



# BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

**“Aplicación de nanopartículas de óxido de zinc  
en la inhibición de *E. coli* (DH5 $\alpha$ )”**

**Noviembre 2024**

TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL GRADO DE

**LICENCIATURA EN INGENIERÍA QUÍMICA**

PRESENTA

**C. PERLA ITZEL ROJAS TORRES**

**201921460**

DIRECTOR DE TESIS

**DR. JOSÉ ALBERTO ALVARADO GARCÍA**

**NOVIEMBRE 2024**



## DEDICATORIA

A mi mamá, Rocío Cruz Torres Jiménez mi mayor ejemplo y mi más grande admiración. Gracias por creer en mí incluso cuando yo dudaba, por tus palabras de aliento, por tus consejos y por tu paciencia. Este logro también es tuyo, porque detrás de cada uno de mis pasos ha estado tu amor guiándome y dándome fuerzas para seguir adelante.

A mi papá, gracias por tu apoyo constante, por tus consejos y por enseñarme el valor del trabajo, la responsabilidad y honestidad.

A mis padres, quienes, a pesar de provenir de familias con valores tradicionales que desalentaban la educación de las mujeres, confiaron en mí y me brindaron las oportunidades y herramientas necesarias para alcanzar este objetivo. Su confianza rompió barreras y me enseñó que los sueños no tienen género, solo determinación y amor.

A mi hermana Mireya, por su apoyo incondicional, sus palabras y consejos siempre estuvieron presentes, por ser una segunda mamá para mí.

A mi hermano Francisco porque a pesar de no habernos conocido personalmente ha estado siempre a mi lado, brindándome su apoyo sin condiciones.

A mi hermano Jesús por motivarme a dar siempre lo mejor de mí y a ser más. Por tu apoyo incondicional pude alcanzar este logro.

A mi tío Tobías por alentarme a lograr mis objetivos, jamás olvidaré los dos caminos que tenía, bueno creo que está claro que elegí el segundo.

A mi primo Eli por enseñarme un poco de la vida, el trabajo y todas esas cosas de las que se preocupa un adulto.

A Eloy, mi compañero en gran parte de este viaje. Gracias por tu apoyo incondicional, por ser mi hombro y mi refugio en los momentos difíciles, por tu paciencia, tu fortaleza y, sobre todo, por tu amor.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quiero agradecer a la máxima casa de estudios, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, la cual me brindó la oportunidad y herramientas para desarrollarme académicamente desde el 2016 cuando ingrese a la Preparatoria Regional Simón Bolívar en Atlixco y posteriormente en 2019 cobijarme en la Facultad de Ingeniería Química en la ciudad de Puebla.

A mi querida facultad en donde pase momentos tan agradables que recordaré siempre con cariño, así como algunos otros momentos difíciles. A los maestros, doctores e ingenieros que compartieron conmigo sus enseñanzas, conocimientos y experiencia. Me sentiré siempre orgullosa de haber pertenecido a la FIQ y llevaré con mucho orgullo a donde la vida me coloque.

A mi director de tesis el Dr. José Alberto Alvarado García por su valiosa orientación, paciencia y dedicación durante el desarrollo de esta tesis. Su experiencia, consejos y exigencia académica fueron fundamentales para lograr este trabajo. Más allá de su papel como director, quiero agradecerle profundamente por su amistad, por las conversaciones enriquecedoras y por el apoyo constante que me brindó en los momentos más difíciles. Su ejemplo profesional y humano ha dejado una huella imborrable en mi vida, y siempre llevaré conmigo las enseñanzas y la inspiración que me ha brindado.

A la Dra. Sandra Reyes Carmona por su invaluable guía y dedicación durante el desarrollo experimental de esta tesis. Su conocimiento, paciencia y atención a los detalles fueron fundamentales para llevar a cabo cada etapa del trabajo en laboratorio. Valoro sinceramente su apoyo, su comprensión y su disposición constante por orientarme y animarme cuando las dificultades parecían mayores. Gracias por su confianza y por haber sido una guía tan cercana y generosa en este proceso.

A mis sinodales Mtra. Tania Meza Gaspar y Mtra. Mayté Juárez Meneses por tomarse parte de su invaluable tiempo para revisar mi trabajo, por su comprensión, apoyo y observaciones.

A IDESA por haberme abierto las puertas y brindarme la oportunidad de realizar mis prácticas profesionales en sus instalaciones. Esta experiencia significó un valioso espacio de aprendizaje y crecimiento, tanto profesional como personal. Gracias al Ing. Miguel, Ing. Ericka, Ing. Alicia, Ing. Esteban, a los laboratoristas: Lalo, Chicho, Rupert, Rigo, Martin, Blas y Filo por enseñarme a creer en mí y saber que soy tan capaz de hacer lo que deseo, con trabajo y pasión. Durante mi estancia tuve la fortuna de aprender de un equipo comprometido y generoso, que siempre estuvo dispuesto a compartir su conocimiento y experiencia.

A mis amigos: Anahí, Brian, Iván, Fer, Joel, Luis, Noe, Pablo y Silvino. Gracias por acompañarme en este camino, por estar presentes tanto en los momentos de cansancio como en las celebraciones, por las risas, las anécdotas y los recuerdos que hicieron de esta etapa algo mucho más llevadero. Con ustedes, mi vida universitaria se convirtió en una verdadera aventura llena de historias que siempre recordaré. Con ustedes reí, lloré y celebré; y por eso esta experiencia no solo me deja un título, sino también amistades que atesoro profundamente.

A todas las personas que, de una u otra manera, me acompañaron y apoyaron a lo largo de mi etapa universitaria. Gracias por su paciencia, sus palabras de aliento, sus consejos y por compartir conmigo momentos que hicieron más llevadero y enriquecedor este camino. Me siento profundamente agradecida por haber contado con personas tan generosas y cercanas durante estos años.

# CONTENIDO

Planteamiento del problema .....	8
Justificación .....	9
Hipótesis .....	9
Objetivos .....	9
<i>Objetivo general</i> .....	9
<i>Objetivos específicos</i> .....	10
Introducción .....	10
Capítulo 1: Antecedentes .....	14
1.1 <i>El descubrimiento de la célula</i> .....	14
1.2 <i>Propiedades de las células</i> .....	16
1.3 <i>Tipos de células</i> .....	18
1.4 <i>Los microorganismos</i> .....	21
1.5 <i>¿Qué son las bacterias?</i> .....	23
1.6 <i>Generalidades de la interacción de patógenos con el organismo</i> .....	26
1.7 <i>Bacterias de la familia E. Coli</i> .....	27
1.8 <i>Clasificación particular de las cepas E. coli</i> .....	29
1.9 <i>Generalidades de la E. coli en diversos países en brotes y análisis de muestras.</i> ...	32
1.10 <i>Uso de antibióticos en la inhibición de microorganismos patógenos</i> .....	34
1.11 <i>Métodos de medición de la actividad antimicrobiana</i> .....	35
1.12 <i>La gentamicina y su papel en el tratamiento de enfermedades provocadas por patógenos</i> .....	37
1.13 <i>La resistencia a los antimicrobianos (RAM) y nuevas alternativas de inhibición</i> .....	38
1.13.1 <i>Los nanomateriales y su papel como inhibidores de la actividad bacteriana</i> .....	40
1.14 <i>Algunos nanomateriales y su uso como inhibidores del crecimiento de microorganismos</i> .....	41
1.15 <i>El óxido de zinc</i> .....	43
1.16 <i>Generalidades de las nanopartículas de óxido de zinc</i> .....	44
1.17 <i>Métodos de síntesis de nanopartículas de ZnO</i> .....	46
1.18 <i>Aplicaciones de las nanopartículas de ZnO</i> .....	48
1.19 <i>Bioseguridad de las nanopartículas de ZnO</i> .....	52
Capítulo 2: Métodos de caracterización.....	53
2.1 <i>Caracterización de nanopartículas de ZnO</i> .....	53
2.1.1 <i>Caracterización estructural por Difracción de rayos X (DRX)</i> .....	53

2.1.2 Microscopia de barrido de alta resolución (HRSEM).....	56
2.1.3 Fotoluminiscencia.....	59
2.2 Caracterización de la inhibición bacteriana.....	59
2.2.1 Difusión en disco.....	60
2.2.2 Siembra (inoculación) en medios líquidos (tubo).....	61
2.2.3 Siembra por diseminación en superficie (inoculación en medios solidos).....	62
Capítulo 3: Desarrollo experimental.....	64
Procedimiento para esterilizar.....	65
Procedimiento para medir pH.....	65
Proceso de preparación del caldo de cultivo.....	66
Procedimiento detallado del cultivo de bacterias.....	67
Propuestas de ensayos y proceso de optimización de los experimentos de inhibición. .	67
Experimento 1: Cajas Petri y círculos de papel filtro con 15 µg/mL de Np.....	67
Experimento 2: Tubos de ensayo con 5 mL de medio Lb y Np en solución a 10 µg/mL.	69
Experimento 3: Tubos de ensayo con 5 mL de medio Lb y Np en solución a 15 µg/mL.	70
Experimento 4: Tubos de ensayo con 5 mL de medio Lb y Np en solución a 15 µg/mL.	71
Capítulo 4: Resultados y discusión.....	74
4.1 Caracterización de las Nps de ZnO.....	74
4.1.1Caracterización estructural por difracción de rayos X (DRX).....	74
4.1.2Caracterización morfológica por microscopia de barrido de alta resolución (HRSEM).....	76
4.1.3 Caracterización óptica por fotoluminiscencia (FL).....	78
4.2 Inhibición bacteriana.....	80
4.2.1 Experimento 1 (difusión en disco).....	81
4.2.2 Experimento 2 (turbidez): Tubos de ensayo con Lb y Np en solución a 10 µg/mL. .....	86
4.2.3 Experimento 3: Tubos de ensayo con Lb y Np en solución a 15 µg/mL.....	89
4.2.4 Experimento 4a: Tubos de ensayo con Lb y Np en solución a 15 µg/mL (incubación post-turbidez) con corrección de concentración de Nps. ....	90
4.2.5 Experimento 4b: Tubos de ensayo con Lb y Np en solución a 15 µg/mL.....	95
4.2.6 Experimento 4c: Tubos de ensayo con Lb y Np en solución a 15 µg/mL.....	101
4.2.7 Experimento 4d: Tubos de ensayo con Lb y Np en solución a 15 µg/mL.....	106
Capítulo 5: Conclusiones.....	111
Anexos.....	113
Bibliografía.....	116

## Planteamiento del problema

En los últimos años, la resistencia bacteriana a los antibióticos ha aumentado significativamente, representando un desafío crítico para la salud pública y la seguridad alimentaria. *Escherichia coli* es una de las bacterias más comunes y puede causar infecciones en humanos, además de contaminar alimentos y fuentes de agua. Por ello, es necesario desarrollar nuevas estrategias antimicrobianas que sean eficaces y seguras. En la actualidad la resistencia antimicrobiana a los antibióticos ha ido al alza gracias al uso indiscriminado de estos. La resistencia a los antimicrobianos va en aumento y actualmente es responsable de más de 700,000 muertes al año en todo el mundo según un informe del banco mundial de 2017, según informes de la OMS se estima que 300 mil personas morirán prematuramente a causa de infecciones por organismos multirresistentes en los próximos 35 años. *E. coli* es el principal actor patógeno que provoca infecciones de tracto urinario, del torrente sanguíneo, heridas, otitis media y de otras complicaciones en los seres humanos.

Entre las estrategias emergentes, los investigadores se han enfocado en el desarrollo de una nueva generación de antibióticos, lo que implica tiempo, esfuerzo y dinero. Hoy en día existen muchos métodos alternativos entre ellos destaca la nanotecnología, a través de la extracción de nuevos agentes antibacterianos a partir de productos naturales o la reutilización e ingeniería de algunos fármacos o productos químicos seguros y aprobados por la FDA. Las nanopartículas de ZnO destacan por tener una alta toxicidad específica contra microorganismos, debido a su morfología y tamaño. Por ello, esta investigación se ha centrado en la inhibición de *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) con nanopartículas de ZnO.

## **Justificación**

Las nanopartículas de óxido de zinc (ZnO) han demostrado tener propiedades antimicrobianas prometedoras, pero aún es necesario estudiar su eficacia específica contra *E. coli*, así como las condiciones óptimas para su aplicación. Este estudio contribuirá al conocimiento sobre el uso de ZnO en la inhibición bacteriana, lo que podría favorecer el desarrollo de nuevos desinfectantes, recubrimientos antimicrobianos y tratamientos para aguas contaminadas.

