular de la bacteria. Estas reacciones generan H_2O_2 que daña la membrana citoplasmática. La presencia de iones cobre dentro de la célula bacteriana puede alterar los procesos bioquímicos (Kim JH, 2000). Sin embargo el mecanismo exacto detrás del efecto bactericida de las nanopartículas de cobre aun es desconocido.

Se cree que la toxicidad es ejercida a través de varios mecanismos paralelos, todos llevados a cabo por la acción directa de las nanopartículas y por la liberación de iones Cu^{+2} de las mismas. Se ha observado la formación de pozos y cavidades en *E. coli* expuesta a nanopartículas de cobre (Raffi M, 2010).

Una hipótesis es que el Cu^{+2} puede dañar las proteínas presentes en la envoltura celular y puede también dañar las proteínas dentro de la célula. El cobre es reportado por desplazar metales esenciales de su sitio nativo de unión en las proteínas. Los iones cobre pueden unirse con moléculas de ADN y dar lugar a un desorden de la estructura helicoidal por reticulación dentro y entre las cadenas de ácidos nucleicos. La interacción directa de las nanopartículas de cobre con las

proteínas es todavía hipotetizada. Estas interacciones pueden causar cambios conformacionales en la estructura de la proteína o en su sitio activo, lo que causa la inhibición o neutralización de la actividad biológica de la proteína (Borkow G, 2009). Algunos cultivos bacterianos muestran una alta sensibilidad a las nanopartículas de cobre, posiblemente debido a la gran abundancia de grupos funcionales, como aminos y grupos carboxilo. Por ejemplo, *B. subtilis* tiene una gran afinidad para reaccionar con nanopartículas y iones cobre (Ruperalia JP, 2008).

1.7 NANOTOXICOLOGÍA

La nanotoxicología fue propuesta como una nueva rama de la toxicología para dirigir la laguna de conocimiento del daño causado por los NMs y en especial para dirigir los efectos adversos en la salud ocasionados por los nanomateriales. En el artículo original en la revista nanotoxicology, Donaldson et al. (2004) citó “la disciplina de la nano-toxicología puede hacer una contribución importante en el desarrollo de una segura y sustentable nanotecnología”. La nanotoxicología está involucrada en proponer protocolos de prueba confiables, robustos y con datos seguros para la evaluación de riesgos en el humano y el ambiente. Los factores de estudio que abarca la nanotoxicología se muestran en la figura 1.7.1 (Arora, Rajwade, & Paknikar, 2012).

El pulmón es probablemente el primer blanco de los nanomateriales. Pero las NPs pueden entrar en circulación y migrar a varios órganos y tejidos. La toxicidad de la nanopartícula es extremadamente compleja y multifactorial y depende mayoritariamente de sus propiedades fisicoquímicas como el tamaño y la forma, así como de las propiedades de la superficie (carga, área y reactividad) (Ferreira, Cemlyn-Jones, & Robalo Cordeiro, 2013). Los mecanismos de toxicidad de las NPs no han sido totalmente esclarecidos, pero se ha demostrado que éste se debe a la formación de ROS (especies reactivas de oxígeno), independientemente del nanomaterial evaluado; se sabe que algunos nanomateriales pueden generar genotoxicidad y respuesta inflamatoria (Frejo,

Díaz, Lobo, García, & Capó, 2011). Además las propiedades de las NPs influyen en su estabilidad y movilidad ambiental, en el depósito en sistemas acuáticos, comportamiento ambiental y ecotoxicidad para las algas, plantas y hongos de suelo.



Figura 1.7.1 Complejo conjunto de temas relacionados con la toxicidad de las nanopartículas. Imagen adaptada de (Arora et al., 2012).

2 ANTECEDENTES

Alsawafta et al, 2011 propusieron dos rutas para la síntesis de nanopartículas de cobre. Una de ellas, a partir de sulfato cúprico como precursor de cobre, citrato de sodio como agente reductor suave, boro-hidruro de sodio como agente reductor fuerte y polivinil pirrolidona como agente estabilizante. El material sintetizado fue caracterizado por espectrofotometría UV-Vis, en el que el máximo de absorción se presentaba a 567nm. La segunda síntesis fue realizada sin el agente reductor suave (citrato de sodio) y el espectro tenía un máximo de absorción a 570nm, lo que los investigadores reportan es que en esta síntesis, el cobre empezó a oxidarse, lo que se ve reflejado en el desplazamiento del máximo de absorción hacia la derecha (Alsawafta, Badilescu, Packirisamy, & Truong, 2011).

Blosi et al, 2010 sintetizaron soluciones coloidales de nanopartículas de óxido de cobre empleando polivinil pirrolidona (PVP) y un calentamiento por microondas, el agente reductor usado fue el ácido ascórbico. Ellos encontraron que el uso del microondas provee un calentamiento rápido y uniforme a los reactivos y al solvente, mientras que la aceleración de la reducción del precursor metálico y la nucleación de grupos metálicos, da como resultado nanoestructuras monodispersas. Además el uso de una síntesis asistida por microondas, también se puede usar en una escala mayor, haciendo que el proceso se intensifique lo más posible (Blosi, Albonetti, Dondi, Martelli, & Baldi, 2010).

Dunying et al, 2013 fabricaron nanopartículas de cobre partiendo de acetato de cobre, empleando hidracina como reductor y diferentes ácidos carboxílicos como surfactantes (ácido láctico, ácido cítrico, ácido glicólico y alanina). Lo que ellos observaron por TEM (microscopía de transmisión electrónica), fue que el diámetro de las NPs era menor a 10nm y se presentó una estrecha distribución de tamaño a altas concentraciones de ácido láctico, ácido cítrico o de alanina (Deng, Jin, Cheng, Qi, & Xiao, 2013)

Masoud et al, 2008 partieron de oxalato cúprico y trifenilfosfina. Caracterizaron su material por espectrofotometría UV-Vis y lo que encontraron fue que el material presentaba un máximo de absorción en 572nm, mientras que la caracterización por TEM

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

y SEM revelaban que sus nanopartículas tienen un tamaño promedio entre los 30 y 80 nanómetros (Masoud S., 2008).

Yu et al, 2008, elaboraron NPs de cobre a través de una reducción en líquido, con dos solventes diferentes, uno de ellos fue el agua y el otro etilenglicol. Empleando ácido ascórbico como reductor y diferentes concentraciones de PVP (poli vinil pirrolidona), como agente estabilizante. Encontraron que la reacción con etilenglicol es más rápida y las nanopartículas más estables, en comparación con la síntesis en agua, sin embargo las soluciones coloidales son más puras empleando agua que empleando etilenglicol. Además colocando 0.3 y 0.5mmol/l de PVP en la síntesis, demostraron (por TEM), que el tamaño de las partículas depende de la concentración de PVP, debido a que obtuvieron tamaños de partícula de 7 y 4nm respectivamente (Yu, Xie, Chen, Li, & Zhang, 2009).

Chatterjee et al, 2012 desarrollaron una metodología de síntesis de nanopartículas de cobre por medio de la reducción del CuCl_2 en presencia de gelatina como agente estabilizante, y como agente reductor hidracina. Las nanopartículas fueron caracterizadas por espectrofotometría UV-Vis, dispersión de luz dinámica, difracción de rayos X, microscopia de transmisión electrónica, microscopia de fuerza atómica, caracterización de superficie a través de espectroscopia de fotoelectrones de rayos X, y espectrometría de absorción atómica. El tamaño reportado fue de 50-80nm. Los resultados encontrados en la evaluación de la actividad bactericida de las nanopartículas de cobre para *E. coli* fueron, la concentración mínima inhibitoria (CMI) de 3.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y la concentración mínima bactericida (CMB) de 7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Por otro lado, la CMI para *B. subtilis* fue de 3.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y la CMB de 9.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Para *S. aureus* la CMI fue de 4.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y la CMB de 9.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Chatterjee et al., 2012)

Giannouse et al, 2013 sintetizaron nanopartículas de cobre con diferente composición (Cu, Cu_2O y $\text{Cu}/\text{Cu}_2\text{O}$), por una ruta hidrotérmica empleando Tween 20 como surfactante. Caracterizaron sus materiales por difracción de rayos X, microscopia de transmisión electrónica, Raman y espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier. Ellos encontraron, que al someter diferentes bacterias a las nanopartículas de cobre, éstas inducen degradación de los plásmidos de ADN de la bacteria (pDNA), de manera dependiente de la dosis. Las nanopartículas de Cu_2O de 16 y 12nm muestran la concentración inhibitoria 50 más baja (IC_{50}) de 2.13 y 3.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ contra *B. cereus* y *B. subtilis*, respectivamente. Para *E. coli* se observó una CMI con NPs de Cu_2O de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Por medio de una electroforesis con gel de agarosa, demostraron el daño al ADN a altas concentraciones de NPs. Ellos concluyen que la acción bactericida del material se debe a generación de ROS y a la liberación de iones cobre al medio (Giannousi, Lafazanis, Arvanitidis, Pantazaki, & Dendrinou-Samara, 2014).

Ochoa et al, 2011, evaluaron la acción inhibitoria de microbios en sistemas de tratamiento de aguas residuales, por el efecto tóxico de los iones de cobre (Cu^{+2}). Encontraron que los iones de cobre inhiben una gran variedad de poblaciones microbianas, entre las que se encuentran las bacterias fermentativas, aerobias heterótrofas, las bacterias nitrificantes y las desnitrificantes; a concentraciones que comúnmente se encuentran en efluentes industriales. Las bacterias desnitrificantes se comportaron extremadamente sensibles a la presencia de los Cu^{+2} . La concentración que causaba la inhibición de éstas en un 50% ($\text{IC}_{50\%}$) fue de 0.95mg/l. El cobre también inhibió a las bacterias fermentativas, a las heterótrofas aerobias y a las bacterias nitrificantes a $\text{IC}_{50\%}$ de 3.5, 4.6 y 26.5mg/l respectivamente. Sin embargo las bacterias nitrificantes y desnitrificantes recobraron su actividad metabólica después de varios días de exposición a altos niveles de iones cobre (25-100mg/L) posiblemente por una atenuación en la solubilidad del cobre o por adaptación microbiana (Ochoa-Herrera, León, Banihani, Field, & Sierra-Alvarez, 2011).

Pramanik et al, 2012 evaluaron la actividad bactericida de nanopartículas de yoduro de cobre (CuI). Estas nanopartículas fueron sintetizadas por un método de coprecipitación, caracterizadas por microscopia de transmisión electrónica, difracción de rayos X y se obtuvo el potencial zeta de las mismas. El tamaño de sus NPs fue de 8nm. La actividad microbicida de este material fue evaluada contra *E. coli* (DH5 α) y *B. subtilis*. Los valores de CMI y CMB para DH5 α fueron menores de 0.066mg/ml y 0.088mg/ml respectivamente, mientras que para *B. subtilis* fueron mayores de 0.015 y 0.018mg/ml respectivamente. Ellos infieren que el daño en las bacterias puede deberse a ROS mediante un daño en el ADN, sin embargo el daño en la membrana bacteriana fue determinado por microscopia de fuerza atómica. Por tanto concluyen que la producción de ROS y el daño a la membrana son los principales mecanismos de actividad bactericida de estas NPs (Pramanik, Laha, Bhattacharya, Pramanik, & Karmakar, 2012).

Rispoli et al, 2010 evaluaron la toxicidad de NPs de Cu con valencia cero contra *E. coli*, midiendo la influencia del pH, la temperatura, la velocidad de aireación, la

concentración de NPs y de bacterias, así como del tiempo de exposición. La toxicidad de las nanopartículas de Cu frente a *E. coli* se eleva en condiciones ácidas y altas temperaturas (40°C), con alta aireación y cuando la concentración de bacterias y de NPs es alta. De igual manera, observaron que la toxicidad se determina por la interacción de los parámetros evaluados individualmente (Rispoli et al., 2010).

Ruperalia et al, 2008 evaluaron la actividad bactericida de NPs de plata y de cobre de 3 y 9nm respectivamente, frente a *E. coli*, *B. subtilis* y *S. aureus*. Realizaron la evaluación de la CMI, la CMB y la prueba de difusión en disco, para la cual ellos elaboraron sensidiscos cargados con NPs, cada disco contenía aproximadamente 100 ±15 µg de NPs de cada material. Los resultados obtenidos sugirieron que las NPs de plata contra *E. coli* y *S. aureus* eran mejores agentes bactericidas y aunque una capa de óxido se formó en las nanopartículas de cobre, éstas demostraron tener una mejor actividad bactericida frente a *B. subtilis*. Ellos reportan una liberación de iones plata y de iones cobre en el medio y que posiblemente estos iones eran los responsables de la actividad bactericida de las NPs (Ruparelia, Chatterjee, Duttagupta, & Mukherji, 2008).

Valodkar et al, 2012 evaluaron la actividad antimicrobiana y citotóxica de las nanopartículas de cobre dispersas en agua. Las nanopartículas de cobre de 10nm fueron preparadas empleando almidón y un calentamiento por microondas. La citotoxicidad fue evaluada en fibroblastos de ratón, evaluando la viabilidad celular *in vitro*, así como la liberación extracelular de lactato deshidrogenasa (LDH). La actividad antimicrobiana fue evaluada frente a *S. aureus*, *E. coli* (DH5α), y *Salmonella typhi*; los resultados fueron comparados con ampicilina a dosis terapéuticas. La CMI y la CMB para *S. aureus* fue de 3.2 y 4.3µg/ml respectivamente, para *E. coli* fueron de 1.6 y 2.1 µg/ml de CMI y CMB respectivamente y para *S. typhi* de 3.6 y 4.9 µg/ml de CMI y CMB respectivamente. Ellos concluyeron que la presencia de las NPs no representa una disminución importante en la viabilidad celular en fibroblastos de ratón, (lo cual es atribuible a la presencia de almidón en la solución de las NPs), y que las NPs en solución de almidón promete tener importantes aplicaciones antimicrobianas (Valodkar et al., 2012).

En nuestro laboratorio se han desarrollado diferentes metodologías para la síntesis de nanopartículas, por ejemplo procesos sol-gel y reducción en líquido. Algunas de las nanopartículas que se han sintetizado por estas rutas son: nanopartículas de plata, de dióxido de titanio, dióxido de titanio dopado con plata y dióxido de titanio dopado con

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

hierro. Así mismo se han evaluado posibles aplicaciones a los materiales sintetizados (que pueden emplearse como sensores, como fotocatalizadores, entre otras cosas), además se han realizado evaluaciones de la actividad bactericida de las nanopartículas tanto de plata como de dióxido de titanio dopado con plata y los resultados han sido prometedores. Además de las síntesis y evaluaciones anteriormente mencionadas, se ha trabajado en el desarrollo de una metodología de nanopartículas de cobre-quitosano por una ruta convencional con diferentes agentes reductores.

En nuestro laboratorio, en 2014, se evaluó la toxicidad de óxidos metálicos, en particular de dióxido de titanio, dióxido de titanio dopado con plata y dióxido de titanio dopado con hierro, las pruebas se llevaron a cabo tanto *in vitro* (en células rojas humanas), como *in vivo* (en ratas wistar). Los resultados obtenidos *in vitro* muestran que tanto el dióxido de titanio como el dióxido de titanio dopado con hierro, no provocan la lisis de las células expuestas, mientras que el dióxido de titanio dopado con plata si provoca hemólisis. Para obtener resultados *in vivo* las ratas fueron sacrificadas para realizar el análisis tanto de algunas enzimas como del tejido hepático. Lo que se encontró fue que el daño causado por las nanopartículas de dióxido de titanio dopadas con plata da un daño irreversible, mientras que las nanopartículas de dióxido de titanio dopadas con hierro ocasionan edemas hepáticos, los cuales pueden ser reversibles, si la exposición a éstos es cesada. De forma general se concluyó que el daño es causado por la generación de radicales libres y por la liberación de iones al medio en el que se encuentren las nanopartículas.

En 2014 en nuestro laboratorio, se realizó una prueba de toxicidad *in vitro* de las nanopartículas de cobre, evaluando la hemólisis provocada por el aumento de la concentración de NPs de cobre en solución, lo que se encontró fue que a bajas concentraciones de NPs se presenta una mayor cantidad de hemólisis, lo cual puede deberse, a que a mayor concentración del nanomaterial, éste se aglomera y sedimenta, ocasionando que no se lleve a cabo una interacción de la membrana del eritrocito con el material, provocando así una disminución en la hemólisis.

3 JUSTIFICACIÓN

Debido a la gran problemática en materia de salud que se vive mundialmente con la presencia de bacterias resistentes a fármacos, es importante estudiar diferentes formas de tratar las infecciones, buscar alternativas eficaces que produzcan una mejoría en la salud humana y que además no tenga efectos en el medio ambiente. Actualmente se ha discutido el uso de nanopartículas de distintos materiales en diferentes áreas como en el tratamiento de aguas residuales, en el área de la cosmetología y en el área de la salud.