Los resultados de esta investigación podrán beneficiar a la comunidad científica, al sector salud y a la industria alimentaria, proporcionando una alternativa innovadora y sostenible para el control de bacterias patógenas.

Dado que el estudio es viable con los recursos de laboratorio disponibles y se basa en metodologías probadas, su desarrollo permitirá obtener datos confiables que respalden futuras aplicaciones de las nanopartículas de ZnO en la lucha contra bacterias resistentes.

## **Hipótesis**

A través del uso de las nanopartículas de ZnO sintetizadas por síntesis coloidal y a sus características estructurales, tamaño y morfología se inhibirá de manera eficiente el crecimiento de bacterias de la familia *E. coli*.

## **Objetivos**

### *Objetivo general*

Replicar y aplicar las nanopartículas coloidales de ZnO obtenidas a diferentes concentraciones, en la inhibición de crecimiento de microorganismos biológicos de la familia *E. coli* (*DH5α*).

### *Objetivos específicos*

- Replicar y caracterizar estructural, morfológica y ópticamente las NP obtenidas a diferentes concentraciones del precursor de Zn a través de difracción de rayos X (DRX), por microscopia de barrido de alta resolución (HRSEM) y fotoluminiscencia (FL).
- Aplicar y optimizar el uso del ZnO a diferentes concentraciones en la inhibición del crecimiento de *E. coli* (*DH5α*).
- Correlacionar los resultados eficiencia de inhibición con las concentraciones de síntesis y respecto a las propiedades estructurales, morfológicas y ópticas de las nanopartículas de ZnO.

### **Introducción**

Desde la aparición del ser humano moderno, desde la época en que este era nómada hasta pasar a ser sedentario, se ha enfrentado a grandes cambios evolutivos esto debido a la movilidad y a la interacción con diversos ambientes. Con ello ha generado una estrecha relación no solo con macroorganismos (animales de gran tamaño), sino que también a la par le ha tocado interaccionar con microorganismos (virus, hongos y bacterias). Algunas de las interacciones dadas con microorganismos, ha dado como resultado una simbiosis, pero también en la posibilidad de poder tomar como huésped al ser humano infectando y con ello ha provocado en diversos periodos geológicos una serie de pandemias que en algún momento han logrado casi exterminar al ser humano por completo.

Algunos de estos microorganismos que día a día han estado coexistiendo con el ser humano desde tiempos prehistóricos son las bacterias, que pueden definirse como organismos unicelulares que poseen vida libre y que se reproducen por fisión binaria, estas son células procariotas que de acuerdo con su morfología dividen en cocos, bacilos y espiraladas. Dentro de las bacterias encontramos una gran diversidad como lo es

*Salmonella spp*, *Shigella spp*, *Brucella spp*, *Neisseria spp* y *Escherichia coli*, por mencionar algunos.

La familia de la *Escherichia coli* es un bacilo Gram positivo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriácea, tribu *Escherichia*. Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea, dentro de las cepas patógenas podemos encontrar enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica también conocidas como productoras de toxina Vero o toxina semejante a Shiga (EHEC o VTEC o STEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógeno (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y adherencia difusa (DAEC). [1]

Como ya se mencionó la *Escherichia coli* es un habitante común del intestino humano y animal, pero también se puede encontrar en el agua, el suelo y la vegetación. Este microorganismo, es el principal actor patógeno que provoca infecciones de tracto urinario, del torrente sanguíneo, heridas, otitis media y de otras complicaciones en los seres humanos. A parte de ser un agente infeccioso esta bacteria es la causa más común de diarrea humana transmitida por alimentos y agua en todo el mundo, cabe mencionar que en los países en vías de desarrollo es la causa de muchas muertes en niños menores de 5 años. [2] Dichas muertes han sido provocadas por la infección a través de esa bacteria, aunado a ello a la falta de atención médica y/o por el uso indiscriminado de antibióticos (automedicación).

A través de la automedicación se ha visto en los últimos años un aumento de la resistencia bacteriana a los antibióticos complicando con ello en el tratamiento de las infecciones provocadas por ellos. Del total de las infecciones reportadas clínicamente, hasta el 95% de los casos con síntomas graves se tratan sin investigación bacteriológica. [2] Provocando con ello el uso extensivo de antibióticos tanto en el sector médico como en el agrícola para curar y prevenir infecciones bacterianas esto dando como resultado un aumento de la resistencia antimicrobiana global (RAM) y la reducción de la eficacia de los antibióticos que hoy se encuentran en el mercado farmacológico. [3]

Aunado a ello otra gran fracción de la ineffectividad de dichos antibióticos es la resistencia adquirida la cual es provocada por la adquisición de genes de resistencia a los antibióticos (ARG). Esta situación es de particular importancia ya que se da debido a la movilidad y transmisibilidad de la dicha resistencia adquirida entre células bacterianas de la misma familia o incluso la transmisión entre especies (animales y humanos), lo que a su vez conduce a la rápida evolución (mutación) de patógenos lo cual los vuelve más resistentes a múltiples fármacos. Esto se hace comúnmente mediante la transferencia de ARG transportados por elementos genéticos móviles (MGEs), como plásmidos, elementos integrativos y conjugativos (ICEs) e integrones. Estos MGE se diseminan intercelularmente mediante conjugación, transformación natural o transducción, procesos denominados colectivamente como transferencia genética horizontal o lateral (HGT) por sus siglas en inglés. Entre los tres procesos, se considera que la conjugación es la más importante y representa la mayoría de los eventos HGT. [3]

De investigaciones realizadas a las personas, no sólo se han encontrado altas concentraciones de antibióticos durante las terapias con medicamentos, sino que también reciben niveles bajos o trazas de antibióticos del medio ambiente como consecuencia de la contaminación generalizada por medicamentos. En estos escenarios, los antibióticos pueden desempeñar un papel como un factor estresante que otorga a las bacterias resistentes una ventaja selectiva, lo que conduce a mejores tasas de supervivencia de las bacterias haciéndose más resistentes, las cuales albergan genes que son responsables de la RAM, lo que a su vez conduce a niveles más altos de transferencia vertical de genes (VGT). Los cuales también pueden desempeñar el papel como una sustancia que regula positivamente los mecanismos de transferencia horizontal, lo que lleva a tasas más altas de HGT para los genes responsables de la resistencia a los microorganismos a nivel intercelular. En otras palabras, los antibióticos pueden promover tanto la VGT como la HGT, aunque a través de diferentes, usos, mecanismos, condiciones y posiblemente a diferentes concentraciones de antibióticos. [3]

Se ha observado a través de la historia de la humanidad que las infecciones bacterianas habían sido una de las principales causas de muerte humana antes del descubrimiento de los antibióticos, el cual fue uno de los momentos clave de la ciencia y la medicina

modernas. Desde entonces, los antibióticos han sido uno de los medicamentos más importantes en todos los sectores médicos. Pero el uso indiscriminado de ellos es la razón por la cual el desarrollo e incremento de la resistencia a los antimicrobianos en bacterias ha sido una preocupación tan grave en todo el mundo. [3]

Las nanopartículas tienen la capacidad de adentrarse a múltiples bacterias e impedir su crecimiento. [4] Las nanopartículas de  $Ag_2$  al entrar en contacto con las bacterias, destruyen su ADN e impiden su reproducción, pues el número de células dañadas es igual al número de células reproducidas, por tanto, muestran inhibición bacteriana. [5] Tenemos también a las nanopartículas de óxido de hierro que además de inhibir a las bacterias tiene propiedades magnéticas, alta absorción y bioactividad. La nano alúmina y el nano óxido de titanio también son un ejemplo de nanopartículas que inhiben a las bacterias. En general se sabe que las nanopartículas en general atacan a las bacterias por la generación de inestabilidad en las moléculas de las bacterias (ROS) provocando la muerte celular. [6] Se tiene conocimiento que entre más pequeñas sean las nanopartículas tienen una actividad bacteriana más eficaz, aunque dicha efectividad también se ve afectada por otros factores estructurales o químicos. A lo largo de los años se ha encontrado que las nanopartículas de ZnO muestran una mayor actividad antibacteriana entre todas las demás gracias a su morfología, tamaño, orientación, vacancia de oxígeno y demás características. [7]

## Capítulo 1: Antecedentes

En 1800 es cuando se introduce por primera vez el vocablo “biología”, que aparece en una oscura publicación alemana en donde explican el estudio del hombre desde el punto de vista morfológico, fisiológico y psicológico, un par de años más tarde en 1802 es nuevamente retomado ahora por el médico y naturista alemán Gottfried R. Treviranus, ahora con un enfoque más cercano a la actualidad. Treviranus define a la biología como aquella ciencia cuyo objeto de estudio tiene relación con los diferentes fenómenos y las diversas formas de vida, las condiciones, las leyes bajo las que ocurren y las causas que la producen. [8]

Para comprender un poco acerca de la microbiología es necesario familiarizarnos con conceptos básicos es por ello que comenzaremos, desde la definición de una célula, la cual es la unidad más pequeña que puede vivir por sí sola, que de acuerdo con Gerald Karp las estructuras que componen a una célula, son demasiado pequeñas para verlas a simple vista, sin embargo, son objetos de cientos de miles de publicaciones anualmente, siendo cada vez ramas más especializadas las que han surgido desde hace unas décadas como lo es la biología celular y molecular que han dado paso a realizar nuevos descubrimientos asociados a los microorganismos. [8]

Por último, cabe mencionar que la biología celular antes llamada citología, es una rama reciente de la ciencia de la vida, la cual está dedicada al estudio de la célula como una unidad fundamental de la materia viviente. [9]

### *1.1 El descubrimiento de la célula*

Algo remarcable que es necesario tomar en cuenta que, debido a su pequeño tamaño, las células solo pueden observarse con la ayuda de un microscopio. El descubrimiento de estas se le atribuye a Robert Hooke, pero Anton van Leeuwenhoek fue el primero en

examinar una gota de agua de un estanque bajo el microscopio, donde observó lo que él nombró como “animálculos” microscópicos que se movían de un lado a otro, fue el primero en describir las diversas formas de bacterias.

No fue hasta 1839 que Theodor Schwann concluyó que las células de las plantas y animales son estructuras similares y propuso los principios de la teoría celular: el primero es aquel donde se establece que todos los organismos están compuestos de una célula o más células. Mientras que el segundo es aquel donde la célula es considerada como la unidad estructural de la vida. Finalmente, en 1855 Rudolf Virchow presentó argumentos convincentes para presentar el tercer principio: el cual considera que las células sólo pueden surgir por división de una célula preexistente. [8]

En la actualidad los postulados de la teoría celular sostienen principalmente que la célula es la unidad anatómica o estructural de los seres vivos, esta es la unidad mínima de materia capaz de tener vida. Toda célula se origina de otra existente por división la cual es comprendida en dos etapas: mitosis (división nuclear), con la excepción de las células germinales, ya que estas se dividen por meiosis (división celular).

Hace unas décadas antes del establecimiento de la teoría celular se creía que las células eran unidades de enfermedad, en la actualidad se tiene conocimiento que las enfermedades también se pueden atribuir a las moléculas. Aunque las células son definidas como entidades individuales, también es necesario aclarar que existe la individualidad de las células, así como la del organismo. Es importante mencionar que las células animales y vegetales se clasifican en cuatro categorías: en primer lugar tenemos a las independientes que se definen como aquellos seres que permanecen aislados durante toda su vida o la mayor parte de ella como los protozoarios, bacterias, espermatozoides o eritrocitos; en segundo lugar se encuentran a las federadas y son aquellas que en las que se componen por tejidos animales y algunos otros vegetales, algunos ejemplos de ellas son las células del epitelio intestinal; por otro lado tenemos a las plasmiales las cuales están comunicadas a través de uniones o canales intracitoplasmáticos ejemplo de ello son las células musculares cardíacas; y por último sin quitarles la importancia que merecen, tenemos a las células sincitiales estas

contienen una masa celular gigante con numerosos núcleos, dentro de estas tenemos a las células lutas trofoblásticas que se encuentran en la placenta. [10]

Hoy en día se sabe que cada célula que conforma nuestro organismo puede crecer, reproducirse, procesar información, responder estímulos y llevar a cabo diversas reacciones químicas, dichas características intrínsecas que definen la vida. La célula está definida como la unidad fundamental de la vida, y que todos los organismos vivos están conformados por estas, ningún organismo puede considerarse vivo si no está al menos constituido por una célula, es decir nada inferior a esta puede ser considerado un ser vivo. En contraste los virus no son considerados seres vivos, puesto que no pueden crecer ni reproducirse por sí mismos. [10]

Desde el punto de vista de la química, una célula está definida como un compartimento que contiene diversas sustancias químicas disueltas en un medio acuoso que se encuentra limitado por una membrana. Por otro lado, desde la morfología se le identifica como a la unidad estructural y funcional que da origen a los organismos vivos. [9]

## *1.2 Propiedades de las células*

Una de las propiedades fundamentales de las células es que son consideradas complejas y organizadas, pues cada tipo de célula tiene una apariencia consistente cuando se observa bajo un microscopio electrónico de alta potencia, sus orgánulos tienen forma y ubicación particular, los cuales varían de un individuo de una especie a otro. [8]

Ya que dichos organismos se construyen de acuerdo con información codificada en una colección de genes que están contruidos a partir de ADN. El ADN (ácido desoxirribonucleico) definido como la molécula encargada de transportar la información genética útil para el desarrollo y el funcionamiento de un organismo, es decir transmite información genética de padres a hijos y codifica para la producción de proteínas. Los genes son más que depósitos de información, constituyen los planos para construir estructuras celulares, las instrucciones para ejecutar las actividades celulares y el programa para hacer más de sí mismos. La estructura molecular de los genes permite cambios en la información genética (mutaciones) que conducen a variaciones entre los individuos. [8, 10]

Como ya se comentó anteriormente las células se reproducen por división, un proceso en general donde el contenido de una célula “madre” se distribuye en dos células “hijas”. Es importante mencionar que el material genético se duplica fielmente desde el original de la célula madre, por ello cada célula “hija” recibe una parte completa e igual de información genética. Generalmente las dos células “hijas” poseen el mismo volumen, sin embargo, existen excepciones, como en el caso de un ovocito humano, cuando este se divide, una de las células retiene casi todo el citoplasma, aunque solo reciba la mitad de información genética. [8]

Otro de los aspectos fundamentales a considerar es el principio de funcionamiento de las células ya que funcionan como plantas químicas pequeñas, pues realizan cientos de transformaciones químicas diferentes, la suma total de las reacciones químicas representa el metabolismo de esta. A través de la energía luminosa del sol se realiza el mecanismo de fotosíntesis transformando los nutrientes consumidos en energía química que se almacena en forma de carbohidratos ricos en energía un ejemplo de ellos son la sacarosa y el almidón. Es importante mencionar que las células gastan una enorme cantidad de energía descomponiendo y reconstruyendo las macromoléculas y orgánulos que lo componen. Dicha renovación mantiene la integridad de los componentes a pesar del desgaste y permite a la célula responder a condiciones cambiantes. [8]

En otras palabras, las células mantienen una intensa actividad para transportar materiales de un lugar a otro, ensamblar estructuras y desmontarlas rápidamente, todos estos cambios son mecánicos-dinámicos, estos se inician por proteínas “motoras”, uno de los muchos tipos de “máquinas” empleadas para llevar a cabo las actividades mecánicas en las células. Por lo general la mayoría de las células están cubiertas de receptores que interactúan con sustancias del medio ambiente de maneras específicas, es decir contienen receptores de hormonas, factores de crecimiento y materiales extracelulares, así como de sustancias en la superficie de otras células. Así como también poseen la capacidad de responder a estímulos específicos alterando sus actividades metabólicas, moviéndose de un lugar a otro o incluso suicidándose. [8]

Es por ello que surge el interés sobre los mecanismos reguladores de una célula y que es más evidente cuando se descomponen; como, por ejemplo, considerando que una célula por algún motivo no corrige un error al duplicar su ADN puede resultar en una

mutación debilitante, o en una falla en el control del crecimiento, incluso puede transformar la célula en una célula cancerosa con la capacidad de destruir todo el organismo. Con ello podemos concluir que cada tipo de actividad celular requiere un conjunto único de herramientas y máquinas moleculares altamente complejas. [8]

### *1.3 Tipos de células*

Algunas células se desplazan con rapidez y presentan estructuras que también cambian velozmente. Las amibas y los glóbulos blancos, por ejemplo, pueden modificar su forma mientras se mueven gracias a la formación de pseudópodos. Un ejemplo de ellos son los espermatozoides ya que poseen un largo flagelo que les permite desplazarse. En contraste, existen células casi inmóviles y con una estructura estable, como por ejemplo las células epiteliales que recubren diversas cavidades, por otro lado, para mantenerse vivas estas requieren de un medio específico las que difieren notablemente dependiendo de sus necesidades químicas: algunas requieren oxígeno para sobrevivir, mientras que para otras este medio resulta tóxico. Aunado a ello, algunas células solo necesitan aire, luz solar y agua como recursos esenciales, mientras que otras dependen de una combinación de moléculas complejas generadas por diferentes células (alimento). [10]

Con la invención y el desarrollo de equipos sofisticados como lo es el microscopio electrónico, los biólogos lograron examinar la estructura interna de una gran variedad de células. Gracias a esta herramienta tan útil se pudo clasificar a la célula en dos clases básicas (procariotas y eucariotas) la cual fueron distinguidas a partir de su tamaño, estructura interna y órganos que las conforman. [8] Y con ello subclasificándolas en células procariotas las cuales son estructuralmente más simples, entre ellas están las bacterias, por el contrario, las células eucariotas estructuralmente son más complejas, entre ellas se encuentran los protistas, que forman parte de plantas y animales. [9]

Es importante mencionar que casi todas las células procariotas contienen un único cromosoma circular (bacterias) y que el material genético está presente en el nucleóide: una región mal delimitada de la célula, que carece de membrana limitante que separa del citoplasma circundante. [9]

Tanto las células eucariotas como las procariotas poseen ribosomas, que son partículas no membranosas que funcionan como “bancos de trabajo” en los que se fabrican las proteínas de la célula. Aunque los ribosomas de las células procariotas y eucariotas tienen dimensiones considerablemente diferentes (la de las procariotas son más pequeños y con menos componentes), estas estructuras participan en el ensamblaje de proteínas a través de un mecanismo similar en ambos tipos de células. [9]

En las células procariotas el ADN se duplica y las dos copias se separan con precisión mediante el crecimiento de una membrana celular intermedia. En su mayor parte, los procariotas son organismos no sexuales. Contienen solo una copia de su único cromosoma y no tienen procesos comparables a la meiosis, la formación de gametos o la verdadera fertilización. Aunque los procariotas carecen de verdadera reproducción sexual, algunos son capaces de realizar conjugación, en la que un fragmento de ADN pasa de una célula a otra. Sin embargo, el receptor casi nunca recibe un cromosoma completo del donante, y la condición en la que la célula receptora contiene tanto su propio ADN como el de su pareja es fugaz. Aunque los procariotas pueden no ser tan eficientes como los eucariotas en el intercambio de ADN con otros miembros de su propia especie, son más hábiles que los eucariotas para recoger e incorporar ADN extraño de su entorno. [9]

El movimiento de una célula procariota puede lograrse mediante un fino filamento proteico, llamado flagelo, que sobresale de la célula y gira. Las rotaciones del flagelo, que pueden exceder las 1000 veces por segundo, ejercen presión contra el líquido circundante, impulsando a la célula a través del medio. [9]

Por otro lado, las células eucariotas poseen un núcleo, esta es una región limitada por una estructura membranosa compleja mejor conocida como envoltura nuclear, contienen más información genética que las procariotas, contienen varios cromosomas separados, cada uno de ellos contiene una única molécula lineal de ADN. El citoplasma de una célula eucariota está lleno de una gran diversidad de estructuras, como se desprende fácilmente al examinar una micrografía electrónica de casi cualquier célula vegetal o animal. Incluso la levadura, la eucariota más simple, es estructuralmente mucho más compleja que una bacteria promedio. [9] Se dividen mediante un complejo proceso de mitosis en el que los cromosomas duplicados se concentran en estructuras compactas que se segregan

mediante un elaborado aparato que contiene microtúbulos. Este aparato, llamado huso mitótico, permite que cada célula hija reciba una matriz equivalente de material genético. A diferencia de las procariotas las células eucariotas poseen una variedad de mecanismos locomotores complejos, en algunas células eucariotas, incluidos muchos protistas y espermatozoides, también poseen flagelos como las procariotas, pero las versiones eucariotas son mucho más complejas que los simples filamentos proteicos de las bacterias. [9]

La distinción entre células procariotas y eucariotas se basa en la complejidad estructural y no en la relación filogenética. En particular las procariotas se dividen en dos grupos o dominios taxonómicos principales: Archaea (arqueobacterias) y Bacteria (eubacterias). Los miembros de Archaea están más estrechamente relacionados con los eucariotas que con el otro grupo de procariotas (las bacterias). Todos los demás procariotas se clasifican en el dominio Bacteria. Este dominio incluye las células más pequeñas conocidas, el micro plasma ( $0,2 \mu\text{m}$  de diámetro), que son los únicos procariotas conocidos que carecen de pared celular y contienen un genoma con menos de 500 genes. Las bacterias están presentes en todos los hábitats imaginables de la Tierra, desde la plataforma de hielo permanente de la Antártida hasta los desiertos africanos más secos. Incluso se han encontrado bacterias viviendo en capas de rocas situadas a varios kilómetros por debajo de la superficie de la Tierra. Se cree que algunas de estas comunidades bacterianas han estado aisladas de la vida en la superficie durante más de cien millones de años. [8, 9, 10]

Las procariotas más complejas son las cianobacterias, ya que contienen elaboradas matrices de membranas citoplasmáticas, que sirven como sitios de fotosíntesis. Dichas membranas, son muy similares a las membranas fotosintéticas presentes en los cloroplastos de las células vegetales. Al igual que en las plantas eucariotas, la fotosíntesis en las cianobacterias se logra dividiendo las moléculas de agua, lo que libera oxígeno molecular. [9] Aunque es importante recalcar que muchas cianobacterias son capaces no sólo de realizar fotosíntesis, sino también de la fijación de nitrógeno, la conversión de nitrógeno ( $\text{N}_2$ ) gas en formas reducidas de nitrógeno (como amoníaco,  $\text{NH}_3$ ) que las células pueden utilizar en la síntesis de compuestos orgánicos que contienen nitrógeno, incluidos aminoácidos y nucleótidos. [9]

Por último, es necesario mencionar los sistemas de clasificación, propuesto por H. Whittaker, quien divide al mundo viviente en los siguientes 5 reinos: plantae, animalia, protista, hongos y monera. Se considera que todos tienen un ancestro común, esta división toma en cuenta las diferencias entre procariontes y eucariontes, así como su organización unicelular colonial o multicelular. También considera a los hábitos alimenticios como la absorción, digestión, fotosíntesis y su combinación. [9]

#### 1.4 *Los microorganismos*

Después de los términos definidos anteriormente es necesario enfocarnos en la microbiología la cual se encarga del estudio de los microorganismos microscópicos que viven aislados o en grupos, también comprende a los virus, organismos que carecen de estructuras celulares. Los microorganismos se encargan de llevar a cabo ciclos de elementos químicos indispensables para la vida, como el ciclo de carbono, nitrógeno, azufre, hidrógeno y oxígeno; realizan más fotosíntesis que las plantas, se calcula que en el planeta existen  $5 \times 10^{30}$  células microbianas; excluyendo a la celulosa, estas constituyen el 90% de la biomasa de toda la biosfera. [12]

Estos microorganismos se subdividen en cuatro grupos principalmente: virus, bacterias, hongos y parásitos. Los virus son aquellas partículas infecciosas de menor tamaño, con un diámetro aproximado de entre 18 hasta 300 nm, actualmente se han encontrado más de 25 familias víricas que están compuestas por más de 1.550 especies, la mayoría de estas están asociadas a enfermedades en que afectan al ser humano. Los virus están formados principalmente por ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), además de las proteínas necesarias para su replicación y patogenia. Las infecciones causadas por estos virus ocasionan una réplica rápida y destrucción celular, o dan lugar a una relación crónica latente en donde puede ocurrir que la información genética del virus se integre al genoma del organismo infectado. Las enfermedades provocadas por los virus pueden variar en peligrosidad que van desde un resfriado común y gastroenteritis hasta cuadros clínicos mortales como la rabia, ébola, viruela y el SIDA. [11]