Durante mucho tiempo se empleó la plata por su actividad bactericida, pero estudios recientes señalan que la plata puede producir toxicidad a dosis bajas, debido a esto, es deseable encontrar otras alternativas a los materiales basados en plata, que presenten una actividad similar pero que no sean tóxicos, o en su defecto, sean menos tóxicos que ésta. Una alternativa interesante es el cobre, ya que es un metal más pequeño que la plata, químicamente se encuentra dentro del mismo grupo (forman parte de la misma familia), lo que hace suponer que puede presentar las mismas propiedades que la plata, pero al ser un oligoelemento fundamental como centro catalítico de varias enzimas redox, se espera sea menos tóxico que la plata, es decir, sea más biocompatible en comparación con la plata.

Este trabajo pretende dar una alternativa de solución a la problemática medioambiental y de salud pública que representa la resistencia bacteriana, el medio para eliminar estas bacterias patógenas es mediante nanopartículas de cobre y de cobre-quitosano, el beneficio que aporta es que se sustituiría a la plata coloidal que se ha observado puede presentar toxicidad a bajas concentraciones, por un material que se espera no presente dicho efecto, sea biocompatible y que además tiene una ruta sintética medioambientalmente benigna.

4 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Sintetizar, caracterizar y evaluar acción microbicida de nanomateriales de cobre

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

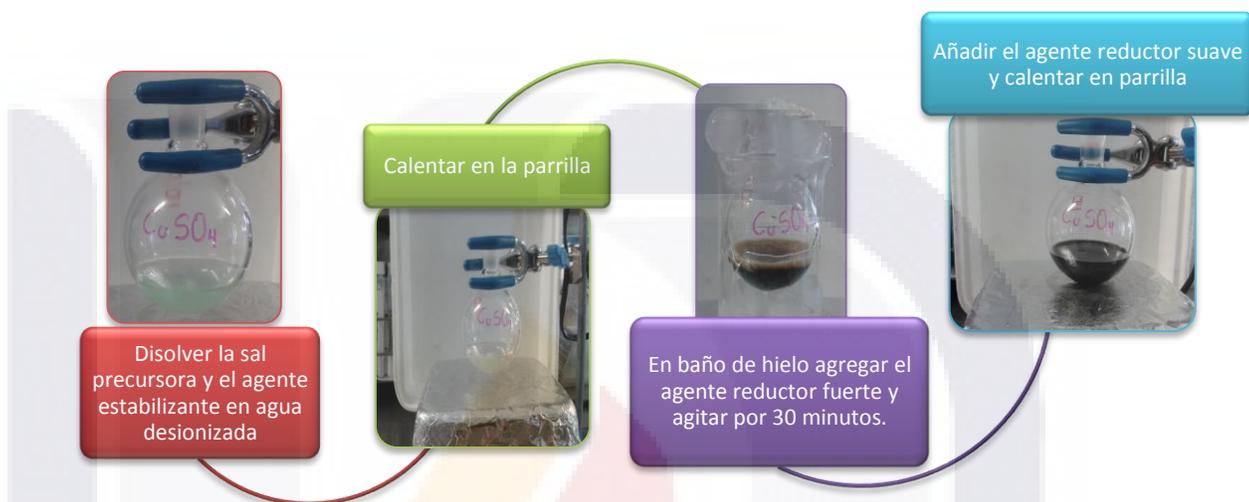
1. Optimizar variables de reacción para la síntesis de soluciones coloidales de cobre
2. Caracterización de las soluciones coloidales de cobre mediante espectroscopia UV-Vis y microscopia de barrido electrónico (SEM)
3. Obtención y caracterización de nanopolvos de cobre
4. Evaluar la acción microbicida de los nanopolvos de cobre en bacterias Gram (+) y Gram (-)

5 HIPÓTESIS

El material de cobre nanoestructurado puede presentar una acción bactericida similar al material nanoestructurado de plata, pero a un menor costo.

6 METODOLOGÍA

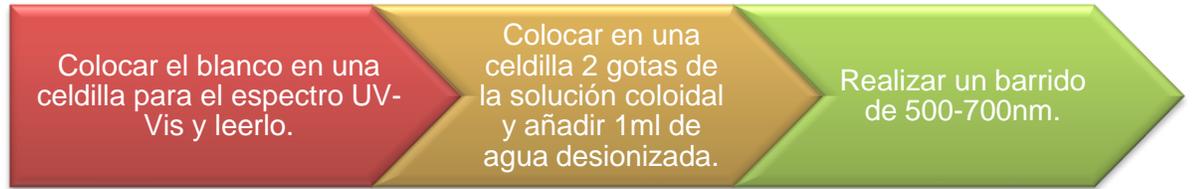
1) Síntesis de soluciones coloidales de cobre por el método convencional.



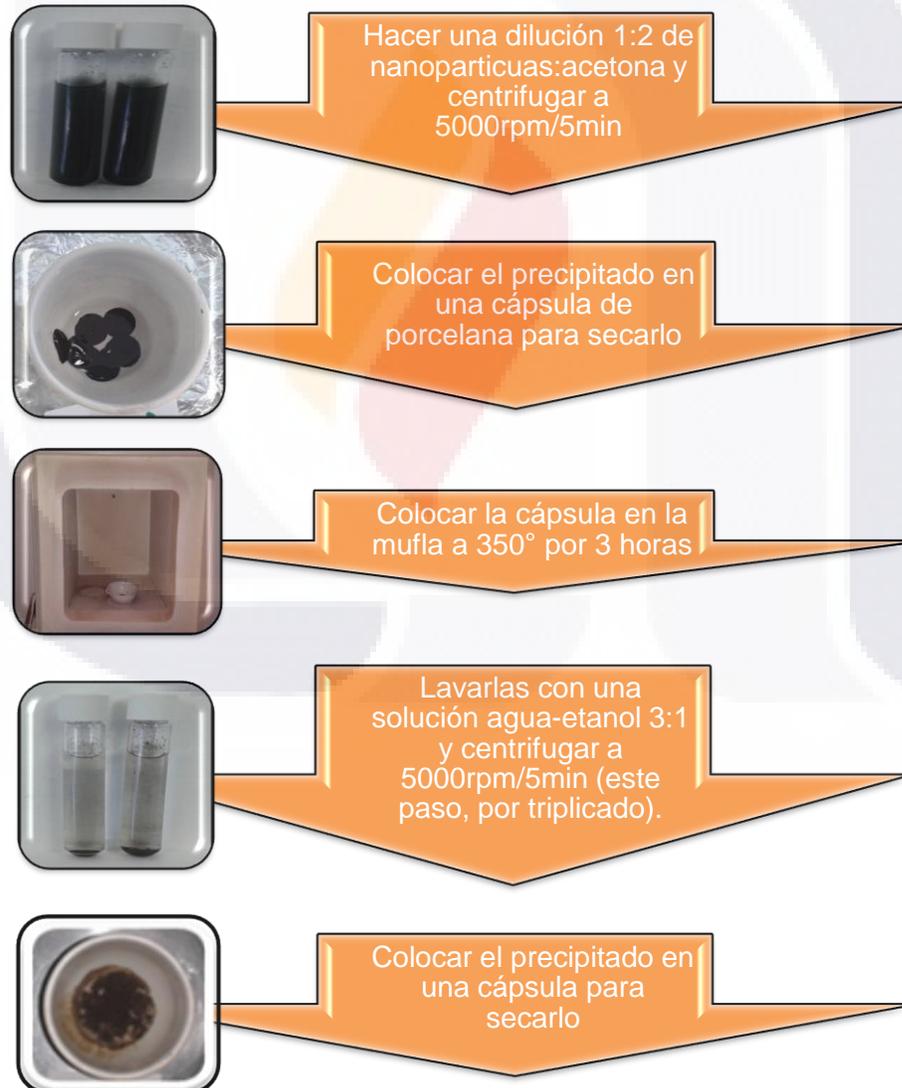
2) Síntesis de soluciones coloidales de cobre, asistida por microondas.



- 3) Caracterización de las soluciones coloidales de cobre y cobre-quitosano por espectrofotometría UV-Vis.



- 4) Precipitado, lavado y secado de las nanopartículas (obtención de nanopolvos)



5) Caracterización por microscopia electrónica de barrido (SEM)

La caracterización de los nanopulvos de cobre y cobre-quitosano se realizó en el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT).

6) Determinación del radio hidrodinámico de las nanopartículas de cobre y cobre-quitosano.

La determinación del radio hidrodinámico de las nanopartículas, se realizó en El Instituto de Investigaciones Científicas en Guanajuato

7) Toma de muestra de agua residual para obtención de cepas bacterianas



- Toma de muestra del efluente de la planta de tratamiento del hospital general Tercer Milenio



- Hacer un cultivo de la muestra en medio nutritivo.



- Sembrar en medio cuenta estándar y resembrar en los medios Sal y Manitol y Mac Conkey. Purificar la cepa



- Identificación de cepas bacterianas

8) Evaluación de la sensibilidad antimicrobiana (antibiograma) por el método Bauer-Kirby



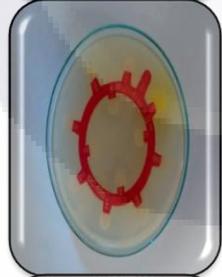
• Preparar cultivos de bacterias (no mayores a 18hrs), para ensayar en agar tripticasa de soya (TSA) o infusión cerebro corazón (BHI). Inocular 3 o 4 colonias de bacterias en 5ml del caldo (TSA o BHI) e incubar a 37°C hasta turbidez visible (2-5 horas).



• Ajustar la turbidez con solución salina fisiológica estéril o caldo de cultivo estéril hasta una turbidez del estándar de 0.5 de la escala de Mc Farland.



• Usando un hisopo de algodón, sumergirlo en el inóculo y eliminar el exceso presionando sobre la pared interna del tubo y por encima del nivel del caldo. Inocular la superficie de una placa de agar Mueller- Hinton pasando uniformemente por toda la placa en tres direcciones. Por último, pasar el hisopo por el borde de la placa del agar. Dejar secar 5 minutos.



• Colocar los discos con los antibióticos sobre la superficie del agar. Los discos no deben estar a menos de 15mm de los bordes de la placa y lo bastante separados entre ellos para que no se sobrepongan las zonas de inhibición (20mm)



• Dejar secar las cajas máximo 15 minutos a temperatura ambiente (para que difundan). Nota: presionar un poco cada sensibilidad. Incubar la placa en posición invertida a 37°C por 18-24 horas

• Medir los diámetros de las zonas con una regla o un vernier

• Reportar R=resistente, I=intermedio o S= sensible, acorde a la tabla proporcionada por el proveedor

9) Evaluación de la actividad microbicida del material nanoestructurado de cobre y cobre-quitosano frente a diferentes bacterias.



7 RESULTADOS

1) Síntesis de soluciones coloidales de cobre por una ruta convencional

Se optimizaron variables para la síntesis de soluciones coloidales de cobre. Se evaluaron diferentes condiciones de pH (3, 7 y 9), así como diferentes agentes estabilizantes: alcohol polivinílico (PVA), acrilamida, polivinil pirrolidona (PVP), goma arábica y quitosano. En general con PVP, PVA y acrilamida, se observó que éstos no ejercían su acción surfactante, observándose la formación de un precipitado al finalizar el proceso de síntesis. El pH de la reacción fue evaluado a 7 y a 3 (en éstos se observó una mejor disolución de la sal precursora), pero en el resultado final no se presentaron diferencias en las soluciones con pH ácido y pH neutro, de tal modo que se procedió a realizar la síntesis con pH neutro. De forma particular, al emplear el PVP se obtienen soluciones color marrón que presentan un precipitado de color negro después de 15 minutos a temperatura ambiente, por tanto se descartó trabajar con este agente estabilizante. Al utilizar la acrilamida en la síntesis convencional, se observó que al adicionar el agente reductor (NaBH_4), las partículas se salen de solución, obteniéndose un precipitado negro, posteriormente, para eliminar el agente reductor, se procedió a calentar la solución, la cual se gelatinizó, de tal manera que también éste agente estabilizante fue descartado. En cuanto al uso del PVA, se observa al final de la síntesis un precipitado color marrón en el fondo del matraz. Al emplear la goma arábica a pH de 3 se observó una solución homogénea (color café oscuro), y estable después de 24 horas a temperatura ambiente, a pH de 7 se observó la misma solución homogénea y estable de color café intenso, por tanto se decidió realizar la síntesis con goma arábica a pH de 7. Para la síntesis de NPs de cobre empleando quitosano como agente surfactante, éste se disolvió en ácido acético (ya que no fue soluble en agua), y el resultado de la síntesis fueron soluciones de color rojo cobrizo, estables y homogéneas después de 24 horas. Con base en los resultados obtenidos, se eligió a la goma arábica y al quitosano como agentes estabilizantes para la síntesis de nanopartículas de cobre. La siguiente figura muestra el

resultado final de la síntesis de las soluciones coloidales de cobre, empleando goma arábica y una ruta convencional, a partir de diferentes agentes precursores de cobre (sulfato y nitrato cúprico).

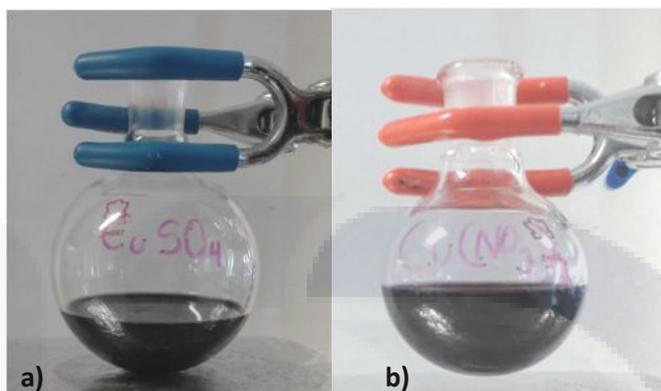


Figura 7.1.1: Soluciones coloidales de nanopartículas de cobre usando una síntesis convencional y goma arábica como agente estabilizante, partiendo de diferentes precursores, a) a partir de sulfato cúprico y b) a partir de nitrato cúprico.

En las soluciones coloidales de nanopartículas de cobre-quitosano, se trabajó con diferentes tiempos de calentamiento, es decir, mientras que cuando se empleó goma arábica se calentó la solución por 30 minutos a 90°C, las soluciones de cobre-quitosano solo se calentaron 10 minutos para evitar que el polímero se gelatinice, lo cual se observó cuando éste se calentaba por más de 10 minutos. El resultado de este arreglo se puede apreciar en la siguiente figura.

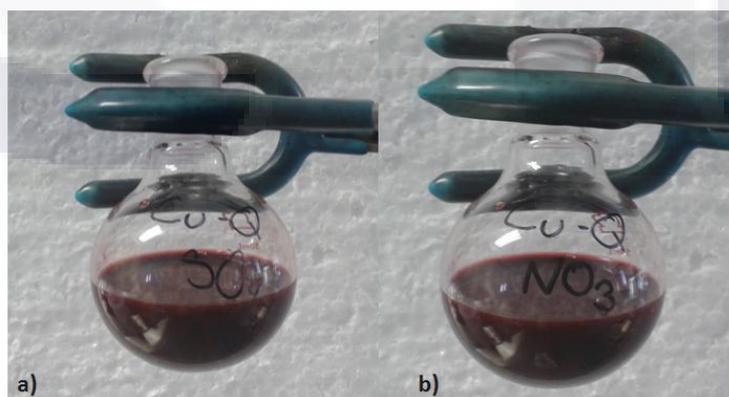


Figura 7.1.2: Soluciones coloidales de nanopartículas de cobre-quitosano, empleando una síntesis convencional y partiendo de diferentes precursores a) a partir de sulfato cúprico y b) a partir de nitrato cúprico.

2) Síntesis de soluciones coloidales de cobre asistida por microondas.

Una vez determinados los agentes estabilizantes con los que se trabajaría, la síntesis en microondas fue relativamente más rápida de trabajar, en esta síntesis se trabajó con una sola potencia (60watts), tres tiempos de calentamiento (3, 5 y 10 minutos) y algunas temperaturas (70, 80 y 90°C). La potencia fue elegida acorde a previos trabajos en el laboratorio. En los tiempos de calentamiento, inicialmente se evaluaron 5 y 10 minutos de reacción, se observó que a los 5 minutos las soluciones eran estables y homogéneas, pero los resultados no eran siempre reproducibles, mientras que a los 10 minutos siempre se obtenían soluciones estables, homogéneas y no precipitaban, por tanto se eligió éste tiempo de calentamiento para las soluciones de cobre empleando goma arábica como agente estabilizante. En cuanto al tiempo de calentamiento de las soluciones de cobre-quitosano, se determinó por una relación lineal que 3 minutos de calentamiento serían suficientes para obtener soluciones coloidales de cobre-quitosano homogéneas, lo cual fue cierto y los dos tiempos de calentamiento para sintetizar las soluciones de cobre-quitosano fue de 3 minutos. Se evaluaron diferentes relaciones entre temperaturas y tiempos de calentamiento, la relación inicial implicó un primer calentamiento a 70° durante 5 minutos y un segundo calentamiento a 90°C por 10 minutos, el resultado fue una solución roja oscura. La segunda fue el primer calentamiento a 70°C por 5 minutos y el segundo calentamiento a 80°C por 10 minutos, el resultado fue pobremente reproducible entre una solución café homogénea y una negra con precipitado marrón. Una tercera relación fueron los dos calentamientos a 80°C por 10 minutos y se obtuvo una solución café oscuro, las cuales en 24 horas precipitaban. La última relación fueron los dos calentamientos a 90°C por 10 minutos, el resultado fue que las soluciones después de 24 horas se mantenían estables y homogéneas. Por tanto se eligió ésta temperatura para los dos calentamientos (en la ruta convencional se trabajó a 85°C para evitar pérdidas en el volumen de la solución). Los resultados de las síntesis tanto de cobre, como de cobre-quitosano por una ruta en microondas, se muestran en las siguientes figuras.