En contraste por su parte las bacterias están constituidas por una estructura simple, como ya se mencionó anteriormente, son microorganismos procariontes, sin embargo, contienen una pared celular compleja que la rodea, esta puede ser grampositiva con una gruesa capa de peptidoglucano o una pared gramnegativa con una delgada capa de peptidoglucano, así como una membrana externa. Es importante mencionar que algunas bacterias carecen de pared celular y compensan su ausencia sobreviviendo al interior de las células de su anfitrión. En general su clasificación preliminar se basa en el tamaño, forma y disposición espacial; su clasificación definitiva se da por sus propiedades fenotípicas y genotípicas. Las enfermedades causadas por ellas pueden deberse a los efectos tóxicos de los productos bacterianos (toxinas) o bien a la invasión de regiones corporales que acostumbran a ser estériles. [11]

Por otro lado, los hongos poseen una estructura celular compleja, son microorganismos eucariotas, y coexisten de manera unicelular como levaduras, replicándose de manera asexual o en filamentos como el moho, que se reproduce de manera sexual y asexual. Finalmente, tenemos a los parásitos, estos son microorganismos complejos, aunque la mayoría son catalogados como eucariotas, algunos son unicelulares y otros pluricelulares. [11, 12]

Los microbiólogos están familiarizados con microorganismos que pueden cultivar en un medio de cultivo. Generalmente cuando un paciente sufre una infección del tracto digestivo o urinario consulta a su médico, el primer paso es cultivar el patógeno. Una vez cultivado, se procede a identificar el organismo y prescribir el tratamiento adecuado. Han demostrado que es sencillo cultivar la mayoría de las procariotas que causan enfermedades, sin embargo, no ocurre lo mismo con aquellos que se encuentran libres en la naturaleza. La situación se complica porque las procariotas apenas son visibles en un microscopio óptico y su morfología no es fácil de distinguir. A lo largo de la historia solo se han descubierto apenas el 1% de los millones de especies procariotas que se cree existen en la Tierra. [8]

El estudio de los microbios ha sido de vital importancia para conocer las enfermedades que provocan y como controlarlas. Sin embargo, esta relación bacteria- enfermedad es demasiado compleja. Los microorganismos no generan solo una enfermedad, la mayoría de estos dan la aparición de diversas de enfermedades o por el contrario diversas

bacterias producen una misma enfermedad. A decir verdad, la mayor parte de los microorganismos solo provoca una enfermedad en condiciones bien definidas, algunas enfermedades son producto de la exposición de un individuo a los microorganismos por fuentes externas, a esto se le llama infecciones exógenas. Las enfermedades que padecemos nosotros como seres humanos son causadas por microorganismos presentes en la microflora que son diseminadas a locaciones del organismo en la que proliferan como enfermedad, estas son llamadas infecciones endógenas. [11]

La relación entre el ser humano y los microorganismos es difícil de explicar, la interacción entre ellos está determinado por la virulencia del microorganismo, el lugar de exposición y la capacidad de respuesta del organismo contra el microorganismo huésped. [11]

Para mejorar la capacidad de prevención de alguna infección en el cuerpo humano, se recomienda potenciar el sistema inmunológico con anticuerpos controlados por medio de las vacunas. Desafortunadamente los microorganismos modifican constantemente su estructura genética o desarrollan resistencia ante los antibióticos más potentes, por ello es importante colocarse las vacunas correspondientes año con año. [11]

Una vez comprendida la clasificación general de los microorganismos y su definición, en la siguiente sección nos enfocaremos de manera específica en las bacterias, ya que el presente trabajo se enfoca en la aplicación del óxido de zinc y su efecto en la inhibición del crecimiento.

### *1.5 ¿Qué son las bacterias?*

Como ya se mencionó las células más sencillas y pequeñas, las más antiguas son conocidas como procariotas, que para la practicidad en el contenido consecutivo del presente trabajo abordaremos como sinónimo para las bacterias que se analizaron. [11, 13]

Las bacterias son organismos celulares diminutos que miden entre 1.1 y 1.5  $\mu\text{m}$  de grosor, y de 2.0 a 6.0  $\mu\text{m}$  de longitud. Presentan diversas formas: las cilíndricas, conocidas como bacilos, pueden encontrarse aisladas, en pares o formando cadenas; las esféricas, llamadas cocos, pueden aparecer solas, en pares, en cadenas, racimos o agrupadas en cubos. Algunas bacterias presentan una forma helicoidal y siempre se

encuentran aisladas; las rígidas se denominan espirilos, las flexibles espiroquetas y, cuando son más cortas, vibriones. Su función principal es regular el paso de sustancias hacia el interior y exterior del citoplasma, manteniendo constante la composición celular. Además, puede presentar invaginaciones internas llamadas mesosomas. [13]

De manera puntual una bacteria considera al cuerpo humano como su huésped, que le proporciona calor, humedad y alimento necesarios para su crecimiento. Por sus características genéticas estos organismos procariotas tienen la habilidad de invadir el ambiente, colonizar, acceder a sus nutrientes y evitar que el organismo responda con su sistema inmune. Debido a los mecanismos que estas utilizan para sobrevivir, alimentarse y crecer producen daños o problemas a su huésped. Los rasgos genéticos que los identifican son factores de virulencia y con ello aumentan su capacidad para producir enfermedades. Es importante enfatizar que no todas las bacterias producen enfermedades, algunas causan enfermedad hasta que se presenta una infección (oportunistas), y que nuestro cuerpo está colonizado por diversos microorganismos, mejor conocidos como flora normal, muchos de estos desempeñan importantes funciones, como ayudar a la digestión, producir vitaminas y proteger al organismo ante la colonización de microorganismos patógenos. [11]

Pero cuando el organismo entra en interacción con las bacterias virulentas, estas se desarrollan a expensas de este mismo, dando como resultado una enfermedad y su efecto es el daño directo o pérdida de la función de un tejido u órgano. [11]

En la actualidad se calcula que menos del 10% de los microorganismos patógenos que provocan enfermedades es analizado (clasificado). Para poder clasificar a los microorganismos es importante tener definidos tres puntos: identificación, clasificación y nomenclatura. Llamamos clasificación al esquema práctico para aislar y diferenciar los microorganismos que conforman la flora microbiana, en donde se verifica la autenticidad y propiedades de un cultivo en un entorno clínico, posterior a ello se aísla al patógeno causante de la enfermedad. Mientras que para la clasificación se relaciona directamente a su taxonomía, para ello es necesario hacer uso de técnicas experimentales y de observación, analizando las propiedades bioquímicas, fisiológicas, genéticas y morfológicas. Por último, la nomenclatura es la denominación final que fue establecida por científicos y médicos. [11] A través de estos fundamentos nos permitiremos

mencionar en la siguiente sección de manera general los procedimientos de identificación de las bacterias.

Para clasificar y estudiar a las bacterias es importante considerar diversos puntos como lo es su crecimiento a través de medios de cultivo, en general las bacterias necesitan un medio de cultivo rico en nutrientes para poder promover su crecimiento, estos por lo general contienen agar, fuentes de carbono y un hidrolizado ácido o una fuente de material biológico sometido a la degradación enzimática como la caseína. Los medios de cultivo se dividen en no selectivos y selectivos. Los medios no selectivos pueden cultivar tantos microorganismos sea posible, por lo tanto, es posible observar una gran variedad de colonias bacterianas. Por el contrario, los medios selectivos como su nombre lo indica, eliminan o reducen bacterias que son irrelevantes, pues utilizan sustancias para inhibir las bacterias que no son de interés. Adicionalmente tenemos a los medios diferenciales, en estos se identifican como zonas claras alrededor de las colonias cultivadas en presencia de sustratos insolubles. [12] También es importante mencionar que a la par de dichas técnicas de identificación por decirlo “sencillas” existen métodos más específicos como lo es la microscopía que en la actualidad juega un papel importante en la clasificación, valiéndose de métodos como lo es la tinción de Gram es un método útil para la identificación de las eubacterias, si estas son Gram positivas o Gram negativas. [12] En primer lugar, existen dos grupos de organismos procariotas: las eubacterias y arqueobacterias, ambos organismos unicelulares que se reproducen de manera asexual. [12]

Dentro de las eubacterias encontramos a las eubacterias gramnegativas, grampositivas y las que carecen de pared celular. Las eubacterias gramnegativas son aquellas bacterias que se caracterizan por tener una cubierta celular complejo y una membrana citoplasmática, su forma puede ser esférica, ovalada, como bastón recto o curvo, helicoidal o filamentosa, algunas están recubiertas o encapsuladas, este tipo de bacterias se reproducen por fisión binaria, y algunas otras por gemación. Dentro de este tipo de bacterias encontramos los fotótrofos o no fotótrofos y comprenden especies aerobias, anaerobias, anaerobias facultativas y microaerófilos. Por otro lado, tenemos a las eubacterias grampositivas, estas se caracterizan por tener un perfil de pared celular tipo grampositivo, la mayoría de las células son grampositivas y se caracterizan por poseer

una cubierta celular está compuesta por una pared celular gruesa y una membrana citoplasmática, pueden ser encapsuladas y tener movilidad por medio de flagelos; su forma varía entre esférica, bacilar o filamentosa; se reproducen por fisión binaria la mayoría, algunas producen esporas. Son heterótrofos quimiosintéticos que comprenden especies aerobias, anaerobias y anaerobias facultativas. Este grupo está conformado por bacterias esporógenas simples y esporógenas, así como actinomicetos complejos estructuralmente y microorganismos relacionados. Por último, tenemos a las eubacterias sin pared celular, que como su nombre lo indica carecen de pared celular, comúnmente son conocidos como micoplasmas, dichos microorganismos se encuentran encerrados por una membrana plasmática. Algunas de sus características es que son altamente polimorfos, se reproducen por gemación, fragmentación o fisión binaria. La mayoría de las micoplasmas necesitan un medio complejo para desarrollarse y a menudo suelen formar colonias en forma de “huevo estrellado”. Una característica propia es que necesitan colesterol para crecer. [12, 13]

Por otro lado, tenemos a las arqueobacterias, estas habitan principalmente los ambientes terrestres y acuáticos extremos y son mejor conocidas como extremófilas, porque viven a elevadas y muy bajas temperaturas, altas concentraciones de sal, pH muy ácidos, etc. Las arqueobacterias se diferencian de las eubacterias por la ausencia de una pared celular de peptidoglucano, tienen formas diversas, pueden ser esféricas, espirales y como placa o bastón; pueden ser unicelulares o multicelulares en forma de filamentos o conglomerados. Se reproducen por fisión binaria, gemación, constricción, fragmentación o algún otro tipo de mecanismo que aún no ha sido estudiado. [12, 13]

Después de la clasificación general de las bacterias también es necesario comprender qué tipo de enfermedades son provocadas por ellas debido a la interacción con el ser humano.