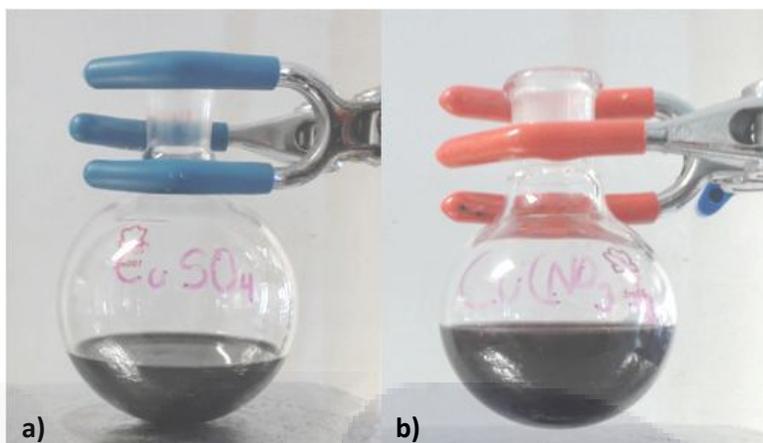


Figura 7.2.1 Soluciones coloidales de nanopartículas de cobre, usando microondas y partiendo de diferentes precursores a) sulfato cúprico y b) nitrato cúprico

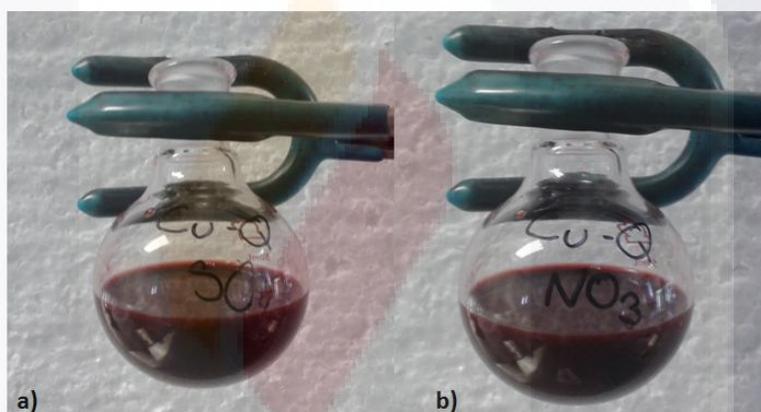


Figura 7.2.2: Soluciones coloidales de nanopartículas de cobre-quitosano, empleando microondas y partiendo de diferentes precursores, a) a partir de sulfato cúprico y b) a partir de nitrato cúprico.

3) Caracterización de las soluciones coloidales de cobre y cobre-quitosano por espectrofotometría UV-Vis

Para la caracterización de las soluciones coloidales de cobre y cobre-quitosano se procedió a la determinación del plasmón de resonancia superficial a través de la técnica de espectroscopia UV-Vis. Se empleó el espectrofotómetro “Thermo scientific evolution 201 UV-Visible Spectrophotometer”, los resultados de estas caracterizaciones se muestran en las siguientes figuras, las cuales revelan

los máximos de absorción de cada una de las soluciones, por diferente ruta, con cada uno de los agentes estabilizantes y precursores de cobre.

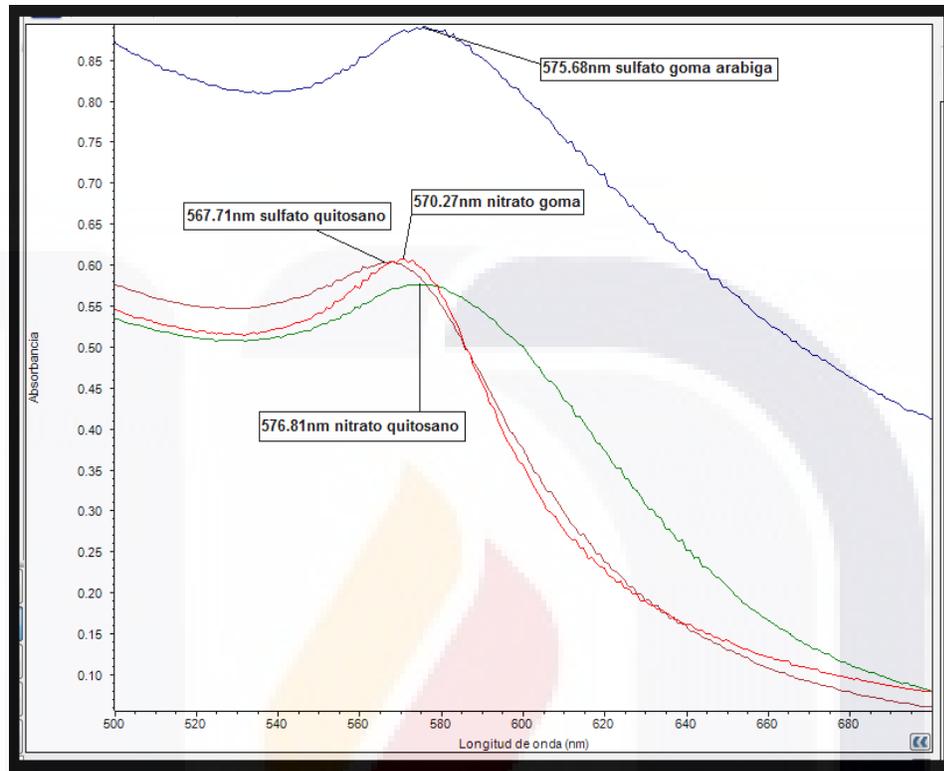


Figura 7.3.1 Espectro UV-Vis de las soluciones coloidales de cobre sintetizadas a partir de diferentes precursores de cobre por una ruta convencional

Nótese como en la figura anterior se muestran los diferentes espectros, obtenidos de la caracterización de las soluciones coloidales de cobre y de cobre-quitosano empleado una ruta convencional. La imagen confirma que el espectro más uniforme es el de la síntesis partiendo de nitrato cúprico y empleando la goma arábica como estabilizante, de éste le siguen el espectro del cobre-quitosano partiendo de nitrato cúprico, el espectro de la síntesis de cobre partiendo de sulfato cúprico y empleando la goma arábica y por último el espectro de la síntesis de cobre-quitosano partiendo del sulfato cúprico. Con base en esta figura se puede afirmar que para una síntesis convencional el mejor agente precursor para las nanopartículas de cobre y de cobre quitosano es el nitrato cúprico.

La siguiente figura muestra los espectros de máxima absorción de las soluciones coloidales de las nanopartículas de cobre empleando un calentamiento

por microondas. Obsérvese como de forma general, los espectros de máxima absorción son más definidos en la síntesis asistida por microondas en comparación con la síntesis convencional. El espectro más definido en esta figura es el de la síntesis de NPs de cobre partiendo de sulfato cúprico y goma arábica, le siguen el del cobre-quitosano partiendo de sulfato cúprico, el de la síntesis de cobre partiendo de nitrato cúprico y goma arábica y por último el del cobre-quitosano partiendo de nitrato cúprico. Por tanto, y con base en esta figura se puede decir que para una síntesis de NPs de cobre o cobre-quitosano por microondas, el mejor agente precursor es el sulfato cúprico.

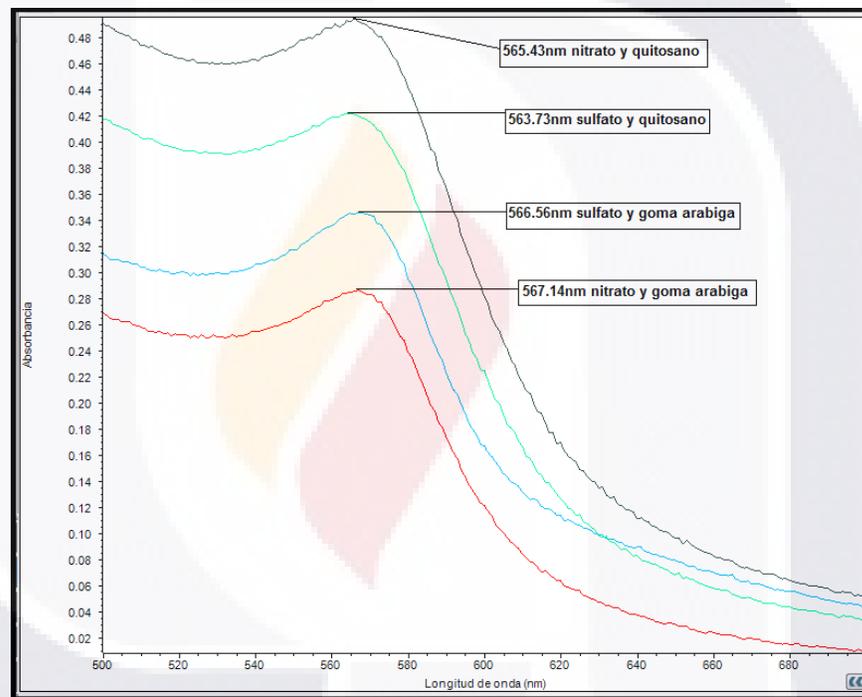


Figura 7.3.2: Espectro UV-Vis de las soluciones coloidales de cobre sintetizadas a partir de diferentes precursores de cobre empleando microondas

4) Obtención de nanopulvos de cobre y cobre-quitosano

Una vez caracterizadas las soluciones coloidales de cobre, se procedió a precipitarlas, calcinarlas y lavarlas. Para lo cual primero se intentó precipitarlas con etanol en relación 1:2 y 1:3 (nanopartículas: etanol), y en ninguna relación se observó un precipitado. Después se intentó precipitar con acetona en una relación 1:2 y 1:3 (nanopartículas: acetona) y en ésta si se observó el precipitado deseado,

tanto en 1:2 como en 1:3 y se eligió la relación 1:2 para precipitar a las nanopartículas. Una vez precipitadas y secas, se calcinaron a 350°C por 3 horas, (condiciones establecidas en el laboratorio), y posterior a la calcinación, se lavaron con agua: etanol en relación 1:3 para eliminar toda la materia orgánica que pudiese estar presente. Obteniéndose así nano-polvos de cobre y de cobre-quitosano, los cuales se muestran en la siguiente imagen.

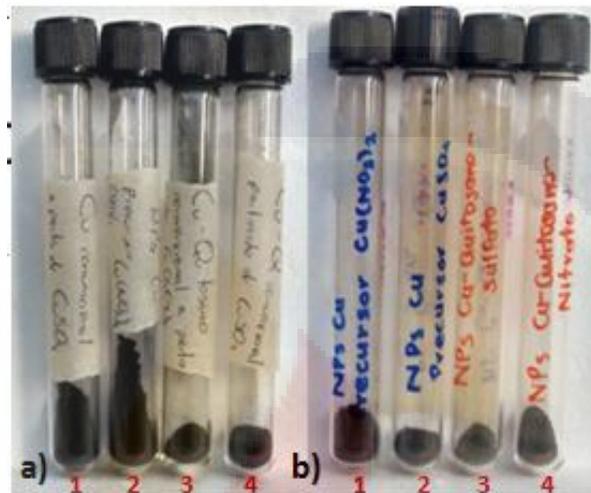


Figura 7.4.1: Nanopolvos de cobre y cobre-quitosano a partir de dos rutas diferentes a) ruta convencional 1^a) NPs de cobre a partir de sulfato cúprico, 2^a) NPs de cobre a partir de nitrato cúprico, 3^a) NPs de cobre-quitosano partiendo de nitrato cúprico, 4^a) NPs de cobre-quitosano a partir de sulfato cúprico; y b) ruta usando el microondas 1^b) NPs de cobre a partir de nitrato cúprico, 2^b) NPs de cobre a partir de sulfato cúprico, 3^b) NPs de cobre-quitosano a partir de sulfato cúprico, 4^b) NPs de cobre-quitosano a partir de nitrato cúprico.

5) Caracterización por microscopía electrónica de barrido (SEM)

Los nanopolvos obtenidos en el paso anterior, fueron sometidos a una caracterización por medio del microscopio electrónico de barrido (SEM), para comprobar lo que se reporto en la caracterización de las soluciones coloidales por medio de la espectrofotometría UV-Vis. La caracterización UV-Vis mostraba por la forma del espectro, que las partículas en solución presentaban tamaño pequeño y uniforme (Yu et al., 2009). La caracterización por SEM demostró que las nanopartículas eran esféricas y presentaban un tamaño de 10±2nm. También se lograron observar diferentes nanocompuestos y nanoagregados de nanopartículas de cobre-quitosano y de cobre metálico respectivamente. Las imágenes de estas caracterizaciones se muestran en las siguientes figuras.

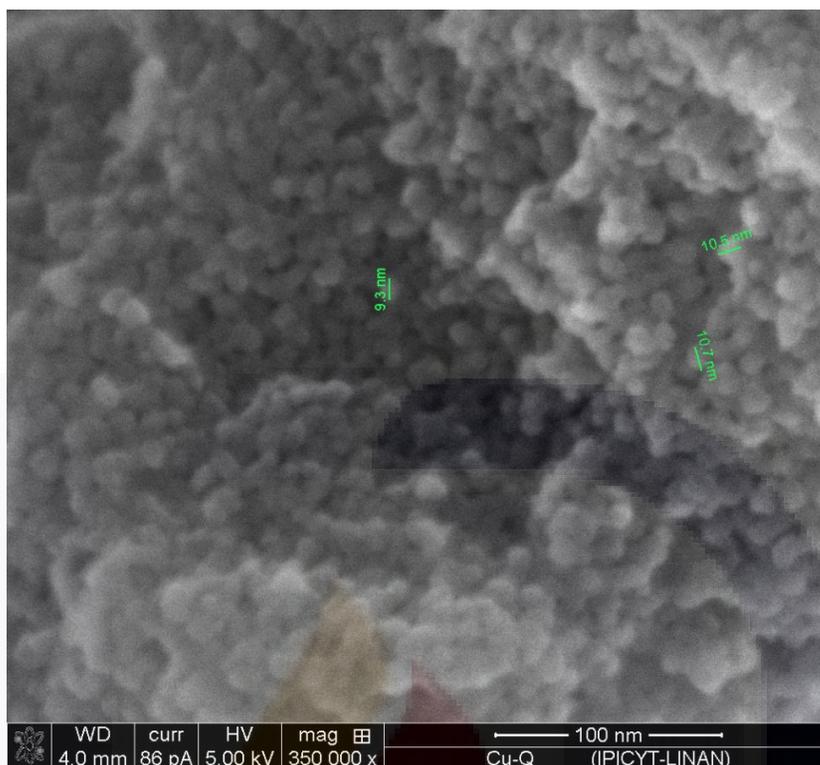


Figura 7.5.1: Caracterización por SEM de las nanopartículas de cobre empleando sulfato cúprico como precursor de cobre.

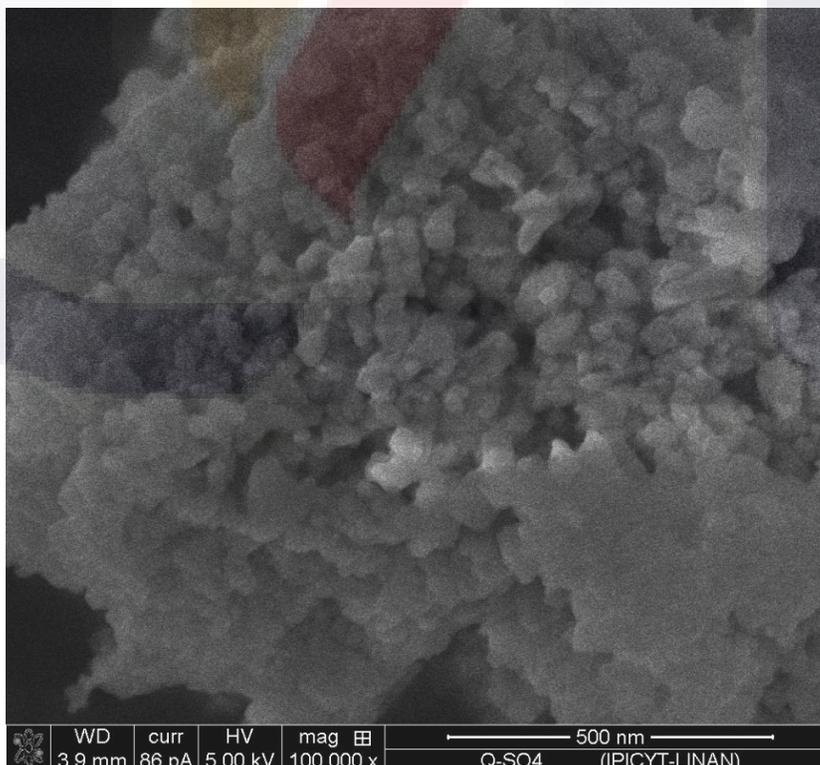


Figura 7.5.2: Caracterización por SEM de nanopartículas de cobre-quitosano, empleando sulfato cúprico como precursor de cobre.

6) Determinación del radio hidrodinámico de las nanopartículas de cobre y cobre-
quitosano

En la evaluación de la actividad bactericida del material frente a diferentes bacterias, se trabajó con la infusión cerebro corazón y con el buffer de fosfatos, el comportamiento de las nanopartículas fue diferente en ambos medios y por tanto los resultados obtenidos (los cuales se expondrán más adelante), fueron diferentes en los dos medios. Lo anterior es debido a que el comportamiento de las nanopartículas es diferente cuando se encuentran en sólido a cuando se encuentran en medio líquido, y este comportamiento, a la vez, difiere en cada medio líquido. Por ende, es necesario saber el comportamiento que presentan las nanopartículas de cobre y de cobre-quitosano en el PBS o buffer de fosfatos 0.05M a pH de 7, puesto que es en este medio en el cual se evaluó la actividad bactericida de las nanopartículas frente a *E. coli* y a *S. aureus* obteniendo resultados favorables en cuanto a la estabilidad de la nanopartícula en el medio. Una forma de conocer el comportamiento en solución de las nanopartículas es mediante la determinación del radio hidrodinámico y del potencial zeta, estos parámetros hacen referencia a la estabilidad de las nanopartículas en solución, con base en su tamaño y en su carga. La determinación del radio hidrodinámico se realizó en el instituto de investigaciones científicas de la ciudad de Guanajuato, con el "Hydro Sight for Mastersizer", empleando el PBS o buffer de fosfatos 0.05M a pH de 7, los resultados del tamaño de partícula en este medio se muestran en la tabla 7.6.1 la cual muestra que las NPs de cobre tienen un diámetro promedio de 3.22 μm y una vez sonicadas las NPs, el diámetro que presentan es de 1.12 μm , por lo tanto se puede observar la destrucción del aglomerado de nanopartículas en una disminución del diámetro de 1.1 μm , esto se puede comprobar comparando el diámetro del 50% de las partículas sin sonicar, el cual es de 4.83 μm , contra el diámetro del 50% de las partículas sonicadas el cual es de 1.59 μm . En cuanto a las nanopartículas de cobre-quitosano, el diámetro de la partícula superficial sin sonicar es de 122 μm , mientras que el mismo, una vez sonicado es de 27.8 μm , comparando los diámetros del 50% de las partículas se observa que las partículas sin sonicar tienen un diámetro de 218 μm , y una vez sonicadas es de 9.79 μm . En

ambos casos, el tamaño de la partícula secundaria (en solución) se ve afectado, una vez sonicado el material.

Tabla 7.6.1. Resultados del análisis del radio hidrodinámico de las nanopartículas de cobre y cobre- quitosano, suspendidas en PBS 0.05M a un pH de 7.

Parámetro medido	Cobre	Cobre sonicado	Cobre- quitosano	Cobre- quitosano sonicado
Uniformidad	1.65	2.03	0.61	0.76
Superficie específica	186.3m ² /Kg	533.6m ² /Kg	4.907m ² /Kg	21.61m ² /Kg
Diámetro promedio de la partícula superficial	3.22µm	1.12 µm	122 µm	27.8µm
Diámetro de la partícula en relación a su volumen	10.4 µm	4.05 µm	260 µm	120 µm
Amplitud de la curva	4.94	6.02	1.99	2.22
DV10	1.37 µm	0.474 µm	71.1 µm	14.9 µm
DV50	4.83 µm	1.59 µm	218 µm	9.79 µm
DV90	25.2µm	10 µm	507 µm	232 µm

A continuación se presentan en la figura 7.6.1, las gráficas que muestran los resultados del análisis del comportamiento de los NMs de cobre y cobre- quitosano durante la determinación de su radio hidrodinámico. En dicha figura se observan las curvas de la distribución de tamaño de las nanopartículas, nótese como las nanopartículas de cobre- quitosano sonicadas (inciso a) presentan una curva de distribución de tamaño menos homogénea que las nanopartículas sin sonicar (inciso b), lo cual nos dice que el aglomerado se rompió una vez sonicado el material. En el caso de las nanopartículas de cobre, se puede observar una curva de distribución de tamaño mucho mas alterada una vez sonicada la solución (inciso c), comparada con la curva de distribución de tamaño sin sonicar (inciso d), lo cual hace intuir que las nanopartículas de cobre presentan una mayor aglomeración que las de cobre- quitosano. Y puede ser que en el medio PBS, las NPs de cobre- quitosano sean más estables que las nanopartículas de cobre.

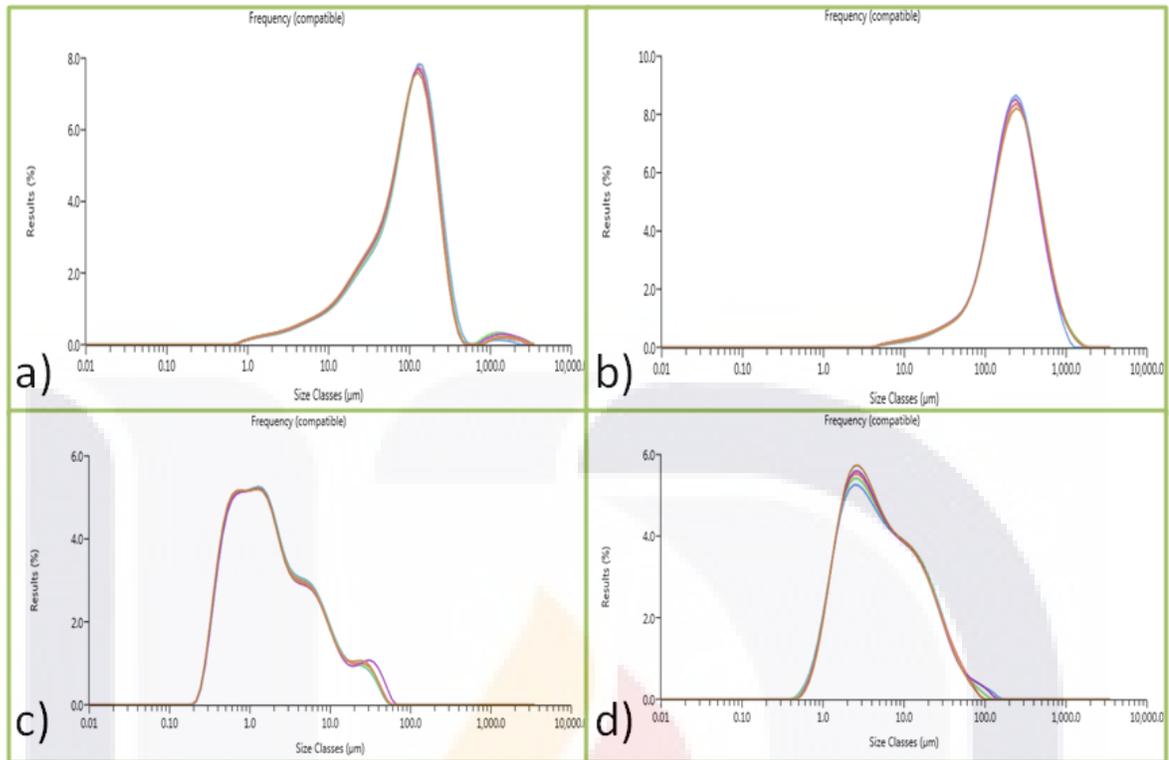


Figura 7.6.1 Curva de la distribución de tamaño de las nanopartículas de cobre y de cobre quitosano en PBS 0.05 M a pH de 7 a) nanopartículas de cobre-quitosano sonicadas, b) nanopartículas de cobre-quitosano sin sonicar, c) nanopartículas de cobre sonicadas y d) nanopartículas de cobre sin sonicar

7) Toma de muestra de agua residual para la obtención de cepas bacterianas

Durante cuatro meses seguidos (diciembre, enero, febrero y marzo), se tomaron muestras del efluente de la planta de tratamiento del hospital de la mujer ubicado en la ciudad de Aguascalientes, de estas alícuotas se lograron aislar diferentes bacterias, las cuales una vez purificadas, se tipificaron por pruebas metabólicas (bioquímicas), encontrándose una Gram-positiva y dos Gram-negativas, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, y *E. agglomerans* respectivamente. Para aislar cada una de las bacterias se tomó una azada de la muestra de agua original (la cual fue tomada en condiciones asépticas) y se procedió a inocular un medio nutritivo (infusión cerebro corazón), después de 24 horas de incubación a 37°C, se sembró una azada de este medio líquido en agar cuenta estándar. Se sembró inicialmente en este medio para observar todas las posibles unidades formadoras de colonias (UFC) que presentaran diferencias en su morfología

colonial, posteriormente se procedió a hacer una resiembra de las colonias que fueron visiblemente diferentes, las cuales se sembraron tanto en agar sal y manitol como en agar Mac Conkey, esto porque no se sabía cuales colonias eran Gram positivas y cuales Gram negativas. Inmediatamente después de esto, se realizaron las resiembras necesarias para obtener una cepa pura, lo cual se comprobó con una preparación observada en el microscopio óptico.

Las bacterias Gram negativas (*E. coli* y *E. agglomerans*), se tipificaron conforme a la interpretación de resultados aportados por las fichas técnicas del proveedor, y comparándolos con lo reportado en la literatura, para lo cual fueron inoculadas las bacterias en diferentes medios (MIO, LIA, TSI y citrato de Simmons). En cuanto a la bacteria aislada en sal y manitol, se le realizó la prueba de la catalasa para corroborar que fuese *S. aureus*. De forma adicional, un laboratorio particular facilitó dos bacterias aisladas de un paciente, las cuales presentaban multirresistencia a diferentes antibióticos. Los resultados de la obtención, purificación y tipificación de las bacterias aisladas de la planta de tratamiento se muestran en las siguientes figuras.



Figura 7.7.1 toma de muestra y tipificación bacteriana de *E. coli* y *E. agglomerans*, de izquierda a derecha respectivamente.

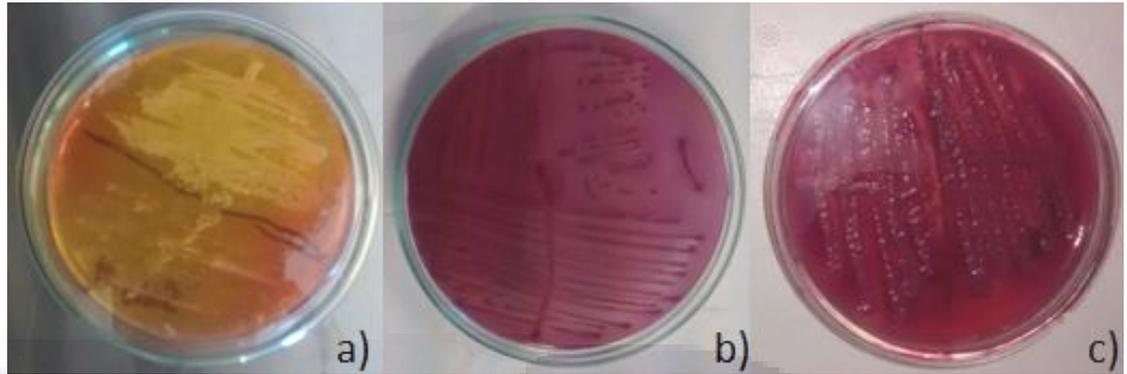


Figura 7.7.2: Cultivos bacterianos aislados del efluente de la planta de tratamiento del hospital de la mujer a) cultivo de *Staphylococcus aureus*, b) cultivo de *E. coli*, y c) cultivo de *E. agglomerans*.



Figura 7.7.3 Prueba de la catalasa para *Staphylococcus aureus*

8) Evaluación de la resistencia antimicrobiana de las cepas aisladas.

Una vez que purificadas y tipificadas las bacterias, se procedió a realizarles una prueba de sensibilidad antimicrobiana (antibiograma) a cuatro de las cinco cepas bacterianas; *E. coli* (aislada de la planta de tratamiento), *E.coli* (facilitada por un particular), *E. agglomerans* y *Staphylococcus aureus*. A la quinta bacteria (*E. faecalis*), no se le realizó la prueba porque los medicamentos a los que fue expuesta en el laboratorio clínico, no eran comparables con los que se tenían en nuestro laboratorio. Los resultados de la evaluación de sensibilidad antimicrobiana, se muestran a continuación en las siguientes tablas y figuras.

Tabla 7.8.1. Prueba de resistencia antimicrobiana para Gram negativos

Medicamento	Resultados		
	E. coli (aislada de la planta)	E. agglomerans	E. coli (facilitada de un paciente)
Amikacina	Sensible	Sensible	Sensible
Ampicilina	Sensible	Sensible	Resistente
Levofloxacina	Sensible	Sensible	Resistente
Cefalotina	Intermedia	Sensible	Resistente
Cefotaxima	Sensible	Sensible	Resistente
Ceftriaxona	Sensible	Sensible	Resistente
Cloranfenicol	Sensible	Sensible	Resistente
Gentamicina	Sensible	Sensible	Resistente
Netilmicina	Sensible	Sensible	Sensible
Nitrofurantoina	Intermedia	Sensible	Sensible
Cefepime	Sensible	Sensible	Resistente
Trimetoprim-Sulfametoxazol	Sensible	Sensible	Intermedio

A continuación en la siguiente figura, se muestran las imágenes de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana de dos cepas bacterianas (una multirresistente y una sensible), ésto a modo de comparación visual entre las dos cepas, obsérvese como la cepa que es multirresistente (inciso a) no se ve inhibida por ningún antibiótico, mientras que la cepa que no es resistente (inciso b) es inhibida por todos los antimicrobianos que fueron evaluados.

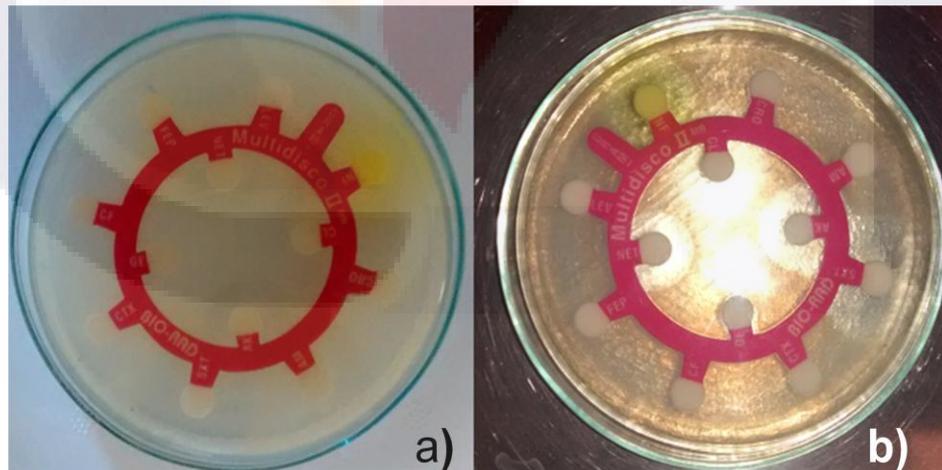


Figura 7.8.1 Antibiogramas de cepas Gram-negativas. a) *E. coli* multirresistente obtenida de un paciente y b) *E. agglomerans* aislada de la planta de tratamiento.

El resultado del antibiograma de *Staphylococcus aureus* se muestra en la siguiente tabla y en la siguiente figura. Cabe mencionar que el efluente de la planta de tratamiento

de dicho hospital, es empleado para el riego de áreas recreativas, y las bacterias aisladas sobrevivieron al tratamiento del agua residual.

Tabla 7.8.2. Prueba de la resistencia antimicrobiana para *Staphylococcus aureus*.

Medicamento	Resultados
Ampicilina	Resistente
Cefuroxina	Intermedia
Cefalotina	Sensible
Cefotaxima	Sensible
Cefepime	Sensible
Dicloxacilina	Resistente
Gentamicina	Sensible
Eritromicina	Resistente
Levofloxacina	Sensible
Penicilina	Resistente
Tetraciclina	Intermedia
Trimetoprim-Sulfametoxazol	Sensible



Figura 7.8.2 Antibiograma de *Staphylococcus aureus*

Los resultados que se muestran en la siguiente tabla, pertenecientes a *E. faecalis*, corresponden a la prueba de sensibilidad a antibióticos proporcionada por el laboratorio particular que proporcionó la bacteria. No se le realizó a ésta una comparación de la multiresistencia, por los motivos ya mencionados.