### *1.6 Generalidades de la interacción de patógenos con el organismo*

En principio antes de describir las enfermedades asociadas a los microorganismos es importante mencionar que la microflora normal presente en el cuerpo humano proporciona defensas contra los microorganismos patógenos, ayuda a la digestión,

degrada toxinas y contribuye a la maduración del sistema inmunitario. Esta microflora está presente tanto en los seres humanos como en los animales que en otras palabras resulta ser benigno para el huésped. Sin embargo, algunas bacterias que también pueden aprovechar las características especiales en el microbiota son causantes de diversas enfermedades como lo es *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*. [12, 13] Las bacterias desempeñan un papel fundamental en los ecosistemas, ya que actúan como descomponedores de materia orgánica, transformando estas moléculas en compuestos inorgánicos que permiten la continuidad de los ciclos de la materia y la energía. Sin embargo, algunas bacterias por naturaleza provocan enfermedades a los animales y de manera incidental infectan al ser humano como la peste bubónica provocada por *Yersinia pestis*, la faringitis estreptocócica por *Streptococcus*, la tuberculosis por *Mycobacterium tuberculosis*, el ántrax maligno por *Bacillus anthracis*, el cólera por *Vibrio cholerae* y la intoxicación alimentaria por ciertos tipos de *Escherichia coli* y *Salmonella*. [10, 12]

Las principales vías de entrada de las bacterias patógenas al cuerpo humano son por medio de la unión de las mucosas a la piel, en el aparato respiratorio, tubo digestivo, aparato genital y urinario. Aunque también existen muchos casos anormales como son las quemaduras y laceraciones también son entrada de estos. La piel y las mucosas integrales juegan un papel importante en la defensa del cuerpo. [12]

La mayoría de las bacterias que generan enfermedades lo hacen al adherirse a las células del hospedador, que casi siempre son epiteliales. Una vez que las bacterias han establecido un sitio primario de infección, se multiplican y diseminan directamente a través de los tejidos o por el sistema linfático hasta el torrente sanguíneo. Esta infección (bacteriemia) puede ser transitoria o persistente. La bacteriemia permite la diseminación de las bacterias en el organismo hasta llegar a los tejidos que son en especial adecuados para su multiplicación. [12]

### **1.7 Bacterias de la familia *E. coli***

Una de las bacterias que más interés en el ámbito biológico y con un amplio espectro de estudio en la son las bacterias de la familia *Escherichia coli* (*E. coli*), dicho ello por la gran

interacción que ha tenido con el ser humano, aunado a las diversas infecciones o enfermedades que estas provocan, así como su resistencia en el tratamiento a través de antibióticos, en el presente trabajo se resumen algunas de sus características, así como de su clasificación.

Para comenzar esta bacteria (*Escherichia coli*) es considerada como un bacilo gramnegativo, que mide aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  de largo por 0.35  $\mu\text{m}$  de ancho. Puede tener flagelos para moverse en su entorno o *pili* en forma de pelos para adherirse a superficies o células. Una característica importante es que puede desarrollarse con o sin oxígeno, es decir es aerobio facultativo, pero no puede crecer a temperaturas o pH extremos, tampoco puede degradar contaminantes peligrosos, realizar fotosíntesis u otras acciones interesantes para los investigadores, forma parte de las enterobacterias, los cuales están relacionados con patógenos como *Salmonella*, *Klebsiella*, *Serratia* y *Yersinia pestis*. [14] Esta bacteria fue descrita por primera vez por Theodor Escherich en el siglo XIX, forma parte de la familia *Enterobacteriaceae*, normalmente se encuentra en el microbiota del tracto digestivo del humano y de animales de sangre caliente. [15]

Es importante mencionar que tiene un lugar especial en el mundo microbiológico ya que puede provocar infecciones graves en humanos y animales, pero también representa una parte importante del microbiota autóctono de los diferentes huéspedes. [16]

La curva normal de crecimiento bacteriano de *E. coli* está dividida en cuatro fases, la primera es la fase transición A o "lag" que es el tiempo en el que el ciclo celular se reinicia, luego de un ayuno nutricional, posteriormente viene la fase logarítmica o exponencial (FE) representa el periodo en el que existen suficientes nutrientes por lo cual las bacterias recuperan el ciclo celular y en consecuencia se reproducen de manera exponencial, después viene la fase de transición B, también llamada fase de crecimiento no balanceado, sucede cuando los nutrientes se han disminuido por lo tanto la pendiente cambia y disminuye la velocidad de síntesis de macromoléculas, la división celular es similar a la fase anterior, pero de menor tamaño, por último tenemos a la fase estacionaria (FS) sucede cuando los nutrientes se agotan, es el momento en el que el número de células en el cultivo no varía. [17]

En el acervo genético de enterobacterias la *E. coli* actúa como donante y receptor de genes de resistencia y, por lo tanto, puede adquirir genes de resistencia de otras bacterias, pero también puede transmitir sus genes de resistencia a otras bacterias. [16] Un motivo de gran preocupación es la posible transmisión de enfermedades virulentas y/o resistentes de *E. coli* entre animales y humanos a través de numerosas vías, como el contacto directo, el contacto con excreciones animales o a través de la cadena alimentaria. *E. coli* representa una importante reserva de genes de resistencia que pueden ser responsables del tratamiento. [16]

Por otro lado, la *E. coli patógena* representa uno de los problemas de salud pública más importantes en los países en vías de desarrollo, sobre todo en menores de edad, por lo que se hace necesario hacer un diagnóstico adecuado importante para diferenciarlas de la flora normal del tracto gastrointestinal. [18]

El caso más reciente del que se tiene información es de acuerdo con Rosenbluth Teddy de New York Times en un artículo publicado el 22 de octubre del 2024 las hamburguesas de un cuarto de libra de la famosa cadena de comida rápida McDonald's tuvieron como consecuencia un muerto y 49 enfermos a causa de un brote de *E. coli* relacionado con la cebolla. Los casos fueron registrados en Colorado y Nebraska, las investigaciones iniciales señalaban a las rodajas de cebolla de las hamburguesas. La cadena de comida rápida detuvo la venta de las hamburguesas de cuarto de libra, que son las únicas en su menú que contiene rodajas de cebolla en restaurantes ubicados en Colorado, Kansas, Utah, Wyoming, Idaho, Iowa, Misuri, Montana, Nebraska, Nevada, Nuevo México y Oklahoma. [19] De hecho la *E. coli* es una de las bacterias que ha permitido realizar muchos avances en diversos campos de la medicina. Los investigadores trabajan con ella, gracias a lo fácil que es encontrarla y manipularla. Es posible aislar cepas resistentes, patógenas y versátiles que se desarrollan rápidamente con nutrientes que se encuentran en el cuerpo humano. Por estas y más razones *E. coli* es el pilar de enseñanza y aprendizaje en microbiología.

### *1.8 Clasificación particular de las cepas E. coli*

Es importante mencionar que las cepas que causan enfermedades son conocidas como patotipos. Los patotipos o variantes patogénicas más estudiados incluyen *E. coli enteropatogénica (EPEC)*, *E. coli enterotoxigénica (ETEC)*, *E. coli enteroagregativa (EAEC)*, *E. coli productora de toxina Shiga (STEC)* y *E. coli enteroinvasiva (EIEC)*. [1]

Los patotipos de *E. coli* asociados al tracto intestinal presentan marcadas diferencias en la fisiopatología, los factores de virulencia y la epidemiología de la infección. La adherencia es un paso crucial para la patogenia bacteriana. En *E. coli enteropatogénica*, la unión íntima a los enterocitos produce una lesión característica denominada A/E (del inglés attaching and effacing) que conduce a la disminución de la superficie absorptiva intestinal asociada al cuadro diarreico. La patogenia de *E. coli enterotoxigénica* comienza con la adherencia a los enterocitos mediante sus factores de colonización seguido de la producción de enterotoxinas (termolábil y/o termoestable) que conducen a una diarrea secretoria. El patotipo *E. coli enteroagregativa* presenta una gran diversidad de factores de virulencia. Esta variante patogénica suele formar micro colonias que subsisten en el intestino por largos períodos dando cuadros de diarrea aguda y persistente. Por el contrario, el principal factor de virulencia de STEC es la toxina *Shiga*, cuyo mecanismo de acción es la inhibición de la síntesis proteica celular. Dicha toxina interviene en la destrucción de la mucosa colónica dando cuadros de diarrea, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico. Por último, *E. coli enteroinvasiva* presenta un mecanismo de patogenia asociado a la invasión intestinal. La bacteria ingresa por las células M de la mucosa colónica, luego invade a los enterocitos, se multiplica en el citoplasma y produce cuadros de diarrea disintérica. [1, 18]

La frecuencia de infección con *E. coli diarreogénica (DEC)* en la población con síntomas como diarrea ha presentado amplias variaciones, en países de Latinoamérica como Chile, México, Bolivia y Brasil reportaron una frecuencia de infección entre el 10% y el 25%, mientras que Uruguay, Perú, Venezuela y Paraguay informaron valores más elevados. [15]

Para puntualizar, las *E. coli diarreogénicas (DEC)* son las cepas que pueden llegar a desarrollar una infección, este grupo contiene patógenos que son de gran importancia para la salud pública en el mundo. Las cepas de *E. coli* se clasifican de acuerdo con el factor de virulencia y características fenotípicas, son divididas en seis grupos:

en primer lugar, tenemos a la *Enterotoxigénica (ETEC)*, esta es transmitida por contaminación fecal del agua o de los alimentos. Causa la “diarrea del viajero”, en los meses cálidos es cuando más casos existen. Estas cepas se han asociado con la diarrea en lactantes y niños en países en desarrollo, así como la diarrea del viajero. En algunos casos la diarrea es leve, pero puede agravarse hasta asemejarse a la cólera con deshidratación. [18] Tiene un periodo de incubación de 14 a 50h. Sus síntomas generalmente son diarrea acuosa, generalmente sin sangre, moco o pus, y en menor medida fiebre y vómito. [1]

En segundo lugar, tenemos a la *Enterohemorrágica (EHEC / VTEC / STEC)*, la cual es encontrada principalmente en los animales considerados como los principales portadores, particularmente el ganado lechero y bovino. Un ejemplo es *E. coli O157:H7* asociada a la colitis enterohemorrágica. Se diferencia de otros patotipos porque no fermentan sorbitol ni tienen actividad glucuronidasa. Se desarrollan entre los 30 y 42° C y presentan una resistencia a un pH de entre 4.5 o menor. [1] Es causa de muchos brotes epidemiológicos asociados a la ingesta de agua y alimentos contaminados. [18]

En tercer lugar, se encuentra la *Enteroinvasiva (EIEC)*, esta se caracteriza por que penetra la mucosa intestinal luego de 6 a 12 horas de ingresar al organismo de manera oral, la bacteria se adhiere, invade y destruye las células intestinales. [18] Esta cepa se relaciona bioquímica y genéticamente con *Shigella spp.* Un síntoma característico de esta cepa es la diarrea acuosa que provoca la aparición de deposiciones disentéricas escasas con sangre y moco, pero se tiene registro de casos en los que solo se presenta diarrea. Está asociada a brotes de casos aislados, que se transmiten de persona a persona o por la ingestión de alimentos y agua contaminada, dando paso a un patógeno que afecta principalmente a niños mayores de seis meses. [1]

Como cuarta posición tenemos a la *Enteropatógena (EPEC)*, la cual se diferencia por su adherencia a las membranas de los enterocitos, sin invadir las células. [18] Es la principal causa de diarrea en niños menores de dos años en países en desarrollo. Algunos de sus síntomas son diarrea aguda, aunque existen casos en los que también se ha presentado diarrea crónica y la fiebre. [1]

En quinto lugar, se encuentra la *Enteroadgregativa (EAEC)*, la cual está directamente ligada a la diarrea persistente en los niños, así como a la diarrea esporádica en países

en desarrollo. El periodo de incubación de esta cepa va desde las 8 horas hasta los 18 o 20 días. Algunos de los síntomas son diarrea líquida con moco o con sangre, vómito y una fiebre ligera. [1]

Finalmente tenemos a la *Adherencia Difusa (DAEC)*, cuya cepa tiene importante presencia en niños de 4 a 5 años. Algunos de los síntomas son diarrea acuosa sin sangre y leucocitos. [1]

### ***1.9 Generalidades de la E. coli en diversos países en brotes y análisis de muestras.***

La cepa *Escherichia coli O157:H7*, está históricamente asociada con grandes brotes de enfermedades transmitidas por alimentos, es el serotipo de STEC prevalente en muchas partes del mundo y uno de los más estudiados en animales para consumo humano. En Estados Unidos se ha estimado que las infecciones por *E. coli O157:H7* son responsables de al menos 20,000 casos de la enfermedad y 250 muertes por año, con un costo financiero de entre 250 y 500 millones de dólares. [20]

Por otro lado, es necesario mencionar que las cepas de *E. coli diarreogénicas (DEC)* representan la causa bacteriana principal de la diarrea pediátrica en regiones en vías de desarrollo, transmitiéndose por alimentos y agua contaminados, siendo una causa importante de síndromes intestinales que afectan principalmente a la niñez.

Con frecuencia las cepas de DEC afectan a los turistas de los países desarrollados que viajan a México, causando la llamada "diarrea del viajero". La gran mayoría de los casos de diarrea del viajero reportados en México están estrechamente relacionados a la presencia de patotipos de *E. coli*, presentándose en más de 50% de los casos, principalmente las cepas de ETEC y EAEC. Sin embargo, el área geográfica, grupo de población y el tipo de clima también son factores importantes.