Tabla 7.8.3. Prueba de la resistencia antimicrobiana para *E. faecalis*

Medicamento	Resultados
Bencilpenicilina	Sensible
Ampicilina	Sensible
Gentamicina	Resistente
Ciprofloxacino	Resistente
Levofloxacino	Resistente
Moxifloxacino	Resistente
Clindamicina	Resistente
Eritromicina	Resistente
Linezolid	Sensible
Vancomicina	Sensible
Tetraciclina	Resistente
Nitrofurantoina	Sensible

Las tablas anteriores demuestran que *E. agglomerans* no presenta resistencia a ningún antibiótico, por tanto para este trabajo careció de importancia y fue descartada para la evaluación de la actividad bactericida del material sintetizado. La *E. coli* aislada de la planta de tratamiento muestra resistencia intermedia a cefalotina y nitrofurantoina y ésta cepa fue empleada para los primeros ensayos de la evaluación del material nanoestructurado. *S. aureus* es resistente a la ampicilina, dicloxacilina, eritromicina y penicilina, además tiene resistencia intermedia a cefuroxima y tetraciclina, por tanto también fue sujeto de investigación en el presente proyecto. En cuanto a las demás bacterias (*E. coli* y *E. faecalis*) aisladas del paciente particular, se comprobó que eran multirresistentes, y solo *E. coli* fue candidata para la evaluación del material.

9) Evaluación de la actividad bactericida del material sintetizado

Para la evaluación de la actividad bactericida de los nanomateriales, se intentó realizar la metodología propuesta por (Alberto Delgado-Iribarren, 2001), en la cual se emplean diferentes caldos nutritivos, pero (considerando la naturaleza de los NMs que se pretendían evaluar), se realizaron algunas modificaciones. Una

de éstas fue que en vez de emplear el medio de enriquecimiento, se empleó PBS 0.05M a pH de 7, por que se observó una mejor estabilidad de las NPs en este medio que en el caldo nutritivo. La evaluación de la actividad bactericida del material nanoestructurado de cobre y cobre-quitosano, se realizó en tres cepas de las cinco obtenidas; en las dos cepas silvestres de *E. coli* que tenían diferente origen, la asilada de la planta de tratamiento y la proporcionada por un laboratorio particular, y en *S. aureus*, bacteria aislada del efluente de la planta de tratamiento y que presentó resistencia a cuatro antibióticos, y que se infiere puede funcionar como un vector de transmisión de genes de resistencia a través de sus plásmidos. A continuación se presentan las tablas y figuras correspondientes a la evaluación del material nanoestructurado frente a la cepa de *E. coli* aislada de la planta de tratamiento.



Figura 7.9.1 Comparación del tiempo de exposición en la actividad bactericida de los nanopulvos de cobre frente a *E. coli* de la planta de tratamiento. a) 8 horas de exposición y b) 24 horas de exposición

Tabla 7.9.1. Comparación del tiempo de exposición (8 y 24 horas) en la evaluación de la actividad bactericida de nanopartículas de cobre frente a *E. coli* aislada de la planta de tratamiento.

Nanopartículas de cobre (mg/ml)	Tiempo de exposición (8 horas)		Tiempo de exposición (24 horas)	
	UFC/ml	Viabilidad celular (%)	UFC/ml	Viabilidad celular (%)
0 (control)	1×10^7	100	1×10^7	100
2.5	6×10^6	60	7×10^5	7
5	4×10^6	40	6×10^5	6
10	3×10^3	0.03	5×10^2	0.005

Tratamiento con NPs de Cu

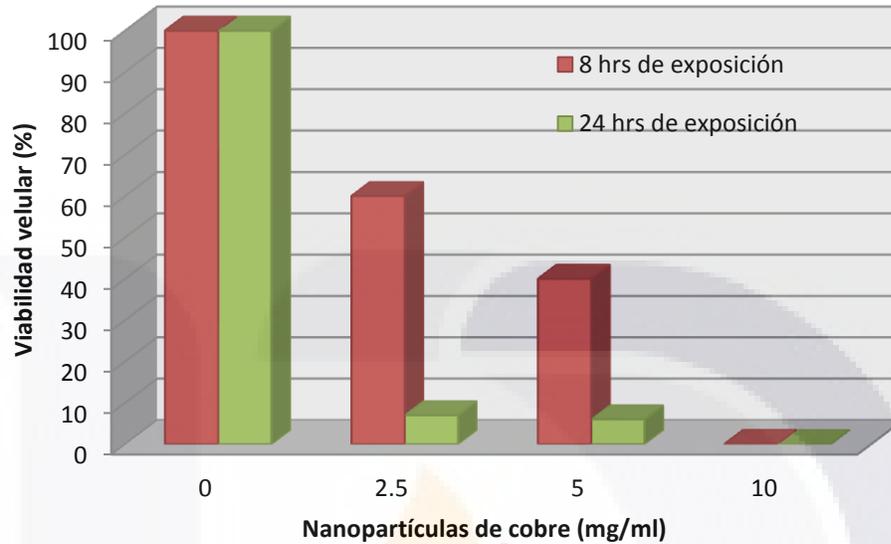


Figura 7.9. 2. Gráfica de comparación de los tiempos de exposición (8 y 24 horas) en la evaluación de la actividad bactericida de nanopartículas de cobre frente a la cepa de *E coli* aislada de la planta de tratamiento

La evaluación de la actividad bactericida de nanomateriales de cobre, se llevó a cabo para la *E. coli* aislada de la planta de tratamiento por el método de goteo (o micro-dilución), que se describe en la metodología realizada, pero en lugar de inocular 100µl, en la caja, se inocularon 10µl en un campo (una gota). Obsérvese en las figuras 7.9.1 y 7.9.2 como tanto a las 8 como a las 24 horas el crecimiento bacteriano va descendiendo de forma dependiente al incremento de la concentración de nanopartículas. En la tabla anterior, se puede observar numéricamente el decremento en la viabilidad microbiana al incrementar la concentración de NMs (la viabilidad tiende a cero a concentraciones elevadas de NMs).

Acorde a los objetivos establecidos, las bacterias no solamente fueron sometidas al material de cobre, sino que además fueron sometidas a un tratamiento con nanopartículas de cobre-quitosano, los resultados de esta exposición se muestran a continuación.

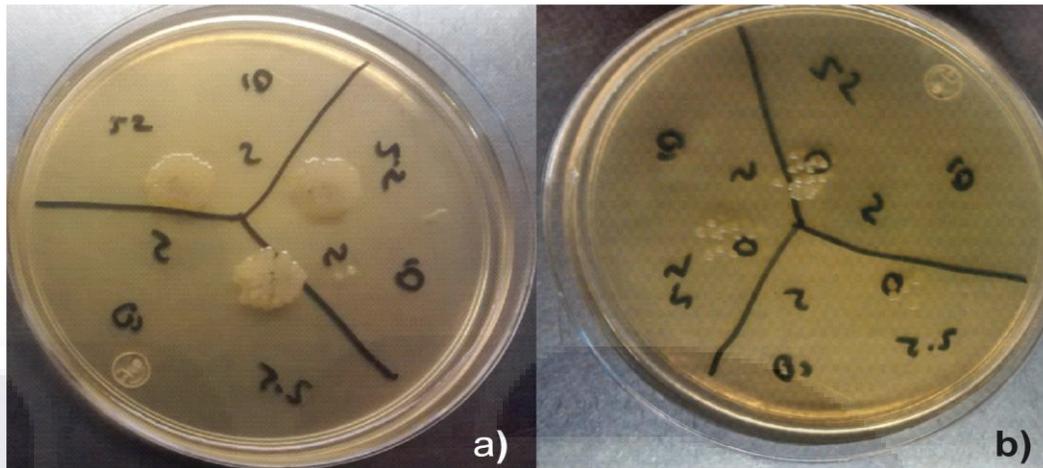


Figura 7.9.3 Comparación del tiempo de exposición en la actividad bactericida de los nanopolvos de cobre-quitosano frente a *E. coli* aislada de la planta de tratamiento a) 8 horas de exposición y b) 24 horas de exposición

Tal y como se esperaba, se presentó una sinergia entre el poder microbicida del cobre nanométrico y el poder microbicida del quitosano, esto se puede observar en la figura anterior. Por tanto a las concentraciones de nanomaterial al que fueron expuestas las bacterias (2.5, 5 y 10mg/ml), se observó una inhibición total desde la concentración más baja de nanopartículas, por ende, se procedió a realizar la evaluación de la actividad bactericida a concentraciones más bajas, las cuales se muestran a continuación en la siguiente tabla.

Tabla 7.9.2. Comparación del tiempo de exposición (8 y 24 horas) en la evaluación de la actividad bactericida de nanopartículas de cobre-quitosano frente a la cepa de *E. coli* aislada de la planta de tratamiento.

Nanopartículas de cobre-quitosano (mg/ml)	Tiempo de exposición (8 horas)		Tiempo de exposición (24 horas)	
	UFC/ml	Viabilidad celular (%)	UFC/ml	Viabilidad celular (%)
0 (control)	1×10^7	100	1×10^7	100
0.5	1×10^3	0.01	3×10^3	0.03
1	8×10^3	0.08	4×10^2	0.004
1.5	4×10^3	0.04	3×10^1	0.0003
2	0	0	0	0

Tratamiento con NPs de cobre-quitosano

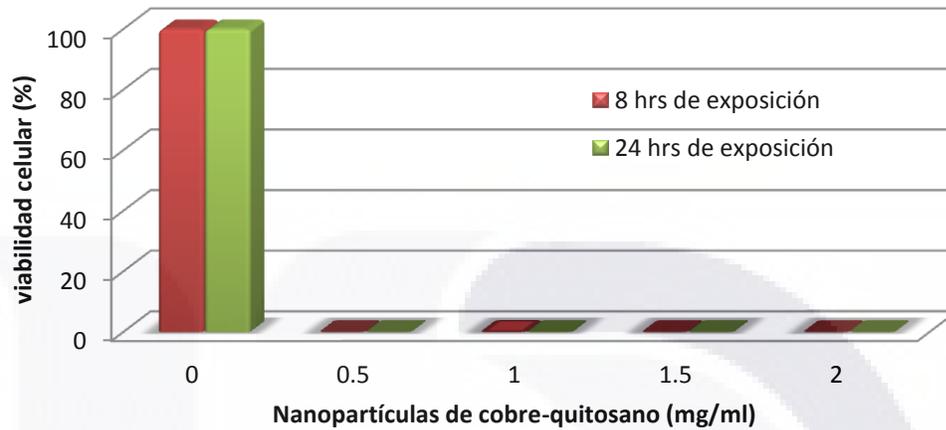


Figura 7.9. 4. Gráfica que muestra la influencia del tiempo de exposición (8 y 24 horas) en la evaluación de la actividad bactericida de nanopartículas de cobre-quitosano frente a la cepa de *E. coli* aislada de la planta de tratamiento.

Obsérvese en la figura anterior como a concentraciones extremadamente pequeñas, tanto a 8 como a 24 horas, se observa la inhibición en el crecimiento bacteriano y por tanto la dramática disminución de la viabilidad celular de las bacterias expuestas a las NPs de cobre-quitosano. Nótese en 8 horas de exposición que a concentraciones de 0.5mg/ml la viabilidad celular pasa de ser de 1×10^7 UFC/ml (100%) a ser de 1×10^3 UFC/ml (0.01%) y a 24 horas de exposición pasa de 1×10^7 UFC/ml (100%) a ser de 0 UFC/ml (0%). Si se comparan las NPs de cobre y las de cobre-quitosano como agentes bactericidas para esta cepa bacteriana, se puede decir que con una gran ventaja, las NPs de cobre-quitosano son más eficientes que las NPs de cobre.

Enseguida se muestran las tablas y figuras correspondientes a la evaluación del material nanoestructurado de cobre y cobre-quitosano frente a la segunda cepa silvestre de *E. coli* (la proporcionada por un laboratorio particular), la cual, acorde a la prueba de sensibilidad antimicrobiana presenta mutirresistencia. Primero se mostrarán los resultados obtenidos con el tratamiento de nanopartículas de cobre y posteriormente los resultados del tratamiento de las nanopartículas de cobre-quitosano. Al igual que en el caso anterior, se observó una mayor inhibición con el último material en comparación con el primero.

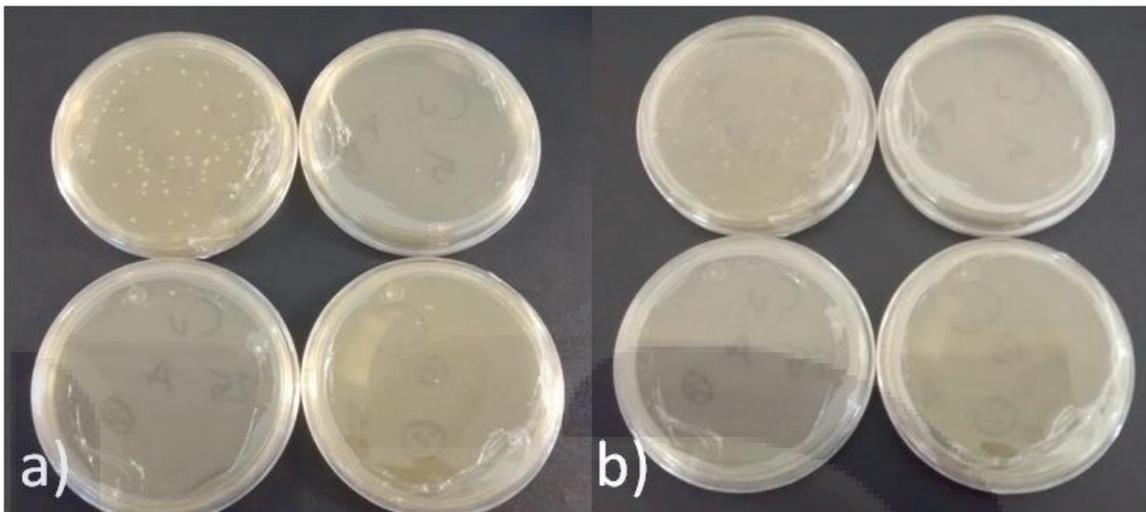


Figura 7.9.5. Comparación del tiempo de exposición en la actividad bactericida de nanopolvos de cobre frente a *E. coli* multirresistente a) 8 horas de exposición y b) 24 horas de exposición

Tabla 7.9.3. Comparación del tiempo de exposición (8 y 24 horas) en la evaluación de la actividad bactericida de nanopartículas de cobre frente a la cepa de *E. coli* multirresistente

Nanopartículas de cobre (mg/ml)	Tiempo de exposición (8 horas)		Tiempo de exposición (24 horas)	
	UFC/ml	Viabilidad celular (%)	UFC/ml	Viabilidad celular (%)
0 (control)	1×10^7	100	1×10^7	100
2.5	3×10^6	30	7×10^4	0.07
5	2×10^6	20	3×10^2	0.003
10	6×10^6	60	5×10^1	0.0005

Para el caso de la cepa multirresistente de *E. coli* ya no se realizó la metodología del goteo, puesto que ya se tenía una referencia clara de la posible interacción que se podía dar entre el material y la bacteria, de modo que se procedió a inocular los 100µl de la solución de bacterias y sembrarlos en toda la caja para ver de forma más específica el crecimiento bacteriano o la disminución en la viabilidad celular.

Tratamiento con NPs de cobre

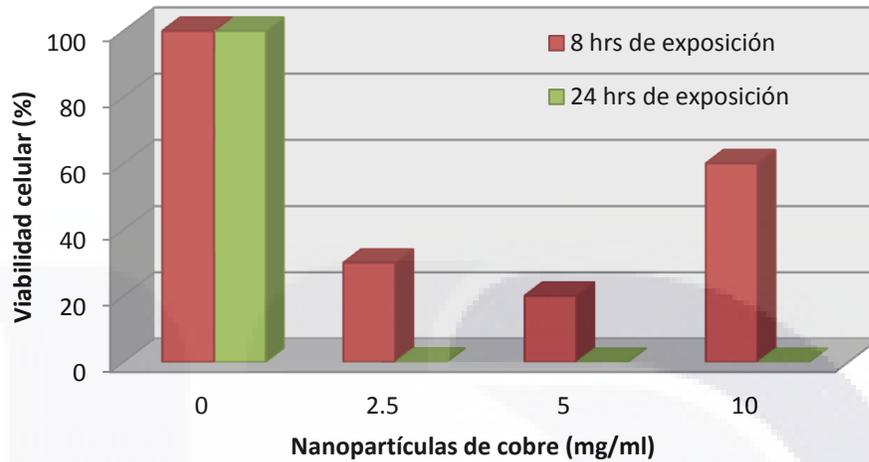


Figura 7.9.6. Gráfica que muestra la influencia del tiempo de exposición (8 y 24 horas) en la evaluación de la actividad bactericida de nanopartículas de cobre-quitosano frente a la cepa de *E. coli* multirresistente.

En el caso de la evaluación de la actividad bactericida de los materiales nanoestructurados de cobre frente a la cepa multirresistente de *E. coli* se encontró que a las 8 horas de exposición, la viabilidad celular de la bacteria disminuye gradualmente en el caso de concentraciones de 2.5mg/ml (30%) y 5mg/ml (20%); no obstante a concentraciones de 10mg/ml se observa un incremento en la viabilidad celular (60%). Cabe destacar que las pruebas se realizaron por triplicado días diferentes y se obtuvieron los mismos resultados, esto puede deberse a que la agitación no fue la adecuada y el material a la concentración más alta sedimentó en las tres replicas, y al no existir un contacto entre la bacteria y las NPs, no se presenta la inhibición deseada. Observando los resultados a las 24 horas de exposición, se encontró una disminución de la viabilidad celular gradual dependiente de la concentración de NPs de cobre, hasta llegar casi a 0% de viabilidad, esto desde la concentración más baja (de 2.5mg/ml). Es importante mencionar que estos resultados fueron obtenidos con la bacteria multirresistente.

Los resultados obtenidos de la exposición de la misma cantidad de bacterias (1×10^8 UFC/ml) frente a las NPs de cobre-quitosano se muestran en las siguientes figuras

y tablas, nótese que nuevamente se observó la sinergia mencionada anteriormente entre el quitosano y las NPs de cobre.

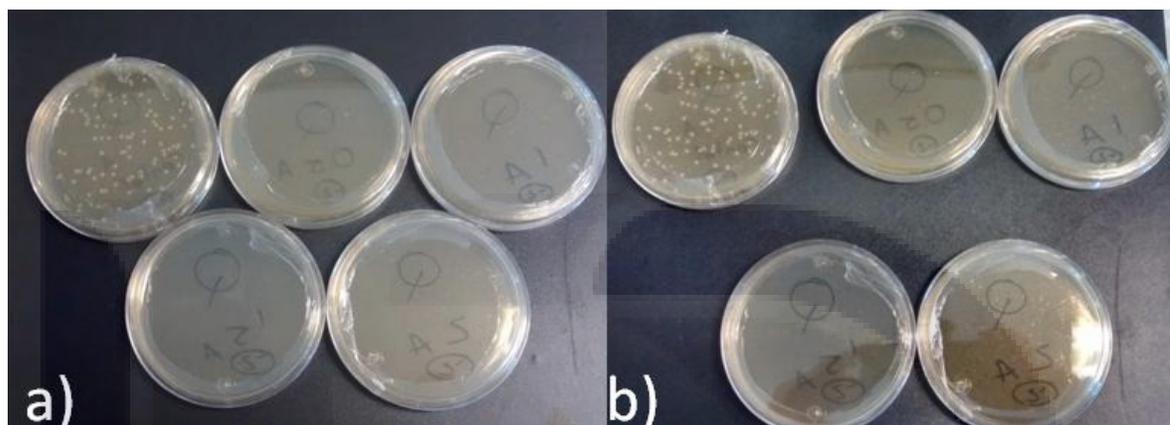


Figura 7.9.7 Comparación del tiempo de exposición en la actividad bactericida de nanomateriales de cobre-quitosano frente a *E. coli* multirresistente. a) 8 horas de exposición y b) 24 horas de exposición

Tabla 7.9.4. Comparación del tiempo de exposición (8 y 24 horas) en la evaluación de la actividad bactericida de nanopartículas de cobre-quitosano frente a la cepa de *E. coli* multirresistente

Nanopartículas de cobre-quitosano (mg/ml)	Tiempo de exposición (8 horas)		Tiempo de exposición (24 horas)	
	UFC/ml	Viabilidad celular (%)	UFC/ml	Viabilidad celular (%)
0 (control)	1×10^7	100	1×10^7	100
0.5	2×10^3	0.02	0	0
1	0	0	0	0
1.5	6	0.00006	0	0
2	6	0.00006	3×10^2	0.02

Los resultados anteriores muestran que, a 8 horas de exposición a 1mg/ml la inhibición es del 100%, es decir, la viabilidad celular es de 0%, pero a 1.5 y 2mg/ml, la viabilidad celular “se incrementa” a 0.00006%, lo cual no es significativo. En cuanto a los resultados después de 24 horas de exposición, se puede observar como desde la concentración más baja (0.5mg/ml) hay una viabilidad celular del 0%, la cual se mantiene hasta los 2mg/ml, donde se incrementa a 0.02%. Si se despreciara este ligero incremento

en la viabilidad celular se puede afirmar que a concentraciones muy bajas, el material es un muy buen agente bactericida, pero si se llega a considerar importante este aumento en la viabilidad celular, se podría decir que el material es bacteriostático y no bactericida. Sin embargo a una concentración de 2.5mg/ml y mayores a ésta, la viabilidad celular es de cero.

Tratamiento con NPs de cobre-quitosano

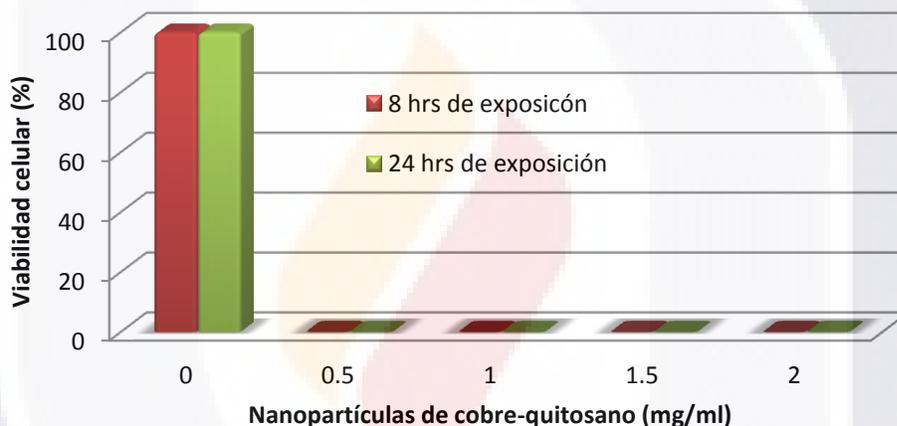


Figura 7.9.8. Gráfica que muestra la influencia del tiempo de exposición (8 y 24 horas) en la evaluación de la actividad bactericida de nanopartículas de cobre-quitosano frente a la cepa de *E coli* multirresistente.

Acorde a los objetivos específicos del proyecto, se procedió a evaluar la actividad bactericida de los nanomateriales sintetizados con bacterias Gram positivas, y el organismo modelo fue el *Staphylococcus aureus* aislado de la planta de tratamiento del hospital de la mujer. Los resultados obtenidos con esta bacteria se muestran a continuación en las siguientes tablas y figuras.

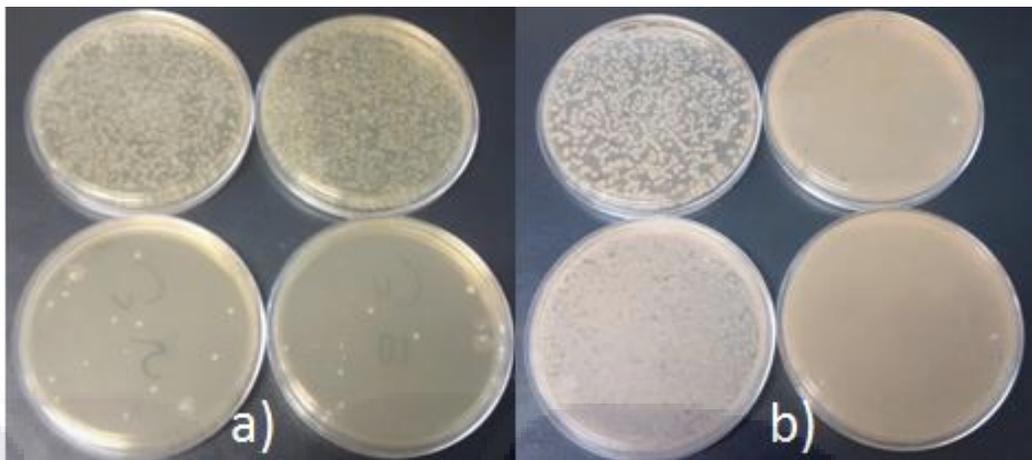


Figura 7.9.9. Comparación del tiempo de exposición de nanopartículas de cobre frente a *S. aureus* a) 8 horas y b) 24 horas

Obsérvese la figura 7.9.9 que muestra la comparación en la viabilidad celular de la cepa de *S. aureus* frente a las nanopartículas de cobre a 8 horas, en la cual se muestra una disminución en la viabilidad celular gradual y dependiente de la concentración de NPs, mientras que a 24 horas de exposición, las bacterias no solo muestran una viabilidad del 100%, sino que además se presentan incontables (incluso mayor que en el control). Con estos resultados se puede decir que las nanopartículas de cobre pudieron haber sedimentado y al no existir una interacción entre el material y la bacteria, no se da lugar a la inhibición, o bien el material es bacteriostático y no bactericida. Abordando lo anterior, pero de una forma numérica, se puede observar en la tabla 7.9.5 como a 8 horas, la viabilidad celular va disminuyendo conforme se incrementa la cantidad de nanopartículas en solución, hasta una viabilidad celular del 0.1%, exceptuando la concentración más alta (10mg/ml), en la cual la viabilidad celular empieza a aumentar (0.4%). A las 24 horas de exposición no fue posible contar las unidades formadoras de colonias (UFC) debido a la formación de una biopelícula en la superficie del agar.

Tabla 7.9.5 Comparación del tiempo de exposición (8 y 24 horas) en la evaluación de la actividad bactericida de nanopartículas de cobre frente *Staphylococcus aureus*.

Nanopartículas de cobre (mg/ml)	Tiempo de exposición (8 horas)		Tiempo de exposición (24 horas)	
	UFC/ml	Viabilidad celular (%)	UFC/ml	Viabilidad celular (%)
0 (control)	1×10^8	100	5×10^5	100
2.5	5×10^6	5	Incontables	100
5	1×10^5	0.1	Incontables	100
10	4×10^5	0.4	1×10^8	100

Tratamiento con nanopartículas de cobre

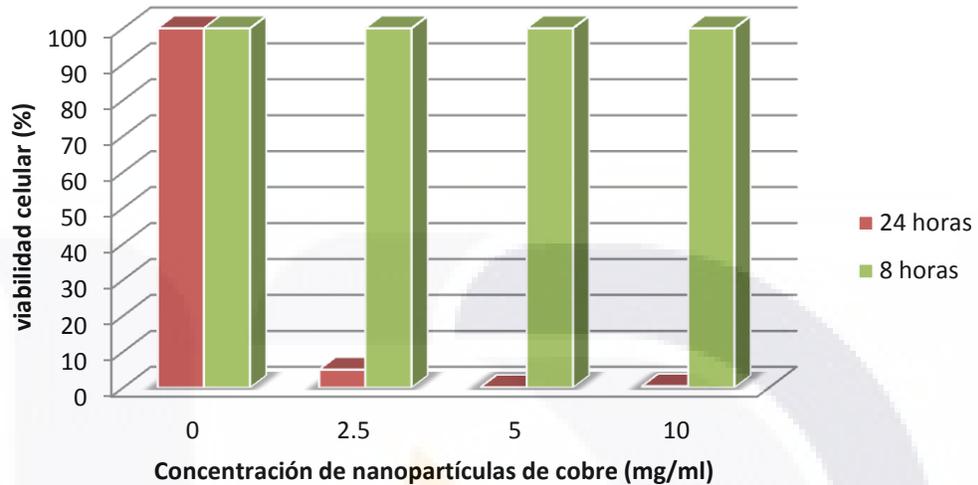


Figura 7.9.10 Gráfica que muestra la comparación en el tiempo de exposición (8 y 24 horas) en la evaluación de la actividad bactericida de las nanopartículas de cobre frente a *Staphylococcus aureus*.

Considerando los resultados anteriores de las nanopartículas de cobre, se trabajó con la evaluación de la actividad bactericida de los materiales de cobre-quitosano en las mismas concentraciones que trabajadas con las nanopartículas de cobre. Lo que se encontró se reporta en las siguientes tablas y figuras.

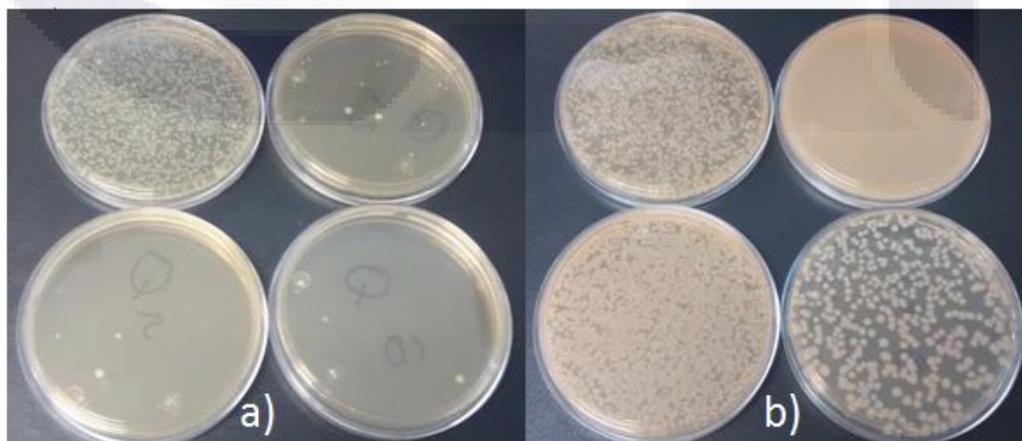


Figura 7.9.11 Comparación del tiempo de exposición en la evaluación de la actividad bactericida de nanopartículas de cobre-quitosano frente a *Staphylococcus aureus* a) 8 horas y b) 24 horas

Tabla 7.9.6 Comparación del tiempo de exposición en la evaluación de la actividad bactericida de los nanomateriales de cobre-quitosano frente a *Staphylococcus aureus*.

Nanopartículas de cobre-quitosano (mg/ml)	Tiempo de exposición (8 horas)		Tiempo de exposición (24 horas)	
	UFC/ml	Viabilidad celular (%)	UFC/ml	Viabilidad celular (%)
0 (control)	1x10 ⁸	100	5x10 ⁷	100
2.5	1 x10 ⁸	100	Incontables	100
5	2 x10 ⁷	20	3x 10 ⁶	6
10	2 x10 ⁵	0.2	1x10 ⁶	2

Para el caso de la evaluación de las nanopartículas de cobre-quitosano, se observó que aunque a las concentraciones de 2.5, 5 y 10mg/ml, no se observó similitud con los resultados reportados para *E. coli*, al menos se lograron contar bacterias, no como en el caso de la evaluación de las NPs de cobre frente a *S. aureus* en el que la concentración de bacterias aumentó en lugar de disminuir. Es importante hacer notar, que a 8 horas de exposición de las bacterias a las NPs de cobre-quitosano, la viabilidad celular disminuyó hasta 0.2% a 10mg/ml, lo cual no se observó para las nanopartículas de cobre, y a 24 horas, se observa una viabilidad celular del 2% a 10mg/ml, por tanto, con estos resultados se puede decir que sí existe una sinergia entre el cobre y el quitosano. Es recomendable trabajar a concentraciones un poco más elevadas del material nanoestructurado para comparar la actividad bactericida del material, o bien trabajar con una menor concentración de *S. aureus*.

En la grafica 7.9.12 se puede observar a 24 horas, un patrón de comportamiento en la viabilidad celular que va disminuyendo conforme se incrementa la concentración de nanopartículas, la viabilidad celular disminuye gradualmente en 5 y 10mg/ml hasta ser casi cero. Por otro lado, a 8 horas de exposición, la viabilidad celular disminuye en 2.5mg/ml, posteriormente se incrementa (en 5mg/ml), y disminuye nuevamente a 10mg/ml hasta llegar a ser menor al 5%.

Tratamiento con nanopartículas de cobre- quitosano

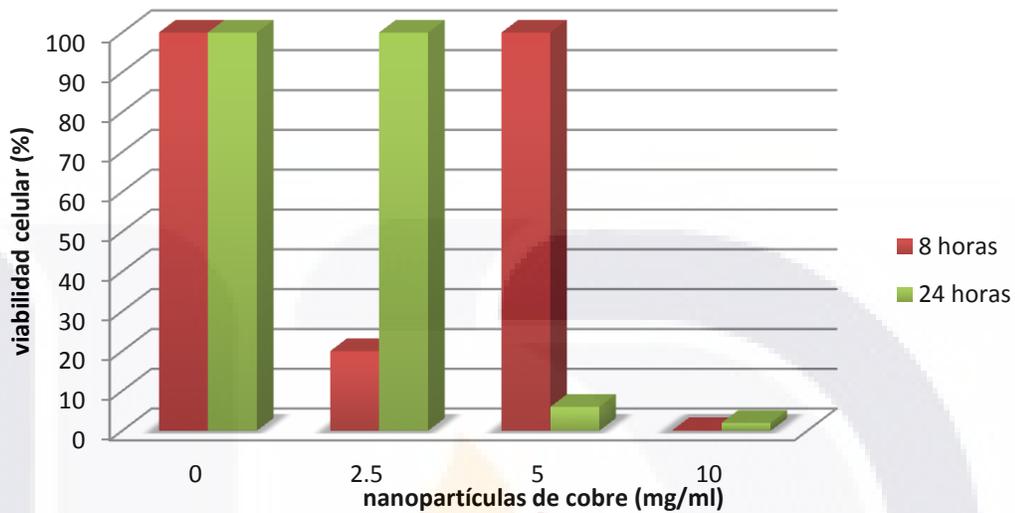


Figura 7.9.12 Gráfica que muestra la comparación del tiempo de exposición (8 y 24 horas) en la evaluación de la actividad bactericida de nanopartículas de cobre-quitosano frente a *Staphylococcus aureus*.