Las cepas de los grupos patogénicos EPEC y STEC pueden contaminar el agua a través de las heces de los animales huéspedes, siendo ambas cepas buenas indicadores de contaminación fecal reciente en agua debido a su corto periodo de vida en ésta (aproximadamente de 4-12 semanas).

La *E. coli* O157:H7 se encuentra normalmente de manera asintomática en el intestino de animales, en especial en ganado vacuno. Por ejemplo, en 1993 hubo un brote en Washington, Nevada, Oregón y California EE. UU. que enfermó a más de 500 personas y causó cuatro muertes por el consumo de hamburguesas. Además de la carne molida de res, han estado implicados otros alimentos en los brotes, como leche cruda, mayonesa, sidra de manzana, algunas frutas, embutidos no cocidos, salami duro fermentado, aves de corral y ensaladas, donde en el 2006, un brote importante involucró diversos estados de la Unión Americana y estuvo asociado a ingesta de espinacas y lechuga.

Otra situación se presentó en el año 2011, donde se reportó un brote causado por *E. coli* O104:H4 en Alemania. El brote se caracterizó por una alta prevalencia en mujeres adultas y por un elevado índice de casos de síndrome hemolítico urémico (SHU) como complicación grave. En este brote estuvieron implicados dieciséis países de Europa y América del Norte y se estimó que 4000 personas resultaron infectadas y causó la muerte a 51 de ellas. Se determinó como alimento implicado fueron los germinados de fenogreco provenientes de una huerta orgánica del norte de Alemania, cuyas semillas contaminadas provenían de Egipto.

Para determinar la prevalencia de los patotipos se han realizado diversas investigaciones, en Colombia un grupo de investigadores determinaron la presencia de *E. coli* diarreogénica (DEC) en muestras clínicas y productos alimenticios de tiendas al por menor, en 108 muestras de heces de niños con diarrea aguda, 38 muestras de carne y 38 muestras de verduras, encontrando que el 9.8% de las muestras fueron positivas para algún patotipo de *E. coli*. En este caso, cuatro diferentes patotipos fueron identificados de muestras clínicas, incluyendo EAEC, ETEC, STEC y EPEC. Las muestras de productos alimenticios fueron positivas para EAEC y STEC, sugiriendo que los vegetales (espinaca y lechuga) y la carne de res pueden estar involucrados en la transmisión de estos.

Por su parte, otro grupo de investigadores analizó muestras de diferentes alimentos (salsa verde, col, cilantro y lechuga) de vendedores ambulantes en la ciudad de México encontrando que 22(42%) de las muestras contenían *E. coli* de las cuales en 7(13%) se detectó la presencia de *E. coli* diarreogénica (DEC) siendo el ETEC la de mayor

prevalencia. Así mismo, en otra investigación se evaluaron 130 muestras de ensaladas mixtas (lechuga, espinacas, tomate, aguacate, pepino, cebolla y zanahoria) de diferentes restaurantes en la ciudad de Pachuca, Hidalgo, México, encontraron que 110 fueron positivas para *E. coli*, con una prevalencia del 7% de DEC, de las cuales el grupo prevalente fue el STEC seguidas de las EIEC y en menor porcentaje las ETEC.

De la misma manera, en otra investigación aislaron *E. coli* *diarreogénica* (DEC) a partir del 36% de muestras de chile serrano y del 14% de muestras de chile jalapeño de México. Las ECD fueron identificadas como STEC y ETEC. En este caso las STEC fueron aisladas del 36% del chile serrano y el 14% de muestras de chile jalapeño y las ETEC del 12% de muestras de chile serrano y el 2% de chile jalapeño. Concluyendo que tanto el chile jalapeño como el serrano podrían ser un factor importante para que estas cepas se vuelvan endémicas en nuestro país.

En el 2013, en otro estudio en México se analizaron dos tipos de tomates (huaje y cherry), aislando DEC del 11% de las muestras. Las DEC identificadas incluyeron STEC, ETEC, EPEC y EIEC, siendo el grupo STEC el más frecuente tanto en tomate huaje y cherry con un 6 y 5% respectivamente, seguida por la ETEC (3 y 4%), la EPEC fueron aisladas de un 2 y 3% y por último la EIEC únicamente en el 1% de las muestras de tomate. [21]

### *1.10 Uso de antibióticos en la inhibición de microorganismos patógenos*

Desde el descubrimiento de la penicilina en 1929 y su primer uso clínico en 1941 son hechos importantes en la era de los antibióticos. En la década de 1950, la OMS empezó a asesorar a los países sobre la producción de antibióticos y la ampliación del acceso a ellos y de su uso responsable. [22]

Posteriormente en los siguientes 25 años, la investigación sobre los compuestos quimioterapéuticos se centró en las sustancias de origen microbiano llamados antibióticos. Después de aislar, concentrar, purificar y producir en masa la penicilina, se crearon la estreptomina, las tetraciclinas, el cloranfenicol y muchos otros fármacos.

El descubrimiento de los antibióticos se considera el logro más significativo para la humanidad. A pesar de tener limitaciones, contribuyeron en gran medida a salvar muchas vidas durante la segunda guerra mundial. Sin embargo, en las últimas décadas, las

bacterias se han vuelto resistentes a los mismos, lo cual ha llevado a una ardua investigación y desarrollo de nuevos antibióticos a través de la modificación sintáctica de los fármacos conocidos que requieren tiempo, esfuerzo y millones de dólares. [4, 22, 24] A pesar de la rapidez con la que se han investigado y analizado nuevos agentes quimioterápicos, las bacterias han demostrado una capacidad audaz para desarrollar resistencia a los fármacos. [22] Algunos microorganismos pierden su sitio de acción específico para un fármaco y por consiguiente se hacen resistentes, otros infectan al hospedador en sitios donde los antibióticos no penetran o no son activos. La mayoría de los microorganismos farmacorresistentes emerge del resultado de algún cambio genético o de los procesos de selección ulteriores gracias a los antibióticos. [23]

Algunos factores que modifican la actividad antimicrobiana in vitro es el pH, puesto que algunos fármacos son más activos a un pH ácido y otros a un pH alcalino como los aminoglucósidos; los componentes del medio también juegan un papel importante como la adición de NaCl al medio de cultivo facilita la detección de resistencia de *S. aureus* a meticilina; la estabilidad del fármaco también es un factor importante, a temperatura de incubación varios antibióticos pierden su actividad, por ejemplo las ampicilinas se inactivan con lentitud, mientras que los aminoglucósidos son estables durante un largo periodo; el tamaño de la siembra también es un factor importante, entre mayor sea la siembra bacteriana, menor es la sensibilidad aparente del microorganismo, el intervalo de incubación entre más prolongado, mayor probabilidad de que surjan mutaciones resistentes o los miembros menos sensibles podrían multiplicarse conforme el fármaco se degrada; la actividad metabólica de los microorganismos es importante, pues los microorganismos que proliferan de forma rápida y activa son más sensibles a la acción farmacológica que los que se encuentran en reposo. [4, 12, 23]

### ***1.11 Métodos de medición de la actividad antimicrobiana***

Para la medición de la actividad antimicrobiana se utilizan dos métodos: dilución o difusión. El método de dilución, en este método se añaden cantidades escalonadas de antibióticos a un medio bacteriológico líquido o sólido, posteriormente los medios se inoculan con bacterias de prueba y se incuban. El objetivo es encontrar la cantidad de

antibiótico necesaria para inhibir el crecimiento de la bacteria o su muerte. Una ventaja significativa de este método es que permite el señalamiento de un resultado cuantitativo, es decir la cantidad de un fármaco necesario para inhibir o destruir los microorganismos en el estudio, conocida como concentración bactericida mínima (MBC). [12, 24, 25]

El método de difusión es más utilizado, consiste en colocar un disco de papel filtro que contiene una cantidad determinada de un fármaco en la superficie de un medio sólido donde se ha sembrado el microorganismo a estudiar, posterior a la incubación, se mide el diámetro de la zona transparente de inhibición que rodea al disco como medida del poder de inhibición que tiene el fármaco contra el microorganismo investigado. Los resultados de esta prueba se interpretan con una comparación entre el método de dilución y difusión, pues esto ha creado referencias estándar en investigaciones anteriores. Las curvas de regresión lineal muestran la relación entre el logaritmo de la concentración inhibidora mínima en las pruebas de dilución y el diámetro de las zonas de inhibición en los análisis de difusión. Si se utiliza un solo disco para cada antibiótico con estandarización cuidadosa de las condiciones de la prueba, es posible establecer si un microorganismo es sensible o resistente al comparar el tamaño de la zona de inhibición con un valor estándar del mismo fármaco. [12, 24]

Es importante mencionar que la inhibición alrededor de un disco que contiene cierta cantidad de un antibiótico no significa que el microorganismo sea sensible a esa misma concentración por mililitro de medio de cultivo, sangre u orina. [12]

Algunos de los riesgos a los que el ser humano se expone por el uso indiscriminado de los antibióticos son causados por la sensibilidad generalizada de la población, que conlleva a la hipersensibilidad, anafilaxia, eritema, fiebre, trastornos hematológicos, hepatitis colestásica y tal vez incluso conjuntivopatías y vasculopatías; también puede desarrollarse cambios en la microbiota normal del organismo, donde una enfermedad puede ser resultado de una “superinfección” por la proliferación excesiva de microorganismos resistentes a los fármacos; puede presentarse un ocultamiento de una infección grave sin poder erradicarla; puede suscitarse un toxicidad directa del medicamento o desarrollarse una farmacorresistencia en poblaciones microbianas, al eliminar los microorganismos sensibles a los fármacos del ambiente saturado de antibióticos y su sustitución por microorganismos farmacorresistentes. [12]

## 1.12 La gentamicina y su papel en el tratamiento de enfermedades provocadas por patógenos

Los aminoglucósidos se utilizan principalmente contra bacterias gramnegativas del tubo digestivo o cuando se sospecha septicemia. En el tratamiento de la bacteriemia o la endocarditis causadas por estreptococos, enterococos o algunas bacterias gramnegativas, el aminoglucósido se administra junto con una penicilina que facilita su penetración en la célula. [12]

Los aminoglucósidos son antimicrobianos bactericidas que se utilizan en el tratamiento de numerosas infecciones graves por bacilos gramnegativos y algunos microorganismos grampositivos. El tratamiento requiere de una administración conjunta de un aminoglucósido y un inhibidor de síntesis de la pared celular como lo es la penicilina, ampicilina y la vancomicina. Los aminoglucósidos más utilizados son la amikacina, gentamicina y tobramicina, estos tres son empleados en el tratamiento de infecciones sistémicas producidas por bacterias gramnegativas sensibles. [11]

Los antibióticos aminoglucósidos se componen de amino-azúcares unidos mediante enlaces glucosídicos a un anillo aminociclitol. Los antibióticos estreptomina, neomicina, kanamicina y tobramicina se aislaron inicialmente a partir del género *Streptomyces*, mientras que gentamicina y sisomicina se obtuvieron a partir del género *Micromonospora*. Los aminoglucósidos son antimicrobianos bactericidas tienen la habilidad para unirse irreversiblemente a los ribosomas y por lo general se utilizan en el tratamiento de numerosas infecciones graves por bacilos gramnegativos y algunos microorganismos grampositivos. [11]

La gentamicina a una concentración desde 0.5 a 5 µg/mL es bactericida para la mayoría de las bacterias grampositivas y gramnegativas, incluidos *Proteus*, *Serratia* y *Pseudomonas*, sin embargo, es ineficaz para estreptococos y bacteroides. Este antibiótico se ha utilizado en infecciones graves por bacterias gramnegativas resistentes a otros fármacos. La gentamicina puede resultar tóxica si existe una función renal deficiente. [12]

### *1.13 La resistencia a los antimicrobianos (RAM) y nuevas alternativas de inhibición*

Como ya se mencionó de manera general en el apartado de la introducción estas bacterias han incrementado su resistencia, esto debido a factores como es el abuso del uso irresponsable de los antibióticos, o también por otros factores como lo es la diseminación de la RAM la cual tiene lugar a través de una gran variedad de medios, que incluyen plantas de tratamiento de aguas residuales, aguas superficiales, instalaciones médicas y finalmente a través de los microbiomas humanos presentes en el tracto intestinal. Debido a la amenaza inminente de la RAM para la salud humana, la diseminación que tiene lugar dentro de los seres humanos es la más perjudicial, particularmente en escenarios en los que la RAM se disemina por infecciones bacterianas que están siendo tratadas con antibióticos. [3]

Otro factor que contribuye en la resistencia bacteriana es la contaminación ambiental por antibióticos y que actualmente ha sido considerado como un problema universal y que se ha incrementado de manera exponencial en las últimas décadas debido al uso agresivo de antibióticos tanto en el sector médico como en el agrícola. Es por ello por lo que se ha observado que dicha contaminación es persistente en una variedad de ambientes como lo son, alimentos, ríos y agua potable comúnmente contaminadas por las heces humanas. Debido al uso indiscriminado en el consumo de antibióticos, y con ello la contaminación provocada por los mismos pueda ocasionar un aumento de la resistencia a los microbios y bacterias. [3]

Las infecciones provocadas por bacterias farmacorresistentes han aumentado la morbilidad y mortalidad, la duración de las hospitalizaciones y los costos de la asistencia médica. La resistencia a los antimicrobianos va en aumento y actualmente es responsable de más de 700000 muertes al año en todo el mundo según un informe del banco mundial de 2017, según informes de la OMS se estima que 300 mil personas morirán prematuramente a causa de infecciones por organismos multirresistentes en los próximos 35 años.