8 DISCUSIONES

Para la elaboración de las nanopartículas de cobre y de cobre-quitosano se eligió una reducción en líquido, la cual pertenece al grupo de síntesis química de nanopartículas, la cual logra una composición química del material homogénea y con menos defectos en el material sintetizado, puesto que se construyen las nanopartículas átomo por átomo (Biswas A., 2012).

La síntesis de nanopartículas de cobre y cobre-quitosano se llevó a cabo por dos rutas sintéticas (convencional y en microondas), además se partió de dos precursores de cobre (nitrato y sulfato cúprico), asimismo se emplearon dos agentes estabilizantes (goma arábica y quitosano). La síntesis realizada consiste básicamente en tres pasos el primero es un calentamiento donde se forma una red del polímero que mantendrá al cobre inmerso en ella, el segundo paso es la reducción del metal, y el tercer paso es otro calentamiento para eliminar el agente reductor y en este paso se añade un agente reductor suave para evitar que al no estar el primer agente reductor, la reacción se revierta (Tolaymat et al., 2010). Dependiendo del agente surfactante, las nanopartículas de cobre pueden presentar tamaños más pequeños o más grandes, aunque el tamaño de estas nanopartículas también puede controlarse con el agente reductor (Habibi, Kamrani, & Mokhtari, 2010).

En la síntesis convencional se observó que era más difícil controlar las variables de reacción principalmente la temperatura, ya que no siempre se podía reproducir la misma velocidad de calentamiento entre un día y otro, aunque el mantenerla fuera relativamente sencillo. Se realizaron síntesis a diferente pH donde se observó que el mejor pH era el neutro y se trabajó al pH del agua desionizada (6.5-6.8). Aparte se trabajó con diferentes temperaturas desde los 50°C hasta los 90°C (tanto en el primer calentamiento como en el segundo), incrementando la temperatura cada 10°C en cada una de las síntesis, se realizaron los dos calentamientos a la misma temperatura y combinándolas, se observó que la mejor temperatura era a 90°C para los dos calentamientos, a diferencia de los 45°C que se reporta como antecedente de nuestro laboratorio en 2012. En cuanto a la síntesis asistida por microondas, se observó que la

velocidad del calentamiento era reproducible, se tenían las variables más controladas y las soluciones eran muy parecidas de una síntesis a otra (situación que no siempre ocurría con la síntesis convencional).

Inicialmente se trataron de usar diferentes agentes estabilizantes como el PVP (polivinil pirrolidona), PVA (alcohol polivinílico), acrilamida, quitosano y goma arábica. La síntesis solo fue exitosa con goma arábica y con quitosano, ninguno de los otros tres agentes estabilizantes (PVP, PVA y acrilamida), son buenas opciones para esta síntesis por las razones mencionadas anteriormente (en el capítulo de los resultados). En cuanto a la síntesis por microondas, fue más fácil controlar la temperatura de calentamiento (como se mencionó anteriormente), además que se optimizó el tiempo de reacción disminuyéndolo de 30 minutos de calentamiento (ruta convencional) a 3 o 10 minutos (usando microondas).

Cuando se encontraron las condiciones óptimas de síntesis, un segundo problema fue la reproducibilidad, lo que se reflejaba en la inestabilidad de las soluciones coloidales ya que de un día al otro las nanopartículas precipitaban. Este problema se resolvió observando las condiciones de síntesis y conjuntando las variables que se lograron estandarizar previamente. Gracias a eso, se obtuvieron soluciones coloidales homogéneas estables aun después de 24 horas a temperatura ambiente.

Una vez sintetizadas las soluciones coloidales de cobre, se procedió a caracterizarlas empleando el espectrofotómetro “Thermo scientific evolution 201 UV-Visible Spectrophotometer”. Se realizó un barrido de 500-700nm para lograr observar el espectro de máxima absorción característico del cobre, el cual según la bibliografía se encuentra aproximadamente en 570nm, lo cual indica que las nanopartículas son metálicas, esféricas y de cobre, a esta longitud, el diámetro de éstas se encuentra entre 2 y 10nm (Saikova, Vorob'ev, Nikolaeva, & Mikhlin, 2010). Esta caracterización muestra que las nanopartículas de cobre partiendo de nitrato cúprico presentan un máximo de absorción de 570 ± 5 nm, sin importar cual fuese el agente estabilizante (goma arábica o quitosano), mientras que las nanopartículas de cobre a partir de sulfato cúprico presentan un máximo de absorción en 570 ± 10 nm, sin importar el agente estabilizante.

Posteriormente se precipitaron las nanopartículas de cobre empleando acetona, luego se calcinaron para asegurar que en los nanopolvos no se encontrara material

orgánico, en especial las nanopartículas que fueron sintetizadas con goma arábica. Las NPs que fueron sintetizadas con quitosano, solo se calentaron a sequedad y éstas no se calcinaron, ya que se pretendía formar un nanocompósito de cobre-quitosano y de esta forma dar lugar a una posible sinergia entre el efecto bactericida del cobre y el efecto bactericida del quitosano. La apariencia de los polvos fue negra para el caso de las nanopartículas de cobre y verdoso para las nanopartículas de cobre-quitosano. Posterior a cada uno de los tratamientos antes mencionados, se lavaron y se analizaron los polvos por medio de un microscopio electrónico de barrido (SEM). El resultado de este análisis muestra que las nanopartículas de cobre presentan forma esférica, que se encuentran aglomeradas, por lo tanto existen dos tamaños de partícula (10nm de la partícula individual y el aglomerado es mayor de 2micras). Por otro lado, en el caso de las nanopartículas de cobre-quitosano, las nanopartículas de cobre se encuentran sobre el quitosano, de igual forma se presentan dos tamaños de partícula (un tamaño de 52nm aproximadamente de la partícula individual y más de 3micras para el aglomerado), la forma es variada, encontrándose esferas y rombos. En el caso de esta caracterización, sería interesante observar los espectros del microscopio para poder observar si se encuentra otro tipo de material presente además del cobre cero. Es importante mencionar que el análisis elemental del material (EDX) no se ha podido realizar, por lo cual no se puede discutir sobre la composición química del material y por ende, no se puede descartar la presencia de óxidos de cobre en el material sintetizado.

El radio hidrodinámico de las nanopartículas secundarias en dispersión, tiene un importante efecto en la respuesta celular por la exposición, por lo tanto, no solo el tamaño primario de las nanopartículas, sino también el tamaño secundario puede ser usado como un parámetro característico para determinar la toxicidad *in vitro* de las nanopartículas en un cultivo celular (Horie, Kato, Fujita, Endoh, & Iwahashi, 2012). Los resultados de la determinación del radio hidrodinámico (llevada a cabo en el instituto de investigaciones científicas de la ciudad de Guanajuato), se pueden observar en la tabla 7.6.1, los cuales son correspondientes al comportamiento que presentan los nanomateriales de cobre en un medio específico (PBS), se procedió a realizar esta prueba en el medio antes mencionado debido a que en este medio fue donde se realizaron los tratamientos a las cepas bacterianas con las diferentes concentraciones de nanopartículas. En la tabla antes mencionada, se puede observar que se realizaron dos mediciones una sonicando las nanopartículas y otra sin sonicarlas, encontrándose que las nanopartículas de cobre sin

sonicar presentan un diámetro promedio de partícula superficial de $3.22\mu\text{m}$ mientras que las partículas sonicadas del mismo material presentan un diámetro de $1.12\mu\text{m}$ lo cual nos revela que el nanoagregado de cobre se desintegra con el sonicado; esto se ve reflejado en el tamaño medio de las nanopartículas. Mientras que el tamaño medio de las NPs de cobre sin sonicar es de $4.83\mu\text{m}$ el de las NPs sonicadas es de $1.59\mu\text{m}$. esto se puede observar comparando las curvas distribución de tamaño del cobre sin sonicar y la del cobre sonicado. Obsérvese en la figura 7.6.1 (curvas de distribución de tamaño en medio PBS), como se presentan algunas alteraciones en su forma debido a que se rompe el agregado de NPs sometiéndolas a ultrasonido. Las nanopartículas de cobre-quitosano, parecen tener el mismo comportamiento que las anteriores. El diámetro promedio de las nanopartículas (cobre-quitosano), sin sonicar es de $122\mu\text{m}$ mientras que el de las nanopartículas de cobre-quitosano sonicado es de $27.8\mu\text{m}$, el tamaño medio de las nanopartículas de cobre-quitosano sin sonicar es de $218\mu\text{m}$, mientras que el de las NPs sonicadas es de $9.79\mu\text{m}$, lo anterior se puede observar en las curvas de distribución de tamaño (figura antes mencionada); la curva de las nanopartículas sin sonicar es un poco más ancha y se observa un deslizamiento de ésta hacia la parte de la derecha, a pesar de esto, no se observa una alteración tan marcada como en el caso de la curva de cobre sonicado.

La toma de muestra del efluente de la planta de tratamiento del hospital de la mujer (ubicado en la ciudad de Aguascalientes), se realizó durante cuatro meses seguidos (una vez al mes), y se aislaron e identificaron tres diferentes bacterias; *E. coli*, *E. agglomerans* y *Staphylococcus aureus*. A estas tres se les realizó un antibiograma para evaluar si presentaban resistencia hacia algún fármaco, lo que se encontró fue que *E. agglomerans* era sensible a todos los medicamentos a los que fue expuesta, (los halos de inhibición fueron comparados con las tablas dadas por el proveedor). Por su parte, *E. coli*, solo presentó resistencia intermedia a dos fármacos, mientras que *Staphylococcus aureus* presentó resistencia a cuatro de ellos y resistencia intermedia a otros dos.

Un laboratorio particular, proporcionó dos cepas de bacterias aisladas de sus pacientes, una Gram positiva (*E. faecalis*) y una Gram negativa (*E. coli*), ambas presentaban multiresistencia. La bacteria *E. faecalis* posee resistencia a gentamicina, ciprofloxacino, levofloxacino, moxifloxacino, clindamicina, eritromicina y tetraciclina, por su parte, la *E. coli* presentó resistencia a la ampicilina, levofloxacina, cefalotina, cefotaxima,

ceftriaxona, cloranfenicol, gentamicina, cefepime, y una resistencia intermedia al trimetoprim-Sulfametoxazol.

Una vez realizadas las pruebas de sensibilidad antimicrobiana, se procedió a evaluar la actividad bactericida de los nanomateriales de cobre, y primeramente se trabajó con la *E. coli* obtenida de la planta de tratamiento, se compararon dos tiempos de exposición al nanomaterial (8 y 24 horas), se encontró que conforme se incrementaba la concentración de NPs de cobre (hasta los 10mg/ml), la viabilidad celular disminuía considerablemente hasta 0.03% y 0.005% en 8 y 24 horas respectivamente, por lo cual el nanomaterial puede ser considerado bactericida. En cuanto a la actividad de las NPs de cobre-quitosano, se logró observar una sinergia de actividad bactericida entre el cobre y el quitosano, de esta forma a concentraciones muy bajas (menores a 2mg/ml) se observa una viabilidad de cero tanto en 8 como en 24 horas, incluso a 0.05mg/ml se observa una viabilidad de 0.01 y 0.03 a 8 y 24 horas respectivamente. Una vez evaluada la actividad bactericida del nanomaterial de cobre en la *E. coli* silvestre de la planta de tratamiento, se procedió a evaluar esta misma actividad pero ahora en la *E. coli* silvestre proporcionada por el laboratorio particular y en este caso se encontró que a 10mg/ml de NPs de cobre y 8 horas de exposición, la viabilidad celular disminuía a 60%, pero con 5mg/ml descendía a 20%, esto puede explicarse por una sedimentación del material que hace que ya no se presente la interacción entre el material y la superficie de la bacteria. Con 24 horas de exposición y 10mg/ml se observa una viabilidad celular de 0.0005% y con 5mg/ml de 0.003, lo cual nos habla de que a mayor concentración de NPs, mayor inhibición de la bacteria se presenta. Las dos cepas bacterianas de *E. coli* silvestre, de diferente origen, se comportaron de manera similar frente al material sintetizado. En cuanto a la actividad de las NPs de cobre-quitosano, se observa la misma sinergia observada anteriormente y a una concentración de 1mg/ml ya no hay crecimiento de bacterias ni a las 8 ni a las 24 horas de exposición. Pero a una concentración de 2mg/ml se observa que las bacterias comienzan a crecer, lo cual puede deberse a que el material es bacteriostático y no tanto bactericida. Aunque algunos estudios sugieren que la acción bactericida de las nanopartículas se ve modificada según el tipo de cadena que se maneja, es decir, según el tipo de *E. coli* que se tiene (Tan & Cheong, 2013).

Lo que se observó en la evaluación de la actividad microbicida de los nanomateriales de cobre, puede explicarse por el contacto directo entre la bacteria y las

NP's de cobre metálico, ya que este es el factor principal en la muerte celular, es decir, el contacto de la bacteria con la NP puede inducir un daño severo en la envoltura celular. Esto puede ser por los procesos superficiales de oxidación, las propiedades de unión del metal, la superficie del metal, su adhesión a la célula y su comportamiento en el medio (Hans et al., 2013).

Se ha propuesto que el quitosano actúa principalmente en la superficie externa de la bacteria. A bajas concentraciones de quitosano (<0.2mg/ml), éste se une a la superficie negativamente cargada de la bacteria causando aglutinación, mientras que a altas concentraciones, el gran número de cargas positivas del quitosano puede darle una carga neta positiva a la superficie de la bacteria alterando la permeabilidad celular. Además el quitosano puede actuar como un agente quelante que selectivamente se une a metales traza y así inhibe la producción de toxinas y el crecimiento bacteriano, lo que también provoca que se activen los procesos de defensa bacterianos, pero gracias a la unión del quitosano con el ADN y a la inhibición de las síntesis ARNm, se ve comprometida la síntesis proteica (Rabea, Badawy, Stevens, Smagghe, & Steurbaut, 2003). La sinergia entre las nanopartículas de cobre y el quitosano, puede deberse a que ambos se ven atraídos por las membranas celulares con carga negativa, y el quitosano altera la permeabilidad celular haciendo que las nanopartículas de cobre penetren fácilmente y ocasionen el daño, es interesante como ambos materiales presentan casi el mismo mecanismo de actividad bactericida, aunque el mecanismo aún no se establece completamente.

Acorde con los objetivos de la investigación se procedió a evaluar la actividad bactericida del nanomaterial sintetizado con una bacteria Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*), se realizó la misma dilución bacteriana, con la misma concentración de bacterias (1×10^7 UFC/ml). Los resultados que se obtuvieron fueron muy diferentes a los obtenidos con las cepas silvestres de *E. coli*. Para *Staphylococcus aureus* el tratamiento con cobre a las 8 horas reportó una viabilidad de 0.4% a 10mg/ml y de 0.1% a 5mg/ml, lo cual puede ser debido a que en esta cepa el nanomaterial puede ser bacteriostático y no bactericida. Para el caso de la exposición a 24 horas con NP's de cobre, ninguna concentración inhibió el crecimiento de esta bacteria. En cuanto al tratamiento con NP's de cobre-quitosano, se observó que a 8 horas de exposición la viabilidad celular disminuye a 0.2% con 10mg/ml, pero con 5 mg/ml la viabilidad se mantiene igual que el control (100%). A las 24 horas se

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

observa como la viabilidad celular disminuye a 2% con 10mg/ml. Se recomienda realizar la prueba pero con una concentración más baja de bacterias para ver si las NPs de cobre y de cobre-quitosano pueden inhibir alguna concentración de bacterias más bajas y observar resultados parecidos a los reportados para *E. coli*.

Una posible explicación de la actividad microbicida de los nanomateriales de cobre es que éstos pueden reaccionar con los componentes de la pared celular que se encuentran cargados negativamente, como el peptidoglicano a través de atracciones electrostáticas. El reciclaje de las reacciones redox entre el Cu^{+2} y Cu^{+1} puede ocurrir en la superficie de la célula bacteriana. Estas reacciones generan H_2O_2 que daña la membrana citoplasmática. La presencia de iones cobre dentro de la bacteria puede alterar los procesos bioquímicos, aunque el mecanismo aún no se sabe exactamente. Se cree generalmente, que la toxicidad es causada por la presencia de iones en solución. Una hipótesis de la presencia de poros en la pared celular después de la exposición a NMs es que los iones Cu^{+2} pueden dañar las proteínas presentes en la envoltura celular y pueden dañar proteínas dentro de la célula. Además de que se pueden unir a las moléculas de ADN y dar lugar a un desorden en la estructura helicoidal por “*cross-linking*” dentro y entre las cadenas de ácidos nucleídos. Las interacciones entre las proteínas y las nanopartículas pueden dar cambios conformacionales en la estructura de la proteína o en su sitio activo, lo que causa la inhibición o neutralización de la actividad biológica de la proteína (Ruparelia et al., 2008).

La evaluación de la actividad bactericida de las NPs de cobre y de cobre-quitosano no se realizó para la otra bacteria facilitada por el laboratorio (*E. faecalis*) debido a que los objetivos del presente se vieron cumplidos con la evaluación de la actividad bactericida en *Staphylococcus aureus* y las dos cepas silvestres de *E. coli*.

El material nanoestructurado de cobre y de cobre-quitosano, sintetizado y propuesto como agente bactericida en el presente trabajo, puede ser una posible sustitución de los desinfectantes químicos, como el cloro, que es comúnmente usado para inactivar microorganismos dañinos en agua para uso potable. Sin embargo, la presencia de algunos compuestos traza en el agua, son conocidos como subproductos de desinfección, tales como trihalometanos (THMs) y ácidos haloacéticos (HAAs), que pueden ser genotóxicos y carcinogénicos (Mukherji, Ruparelia, & Agnihotri, 2012).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

A partir de los resultados obtenidos en el presente proyecto de investigación, se recomienda evaluar la actividad microbica de CuNPs empleando diferentes tiempos de exposición y variando la concentración de células bacterianas. Algunas de las variables que pueden alterar los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad bactericida es el medio empleado ya que las nanopartículas se pueden comportar diferente acorde al medio en el que se encuentran, por ejemplo, se pretendió en un inicio realizar la metodología propuesta por (R. Díaz, 2002) en esta metodología se propone usar caldo Müller-Hinton para la exposición de las bacterias al agente antimicrobiano, sin embargo cuando se pretendió realizar la evaluación siguiendo esta metodología, se observó que las NPs sedimentaban y el medio se volvía turbio mucho antes de las 8 horas de exposición, y el numero de UFC era muy grande (incontable). Por esto, se decidió emplear técnica modificada; la modificación fue que en lugar de usar el caldo Müeller-Hinton se empleó buffer de fosfatos 0.05M a pH7 (PBS), el cual mantuvo vivas a las bacterias pero sin darle los medios necesarios para su reproducción. La desventaja de esta modificación es que todos los tubos al final del tratamiento tienen la apariencia del inicio del tratamiento, la ventaja es que se logra observar una disminución en la viabilidad una vez sembradas las diluciones en las cajas correspondientes. Otra ventaja es que permite que las NPs se mantengan suspendidas por más tiempo en comparación con el caldo, lográndose una suspensión estable de las mismas durante todo el experimento.

Con lo realizado, se pretende dar una base metodológica para la evaluación bactericida de algún otro nanomaterial ya sean NPs de plata o de cobre, aislados o soportados. Así mismo se pretende ofrecer posibles soluciones para el control de la resistencia bacteriana que actualmente se sufre en el panorama actual. Igualmente, este manuscrito da la pauta a continuar con la evaluación ya no solo de la actividad bactericida del material, sino que además evaluar su toxicidad ya sea empleando células humanas (como por ejemplo eritrocitos, midiendo el grado de hemólisis), o bien algunos organismos como rotíferos (ya que algunos sirven como bioindicadores).

CONCLUSIONES

Se optimizaron las condiciones de la síntesis de nanopartículas de cobre por medio de una reducción en líquido, empleando dos precursores diferentes de cobre (CuSO_4 y $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$), dos agentes estabilizantes diferentes (gomo arábigo y quitosano) y bajo dos rutas sintéticas (convencional y microondas), obteniendo soluciones coloidales de nanopartículas de cobre y cobre-quitosano homogéneas y estables.

Se caracterizaron las soluciones coloidales de cobre por espectrofotometría UV-Vis y por SEM. La caracterización por UV-Vis reporta un máximo de absorción en $560 \pm 4\text{nm}$ para la síntesis partiendo de nitrato cúprico y en $570 \pm 4\text{nm}$ partiendo de sulfato cúprico, observando este valor y el espectro de cada una de las síntesis, se puede decir que el mejor precursor es el nitrato cúprico para una síntesis convencional, y el sulfato cúprico para una síntesis asistida por microondas.

Se obtuvieron nanopulvos de cobre y de cobre-quitosano, se procedió a la caracterización de los mismos por SEM, encontrándose que el tamaño de las NPs de cobre es uniforme y oscila en los 10nm, la forma de las nanopartículas es esférica y forma nanoagregados. Las nanopartículas de cobre-quitosano forman nanoaglomerados de 50nm aproximadamente.

Se determinó el radio hidrodinámico que presentan las nanopartículas en PBS, el cual, para las NPs de cobre esta en $3.22\mu\text{m}$ sin sonicar y en $1.12\mu\text{m}$ una vez sonicadas. Mientras que las NPs de cobre-quitosano presentan un tamaño de $122\mu\text{m}$ sin sonicar y de $27.8\mu\text{m}$ una vez sonicadas. Con este tamaño llegan a sedimentar, siempre y cuando la agitación no sea la adecuada.

Se lograron aislar del efluente de la planta de tratamiento del hospital de la mujer tres cepas bacterianas, las cuales se tipificaron por pruebas bioquímicas, las bacterias aisladas son: *E. coli*, *E. agglomerans* y *Staphylococcus aureus*, se evaluó su sensibilidad frente a algunos antibióticos. Se demostró que *E. coli* presentaba resistencia intermedia a cefalotina y a nitrofurantoina, *S. aureus* a ampicilina, dicloxacilina, eritromicina y penicilina, además de resistencia intermedia a cefuroxina y tetraciclina. Por su parte *E. agglomerans*

no presentó resistencia a ningún antibiótico. Se obtuvieron además dos cepas multirresistentes (*E. coli* y *E. faecalis*).

Se logró evaluar la actividad bactericida de los nanomateriales sintetizados frente a las bacterias obtenidas (excepto para *E. faecalis*). Se encontró que los nanomateriales de cobre son eficientes para la eliminación de las dos cepas silvestres de *E. coli* y que existe una sinergia entre el cobre y el quitosano, lo cual se observa con la disminución de la concentración de nanopartículas necesaria para inhibir a las bacterias. Para *Staphylococcus aureus* se observó que las NPs de cobre pueden funcionar más que como bactericida, como un bacteriostático, se recomienda encontrar la concentración a la cual el material se transforma de bacteriostático en bactericida, lo cual se puede lograr o aumentando la concentración de NPs o bien disminuyendo la concentración de bacterias expuestas al NM.

Con base en los resultados obtenidos de la evaluación de la actividad bactericida de las NPs de cobre y de cobre-quitosano, se concluye que la concentración mínima de NPs de cobre en la que se observa un efecto bactericida es de 2.5mg/ml mientras que la mínima concentración de NPs de cobre-quitosano en la que se observa un efecto bactericida es de 0.5mg/ml. La diferencia en estos valores se sustenta en la sinergia entre los dos materiales empleados.

Se comparó la actividad bactericida de los diferentes nanomateriales, y se encontró que ésta depende tanto del tamaño primario y como del secundario, de la forma de las nanopartículas, las características de la superficie del material, la concentración de nanopartículas, el medio utilizado y la concentración de microorganismos empleados en la evaluación de la actividad bactericida.

La metodología realizada, es una propuesta de metodología base para la evaluación de la actividad bactericida de NPs de cualquier naturaleza. Se considera conveniente realizar pruebas toxicológicas del material sintetizado, para con base en esos resultados, ver la posibilidad de implementar estas nanopartículas en el tratamiento de aguas residuales o en la desinfección de superficies.

GLOSARIO:

Coliforme: Con este nombre se designa a un grupo de especies bacterianas que tienen ciertas características bioquímicas en común e importancia relevante como indicadores de contaminación del agua y alimentos con materia fecal.

Contaminante: Cualquier agente físico, químico o biológico ajeno al ambiente, el cual al estar en ciertas condiciones y cantidades puede alterar el equilibrio del ambiente y provocar daños en el mismo.

Concentración mínima bactericida: la menor concentración de un antibiótico que reduce al 0.1% o menos el número de bacterias del inoculo original.

Concentración mínima inhibitoria: es la mínima concentración de antibiótico que inhibe el desarrollo de una bacteria

Gastroenteritis: es una inflamación de la membrana interna del intestino causada por un virus, una bacteria o parásitos. Se disemina a través de alimentos o agua que estén contaminados y el contacto con una persona infectada. La mejor prevención es lavarse las manos frecuentemente.

Giardiasis: es una enfermedad diarreica ocasionada por *Giardia intestinalis* (conocido también como *Giardia lamblia*), parásito microscópico unicelular que vive en el intestino de las personas (duodeno) y se transmite en las heces de una persona o animal infectado, por agua contaminada con éste microorganismo, comer frutas y verduras no lavadas de forma adecuada, aunque también es considerada como una enfermedad de transmisión sexual por el factor de riesgo en el sexo anal sin protección.

Macrólidos: son un grupo de antibióticos muy relacionados entre sí que se caracterizan por tener un anillo macrocíclico de lactona con 14 a 16 miembros, el macrólido más utilizado, es la eritromicina. La claritromicina y la azitromicina son derivados sintéticos de la eritromicina.

Meningoencefalitis: se define como la inflamación de las meninges y el encéfalo, cuya etiología es variable, en la que predominan los agentes infecciosos. Las causas más comunes de la meningoencefalitis aguda son las infecciones bacterianas y virales que ocupan en conjunto, alrededor del 90% de los casos.

Nanomaterial: es un material que cuenta con al menos una de sus dimensiones externas o estructuras internas en la escala nanométrica y que posiblemente tenga características diferentes a las del mismo material a escala convencional.

Infección nosocomial: también conocida como infección intrahospitalaria, acorde con la organización mundial de la salud (OMS), estarían incluidas las infecciones que no se habían manifestado en el paciente al entrar al hospital, ni estaban en periodo de incubación, es decir, que se adquieren durante su estancia y no son la causa del ingreso.

Nanopartícula: es una partícula que tiene sus tres dimensiones en un tamaño menor de 100 nm. Actualmente las nanopartículas son un área de intensa investigación científica, debido a una amplia variedad de aplicaciones potenciales en el área biomédica, óptica, y electrónica.

Plásmido: son moléculas circulares de ADN que se replican de manera independiente al cromosoma de la célula hospedera. De manera natural se encuentran en las bacterias en tamaños que van desde 5,000 hasta 400,000 pares de bases

Viabilidad bacteriana: es la capacidad de un microbio para sobrevivir después de determinadas condiciones. También puede relacionarse con la capacidad de replicación de una colonia.

BIBLIOGRAFIA

- A. Pumarola, A. R. (1997). Microbiología y parasitología médica. Madrid: SALVAT.
- Alberto Delgado-Iribarren, A. P. (2001). Manual de Laboratorio Clínico Básico. Microbiología. Colombia: Mc Graw Hill.
- Alsawafta, M., Badilescu, S., Packirisamy, M., & Truong, V.-V. (2011). Kinetics at the nanoscale: formation and aqueous oxidation of copper nanoparticles. *Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis*, 104(2), 437–450. doi:10.1007/s11144-011-0352-x
- Arora, S., Rajwade, J. M., & Paknikar, K. M. (2012). Nanotoxicology and in vitro studies: the need of the hour. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 258(2), 151–65. doi:10.1016/j.taap.2011.11.010
- Blosi, M., Albonetti, S., Dondi, M., Martelli, C., & Baldi, G. (2010). Microwave-assisted polyol synthesis of Cu nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, 13(1), 127–138. doi:10.1007/s11051-010-0010-7
- Calidad, H. P. D. E., Que, Y. T. A., Someterse, D., & Agua, E. L. (1994). NOM.
- Chatterjee, A. K., Sarkar, R. K., Chattopadhyay, A. P., Aich, P., Chakraborty, R., & Basu, T. (2012). A simple robust method for synthesis of metallic copper nanoparticles of high antibacterial potency against *E. coli*. *Nanotechnology*, 23(8), 085103. doi:10.1088/0957-4484/23/8/085103
- Deng, D., Jin, Y., Cheng, Y., Qi, T., & Xiao, F. (2013). Copper nanoparticles: aqueous phase synthesis and conductive films fabrication at low sintering temperature. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 5(9), 3839–46. doi:10.1021/am400480k
- Ferreira, a. J., Cemlyn-Jones, J., & Robalo Cordeiro, C. (2013). Nanoparticles, nanotechnology and pulmonary nanotoxicology. *Revista Portuguesa de Pneumologia (English Edition)*, 19(1), 28–37. doi:10.1016/j.rppnen.2013.01.004
- Fin, T., & Mart, G. (n.d.). Fabricación de Nanoplateformas Multifuncionales para su Aplicación en nanomedicina: Agentes de Contraste en Imagen Molecular , Hipertermia Magnética y Liberación de Fármacos . Resumen.
- Frejo, M^a., Díaz, M^a., Lobo, M., García, J., & Capó, M. (2011). Nanotoxicología ambiental : retos actuales, 26(2).
- Giannousi, K., Lafazanis, K., Arvanitidis, J., Pantazaki, a, & Dendrinou-Samara, C. (2014). Hydrothermal synthesis of copper based nanoparticles: antimicrobial screening and

interaction with DNA. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 133, 24–32. doi:10.1016/j.jinorgbio.2013.12.009

Habibi, M. H., Kamrani, R., & Mokhtari, R. (2010). Fabrication and characterization of copper nanoparticles using thermal reduction: The effect of nonionic surfactants on size and yield of nanoparticles. *Microchimica Acta*, 171(1-2), 91–95. doi:10.1007/s00604-010-0413-2

Hans, M., Erbe, A., Mathews, S., Chen, Y., Solioz, M., & Mücklich, F. (2013). Role of copper oxides in contact killing of bacteria. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 29(52), 16160–6. doi:10.1021/la404091z

Horie, M., Kato, H., Fujita, K., Endoh, S., & Iwahashi, H. (2012). In vitro evaluation of cellular response induced by manufactured nanoparticles. *Chemical Research in Toxicology*, 25(3), 605–19. doi:10.1021/tx200470e

Hutchison, J. E. (2008). Greener nanoscience: a proactive approach to advancing applications and reducing implications of nanotechnology. *ACS Nano*, 2(3), 395–402. doi:10.1021/nn800131j

Mukherji, S., Ruparelia, J., & Agnihotri, S. (2012). Nano-Antimicrobials, 225–251. doi:10.1007/978-3-642-24428-5

Nom--semarnat-, N. O. M., Establece, Q. U. E., & Máximos, L. O. S. L. (2003). NATURALES.

Ochoa-Herrera, V., León, G., Banihani, Q., Field, J. a., & Sierra-Alvarez, R. (2011). Toxicity of copper(II) ions to microorganisms in biological wastewater treatment systems. *The Science of the Total Environment*, 412-413, 380–5. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.09.072

Pramanik, A., Laha, D., Bhattacharya, D., Pramanik, P., & Karmakar, P. (2012). A novel study of antibacterial activity of copper iodide nanoparticle mediated by DNA and membrane damage. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 96, 50–5. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.03.021

Rabea, E. I., Badawy, M. E.-T., Stevens, C. V, Smagghe, G., & Steurbaut, W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 4(6), 1457–65. doi:10.1021/bm034130m

Rispoli, F., Angelov, A., Badia, D., Kumar, A., Seal, S., & Shah, V. (2010). Understanding the toxicity of aggregated zero valent copper nanoparticles against *Escherichia coli*. *Journal of Hazardous Materials*, 180(1-3), 212–6. doi:10.1016/j.jhazmat.2010.04.016

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), 707–16. doi:10.1016/j.actbio.2007.11.006

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Saikova, S. V., Vorob'ev, S. a., Nikolaeva, R. B., & Mikhlin, Y. L. (2010). Conditions for the formation of copper nanoparticles by reduction of copper(II) ions with hydrazine hydrate solutions. *Russian Journal of General Chemistry*, 80(6), 1122–1127. doi:10.1134/S1070363210060149
- Tan, K. S., & Cheong, K. Y. (2013). Advances of Ag, Cu, and Ag–Cu alloy nanoparticles synthesized via chemical reduction route. *Journal of Nanoparticle Research*, 15(4), 1537. doi:10.1007/s11051-013-1537-1
- Tolaymat, T. M., El Badawy, A. M., Genaidy, A., Scheckel, K. G., Luxton, T. P., & Suidan, M. (2010). An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and applications: a systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers. *The Science of the Total Environment*, 408(5), 999–1006. doi:10.1016/j.scitotenv.2009.11.003
- Valodkar, M., Rathore, P. S., Jadeja, R. N., Thounaojam, M., Devkar, R. V., & Thakore, S. (2012). Cytotoxicity evaluation and antimicrobial studies of starch capped water soluble copper nanoparticles. *Journal of Hazardous Materials*, 201-202, 244–9. doi:10.1016/j.jhazmat.2011.11.077
- Yu, W., Xie, H., Chen, L., Li, Y., & Zhang, C. (2009). Synthesis and Characterization of Monodispersed Copper Colloids in Polar Solvents. *Nanoscale Research Letters*, 4(5), 465–470. doi:10.1007/s11671-009-9264-3
- Zeta-Meter, I. (1993). Coagulation & Flocculation.
- Zhang R, K. A. (2011). Nucleation and Growth of Nanoparticles in the Atmosphere . Chemical reviews .