En la actualidad existen muchos métodos alternativos como la nanotecnología, la extracción de nuevos agentes antibacterianos a partir de productos naturales o la

reutilización de algunos fármacos o productos químicos seguros y aprobados por la FDA. [4, 23]

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es una de las principales amenazas para la salud pública y el desarrollo a nivel mundial. Se estima que la RAM bacteriana fue directamente responsable de 1,27 millones de muertes en todo el mundo en 2019 y contribuyó a 4,95 millones de muertes. Las prioridades para abordar la RAM en la salud humana incluyen la prevención de todas las infecciones que pueden dar lugar a un uso inadecuado de antimicrobianos; garantizar el acceso universal a un diagnóstico de calidad y al tratamiento adecuado de las infecciones; e información estratégica e innovación, por ejemplo, la vigilancia de la RAM y el consumo/uso de antimicrobianos, y la investigación y el desarrollo de nuevas vacunas, diagnósticos y medicamentos

La resistencia a los antimicrobianos es un proceso natural que se produce con el tiempo a través de cambios genéticos en los patógenos. Su aparición y propagación se aceleran por la actividad humana, principalmente el uso indebido y excesivo de antimicrobianos para tratar, prevenir o controlar infecciones en humanos, animales y plantas.

En el 2022 el informe Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) resalta las tasas de resistencia entre los patógenos bacterianos. Las tasas medias notificadas en 76 países del 42 % para *E. coli* resistente a las cefalosporinas de tercera generación y del 35 % para *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina son una preocupación importante. En el caso de las infecciones del tracto urinario causadas por *E. coli*, 1 de cada 5 casos mostró una susceptibilidad reducida a los antibióticos estándar como la ampicilina, el cotrimoxazol y las fluoroquinolonas en 2020. Esto está dificultando el tratamiento eficaz de las infecciones comunes. La Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) prevé un aumento del doble de la resistencia a los antibióticos de último recurso para 2035, en comparación con los niveles de 2005, enfoca la necesidad urgente de prácticas sólidas de gestión de antimicrobianos y una cobertura de vigilancia mejorada en todo el mundo.

Para abordar la RAM a nivel mundial, los países adoptaron el Plan de acción mundial (PAM) sobre la resistencia a los antimicrobianos durante la Asamblea Mundial de la Salud de 2015 y se comprometieron a desarrollar e implementar planes de acción nacionales multisectoriales para abordar la resistencia a los antimicrobianos. El PAM fue

posteriormente aprobado por los órganos rectores de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente.

En marzo de 2022, la Asamblea General de las Naciones Unidas estableció una segunda Reunión de Alto Nivel sobre la Resistencia a los Antimicrobianos que se celebraría en 2024, en colaboración con las Organizaciones Cuatripartitas y con el apoyo del Grupo de Líderes Mundiales. En octubre de 2023, el Presidente de la Asamblea General nombró a los Representantes Permanentes de Barbados y Malta para que facilitarán la reunión de alto nivel, una oportunidad importante para que los países asuman compromisos ambiciosos y acuerden objetivos, y la Secretaría Conjunta Cuatripartita está trabajando en estrecha colaboración con los facilitadores y el Grupo de Líderes Mundiales para garantizar una participación y aportaciones óptimas de los sectores humano, animal, agroalimentario y ambiental. [23]

### *1.13.1 Los nanomateriales y su papel como inhibidores de la actividad bacteriana*

Una de las alternativas emergentes en cuanto a la inhibición bacteriana son las nanopartículas las cuales se definen como un tipo de partícula diminuta con un tamaño de partícula entre 1 y 100 nm, con estructura unidimensional (nanotubos o nano barras), bidimensional (películas delgadas) y estructuras tridimensionales (compuestos o nano fibras, etc.). [26]

La nanotecnología se basa en que minúsculas nanopartículas puedan tener la capacidad de adentrarse a las múltiples estructuras de las bacterias impidiendo su desarrollo o aniquilandolas totalmente. Estudios recientes se han enfocado en las nanopartículas solas o combinadas con otros elementos para desarrollar fórmulas eficaces y seguras para el medio ambiente y el ser humano. [4, 6]

Con la creciente tasa de infecciones causadas por las diversas bacterias dañinas que existen en el mundo y con el aumento de su resistencia a los antibióticos, los tratamientos emergentes antibacterianos han sido de bastante interés últimamente. Por ello se han desarrollado diversas estrategias como el uso de temperaturas altas, luz ultravioleta,

fotocatálisis, químicos y otras técnicas de esterilización. Las técnicas químicas antibacterianas alternativas han atraído el interés de los científicos gracias al bajo costo y una alta eficiencia.

Últimamente, los nanomateriales se han convertido en candidatos prometedores para aplicaciones antibacterianas gracias a su alta superficie específica, así como a sus propiedades químicas y físicas únicas. Algunos nanomateriales como ZnO, CuO, TiO<sub>2</sub> y Ag<sub>2</sub>O han dado resultados con un alto rendimiento como antibacterianos. [5]

Debido a que los nanomateriales tienen una gran superficie específica, alta reactividad química y biológica, además de que están ganando importancia en la salud humana, los procesos biológicos y las aplicaciones medioambientales debido a su baja toxicidad, bajo coste de producción y reproducibilidad aunado a ello su demostrada efectividad en la disminución de la actividad bacteriana. [6]

Las infecciones causadas por las bacterias como ya se mencionó provocan enfermedades difíciles de tratar, puesto que en la actualidad son más resistentes a la mayoría de los antibióticos existentes. Por ello, es importante desarrollar nuevas estrategias para combatir las infecciones, de ahí nace la idea de utilizar la nanotecnología. [23]

### *1.14 Algunos nanomateriales y su uso como inhibidores del crecimiento de microorganismos*

De acuerdo con Danqing Li y colaboradores se infirió que cuando las nanopartículas de Ag<sub>2</sub> entran en contacto con las células bacterianas, la destrucción del ADN y puede debilitar efectivamente la capacidad reproductiva de las bacterias. El número de células dañadas es igual al número de células reproducidas, lo que se define como inhibición antibacteriana. Sin embargo, después de un período de contacto continuo, la capacidad reproductiva de *Escherichia coli* cae dramáticamente, incluso las células bacterianas recién reproducidas comienzan a ser destruidas, por lo que la curva de crecimiento muestra una fuerte tendencia a la baja dando paso a la etapa que se conoce como esterilización. [5]

Otro de los materiales propuestos como fármaco terapéutico es el selenio puesto que este se encuentra presente en nuestro organismo como oligoelemento y tiene activos biológicos bastante interesantes, como ser considerado anticancerígeno y poseer propiedades antibacterianas, además de pertenecer a la familia del oxígeno, por lo tanto, no se oxida en el aire y es insoluble en agua. Por otro lado, tenemos a la plata que también tiene excelentes propiedades antibacterianas, pero como no está presente de forma natural en el cuerpo humano, su toxicidad de dichas nanopartículas hacia las bacterias y a las células humanas es similar. [27, 29]

Además de ellos también se han propuesto el uso de las nanopartículas de óxido de hierro en la ingeniería biomédica debido a sus propiedades magnéticas únicas, alta absorción y bioactividad.

Es por estas razones que hoy en día los nanomateriales tienen gran potencial de aplicación en el ámbito de los procesos biológicos, aunque se ha visto que algunos de estos nanomateriales tienen efectos adversos sobre la salud humana y el ambiente. Por ejemplo, se ha visto que las nanopartículas de plata, alúmina y óxido de titanio han demostrado efectos antimicrobianos. Actualmente se tiene conocimiento de que las nanopartículas ejercen efectos biológicos por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que inducen al daño de la membrana y altera la estructura celular bacteriana provocando la muerte de la célula. [6]

Las nanopartículas de silicio mesoporosas (MSN) son materiales nano portadores de silicio inorgánico con tamaños de poro ajustables de 2 a 50 nm. Algunas de las ventajas que ofrecen estas nanopartículas son: que poseen una alta estabilidad, gran superficie, gran biocompatibilidad y funcionalización versátil, atrayendo atención en el campo de la medicina, específicamente en los fármacos, ya que mejora su eficacia y reduce la toxicidad. Debido a las características destacadas de los MSN dan oportunidad de ser aplicados en el área de inhibición bacteriana. [28]

De los estudios que se encuentran reportados en la literatura se ha observado que las nanopartículas más pequeñas tienen la actividad antimicrobiana más potente, pero se vuelven más citotóxicos, por ello, para el caso del reporte referente a las nanopartículas de plata se propone que estas pueden combinarse con otros agentes para mejorar la eficacia y reducir la citotoxicidad. Existen diversas investigaciones que muestran la

eficacia antibacteriana de Nps Ag con agentes de protección donde la concentración inhibitoria mínima (MIC) es menor. Las nanopartículas pueden tener diferentes grados de actividad antibacteriana de acuerdo con los factores estructurales o químicos. Se tiene conocimiento de que la aglomeración de Nps Ag puede convertirlos en sustancias menos tóxicas a las bacterias debido a que se presenta una menor relación superficie-volumen. [29]

Con ello se ha observado que el tamaño y la forma de las nanopartículas también afectan directamente a la actividad antibacteriana. Es decir que las nanopartículas más pequeñas pueden atravesar la membrana celular, por el contrario, las nanopartículas más grandes no. Generalmente, se ha reportado que las nanopartículas más efectivas tienen un tamaño igual o inferior a 30 nm. [29]

A todo esto, uno de los materiales en forma nanométrica que se ha empleado en la inhibición del crecimiento bacteriano es el óxido de zinc obtenido a través de diversas técnicas de síntesis.

### *1.15 El óxido de zinc*

El Óxido de Zinc (ZnO) es un material semiconductor multifuncional con una banda prohibida amplia de (3,37 eV) y una gran energía de enlace de excitación (60 mV) a temperatura ambiente. Es un semiconductor con una estructura cristalina tipo wurtzita, debido a sus propiedades catalíticas, eléctricas y ópticas la hacen un material singular entre los demás nanomateriales como lo es SnO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>, y el NiO. es por ello que en diversos reportes encontrados en la literatura se ha propuesto su uso en múltiples aplicaciones que van desde la fabricación industrial al campo biológico. [26, 30]

Las propiedades del ZnO están influenciadas en gran medida por su estructura, como lo es la morfología, la relación de aspecto, así como el tamaño, la orientación y la densidad cristalina. Estos factores estructurales son de suma importancia en muchas aplicaciones optoelectrónicas, fotocatalíticas y antibacterianas. Por lo tanto, resulta fundamental desarrollar métodos de síntesis de ZnO para aprovechar eficazmente el potencial del ZnO como fuente de materiales inteligentes y funcionales. [30]

Cuando el tamaño de partícula del ZnO se reduce a escala nanométrica, adquiere propiedades antimicrobianas destacadas, ya que puede interactuar con la superficie bacteriana y/o con el interior de la célula bacteriana, donde ingresa y posteriormente manifiesta mecanismos bactericidas específicos. Dichas interacciones entre las nanopartículas y las bacterias suelen ser tóxicas, lo que ha sido aprovechado en aplicaciones antimicrobianas, como en la industria alimentaria. Resulta particularmente importante mencionar que diversos estudios han reportado que las nanopartículas de ZnO no presentan toxicidad hacia las células humanas, lo que ha impulsado su uso como agente antibacteriano eficaz contra microorganismos. [31]

Debido a características especiales que se dan en este material como lo son los altos niveles de producción de ROS, la inhibición de la liberación de factores inflamatorios y la interferencia de la liberación de gránulos por los mastocitos, convierten al ZnO como un candidato prometedor para el desarrollo de fármacos antibacterianos y antiinflamatorios. Además, sumado a ello debido a su destacada eficacia antibacteriana le permite ser utilizado de manera eficiente en aplicaciones de envasado de alimentos, y cuentan con el respaldo por parte de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA). [26]

### *1.16 Generalidades de las nanopartículas de óxido de zinc*

Dentro del campo de los nanomateriales las nanopartículas de óxido de zinc (ZnO) se ha observado que son muy prometedoras en muchas áreas de aplicación. Debido a sus características como lo es el tamaño nanométrico y las diversas morfologías en que se ha logrado obtener, contribuyen fuertemente en sus propiedades ópticas, eléctricas, estructurales y de composición del ZnO. Además de la morfología, y del tamaño, otros factores tales como la orientación y la vacancia de oxígeno, así como las condiciones de exposición del ZnO juegan un papel importante en la actividad superficial y óptica del material. [7, 30]

El tamaño y la morfología de las nanopartículas van de la mano con sus propiedades antibacterianas, esto a su vez va directamente ligado al mecanismo de síntesis. Por lo general, cuando el tamaño de partícula disminuye, confiere a las nanopartículas de ZnO

la capacidad de penetrar más fácilmente en las bacterias (mayor reactividad) y, por lo tanto, su actividad antibacteriana es más fuerte. [26]

El ZnO es uno de los fotocatalizadores más estudiados, por su estabilidad física y química, su inocuidad es decir su baja toxicidad con el medio ambiente y en el ser humano, finalmente por su alta actividad catalítica entre otras características. Destaca por sus posibles aplicaciones en diversos dispositivos electrónicos, pigmentos, absorbentes de UV y catalizadores. Como ya se mencionó debido a que este material no es tóxico, es bioseguro y biocompatible. Tiene diversas aplicaciones como lo es en los revestimientos de latas de alimentos para carne, pescado y verduras. Al no ser tóxico, y de bajo costo de producción, también se utiliza en el tratamiento avanzado de aguas residuales. [7, 31]

Aunado a lo anteriormente mencionado, debido a la actividad antibacteriana demostrada de las nanopartículas de ZnO lo hace útil como un potente desinfectante, para esterilizar equipos y contenedores de la industria alimentaria contra el ataque y la contaminación por bacterias patógenas transmitidas por los alimentos. [26]

El ZnO a escala nanométrica cuenta con la capacidad de dispersar y reflejar la luz, una propiedad que ha dado pie a su uso en productos de protección solar dentro de la industria farmacéutica. En resumen, las características estructurales únicas de las nanopartículas de ZnO son responsables de su rendimiento multifuncional, lo cual le otorga también un gran potencial para diversas aplicaciones biológicas. [26]

Desde hace un par de décadas se ha observado que las Nps de ZnO muestran una buena actividad antibacteriana y antifúngica. En un estudio de Y. Wang et al., se informó que la forma prismática del  $Y_2O_3$  influyó en la actividad antibacteriana, debido a la interacción directa entre las nanopartículas de  $Y_2O_3$  prismáticas y la superficie de la membrana celular bacteriana, lo cual lleva a una rotura de la membrana celular bacteriana. De manera similar en un estudio de nanopartículas de ZnO basados en caseína antibacteriana, los resultados mostraron que la actividad antibacteriana de la caprolactama caseína (CC) mejoró al introducirse ZnO. [7]

### *1.17 Métodos de síntesis de nanopartículas de ZnO*

En la actualidad, se han propuesto un sin número de métodos de preparación de nanopartículas de ZnO, desde la síntesis fisicoquímica hasta la síntesis biogenética verde, las cuales desglosamos a continuación.

La síntesis fisicoquímica es la más común, pues incluye principalmente métodos de precipitación, depósito electroquímico, síntesis hidrotérmica, proceso sol-gel, reacción en estado sólido, síntesis química en fase vapor, combustión de gel, micro emulsión, síntesis solvotérmica, pirólisis por pulverización, pulverización catódica, zonificación, microondas, evaporación térmica, y coloidal entre otros. Cada uno de estos métodos tiene sus propias ventajas. Por lo general, el método de precipitación se controla de forma sintética y no requiere equipos complicados ni materias primas costosas, por lo que es de bajo costo y adecuado para la producción a gran escala. El pirólisis por aspersión es adecuado para la preparación de grandes cantidades en un corto período de tiempo y su instrumentación es sencilla. El método solvotérmico es de bajo costo, simple y sin catalizador. Mientras que en el método de microondas tiene un tiempo de reacción corto, un calentamiento rápido del volumen y es energéticamente eficiente. El método sol-gel por su parte se diferencia por su simpleza, repetibilidad y la confiabilidad, cabe destacar que los productos del método sol-gel presentan las características de alta pureza, tamaño de partícula bajo y área de superficie específica alta asemejando con los resultados que se obtienen a través de la síntesis coloidal. Mientras que en la síntesis hidrotérmica es sencilla y puede funcionar de manera controlada, lo que resulta útil para adaptar la morfología de las partículas mediante el control de las velocidades de reacción de hidrólisis y condensación. Finalmente, del método electroquímico podremos mencionar que también es rentable y tiene una alta pureza de los productos finales, es un proceso de operación a baja temperatura. A pesar de las ventajas de estos métodos, también existen desventajas. Por ejemplo, los métodos físicos comunes de pulverización catódica y evaporación térmica son costosos y consumen grandes cantidades de energía. Las síntesis químico genéticas tradicionales, como la síntesis hidrotermal, el proceso sol-gel, la síntesis química en vapor, la combustión en gel, la síntesis solvotérmica y la síntesis coloidal, suelen necesitar una atmósfera de alta temperatura y algunas de ellas incluso

deben llevarse a cabo en un costoso entorno de inercia. Más grave aún, la mayoría de ellas necesitan reactivos o aditivos tóxicos en el proceso de reacción. Como resultado, la alta temperatura, la complejidad y la toxicidad de estos métodos limitan su aplicación generalizada. [26, 31]

Últimamente, el concepto de síntesis ecológica o síntesis verde ha sido altamente preferido debido a sus ventajas de biocompatibilidad, bioseguridad, respeto al medio ambiente, rentabilidad y facilidad de síntesis a gran escala en comparación con los métodos fisicoquímicos. La síntesis verde de nanopartículas de ZnO utiliza componentes biológicos como materias primas, extractos de plantas, microorganismos y otros materiales bioregenerables, que se consideran excelentes fuentes renovables. Además, el mecanismo clave de estas, es que las biomoléculas derivadas de componentes biológicos son compuestos activos que sirven como agentes reductores y de recubrimiento. [26]

Los extractos de plantas tienen mayor atención en la síntesis de nanopartículas porque ofrecen las siguientes ventajas: los extractos de plantas son muy baratos, estables y permiten una producción a gran escala, además de que tienen un bajo riesgo de contaminación y pueden ser fácilmente preparados. [32]

Los investigadores descubrieron que la síntesis de nanopartículas de ZnO asociadas con extractos de plantas puede obtener materiales con efectos antibacterianos ideales, donde las síntesis verdes de ZnO mediadas por plantas, como *Psidium guajava* (extracto de hoja de guayabo), *Pedaliium murex* (extracto de planta Pedalium), *Artemisia haussknechti* (extracto de hoja de Artemisa), *Parthenium hysterophorus* (extracto de hoja de escoba), *Gymnema silvestre* (extracto de hoja), extracto de la planta de Aloe vera e *Hibisco sabdariffa* (extracto de la flor de Jamaica). Además, el método sintético de las nanopartículas de ZnO también está estrechamente relacionado con su actividad antibacteriana. Un ejemplo típico es aquel trabajo reportado por Mahendiran et al. demostraron que, entre todas las nanopartículas de ZnO que prepararon, la mejor actividad bactericida se obtuvo con las nanopartículas de ZnO sintetizadas con métodos biológicos en lugar de métodos químicos. [26]

## 1.18 Aplicaciones de las nanopartículas de ZnO

El ZnO es fotoactivo en luz ultravioleta y visible. A la luz del sol, las nanopartículas de ZnO podrían producir una gran cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que puede ser el principal requisito previo para el desarrollo de NP de ZnO como biofungicida. [33]

Las investigaciones avalan que las nanopartículas de ZnO se pueden utilizar como fungicida. Por ejemplo, Khan et al. informaron sobre nanopartículas de ZnO con forma de espina mediante síntesis sol-gel, que mostraron un efecto antifúngico eficaz contra *Candida albicans*. Sharma et al. prepararon nanopartículas de ZnO mediante un método de precipitación homogénea simple sin agregar ningún agente quelante, tensioactivo o gelatinizante. Se descubrió que la actividad antifúngica contra *Candida albicans* mejoró con la mayor concentración de nanopartículas de ZnO. Por su parte Ahmed et al. prepararon nanopartículas de ZnO utilizando *Azadirachta indica* (extracto de hojas) para el control biológico de frutos de lichi enfermos. Los patógenos causantes de la enfermedad se identificaron como *Aspergillus niger*. Los resultados in vitro indicaron que la inhibición máxima del crecimiento micelial fue del 70,5 % bajo las nanopartículas de ZnO (1.0 mg/mL). [26]

Es importante mencionar que se ha observado que las nanopartículas de ZnO poseen una amplia superficie específica, alta capacidad de carga de fármacos, elevada selectividad y baja toxicidad, se presentan como sistemas ideales para la administración de fármacos en tratamientos contra el cáncer. Además, su capacidad para absorber grandes cantidades de luz ultravioleta las ha llevado a ser ampliamente utilizadas en productos de protección solar. Asimismo, su rendimiento en fotoluminiscencia las hace valiosas en las imágenes médicas, proporcionando nuevas herramientas para el diagnóstico médico. En consecuencia, las nanopartículas de ZnO parecen estar ya profundamente integradas en la vida cotidiana. [26]

Otro de los beneficios de las nanopartículas de ZnO es que aportan a la fertilidad del suelo y el crecimiento de las plantas. Las nanopartículas de ZnO más pequeñas tienen una mayor relación superficie-volumen, mayor solubilidad en agua y mejor penetración en las hojas. Al ser fotoactivos, a la luz del sol generan ROS, como aniones superóxido

e hidroxilo, que, a su vez, aumentan la resistencia al estrés de las plantas y promueven la penetración de agua y oxígeno necesarios para un crecimiento más intensivo. [33]

Informes recientes han descrito los altos efectos citotóxicos de las nanopartículas contra una amplia gama de bacterias Gram positivas y Gram negativas, incluidas *E. Coli*, *Salmonella enteritis*, *Streptococcus pyogenes*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. Typhimurium*, *Enterococcus faecalis*, etc. [32, 34]

Evaluaron la eficacia de varias nanopartículas (NP) de ZnO diseñadas para inactivar algunos patógenos comunes transmitidos por alimentos, como *Salmonella*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *E. coli*. en un rango de concentraciones entre 0.1 y 1.5  $\text{gl}^{-1}$ . Se logró determinar que para el caso de las bacterias Gram negativas *S. enterica subsp. entérica* y *E. coli* fueron más sensibles a las nanopartículas de ZnO, ya que mostraron claros halos de inhibición y dificultades para adaptarse a las nanopartículas. [34]

El efecto antimicrobiano de ZnO dependía no sólo del tamaño de las partículas como informó Wanget al. (2017), sino también a la composición del óxido metálico y al tipo de células de microorganismos objetivo. Un aumento en el área de superficie de las nanopartículas aumenta la cantidad de iones que interactúan, lo que lleva a una mayor reactividad y un alto nivel de iones antibacterianos. [34]

Varios estudios indicaron una alta toxicidad específica de las NP de ZnO contra microorganismos patógenos, y solo se han observado efectos mínimos en las células humanas. [33]

El potencial anti-candidiasis y anti-virulencia dependiente de la dosis de las NP de ZnO sintetizadas por métodos verdes frente a aislados clínicos de especies cándidas sugiere que las NP de ZnO podrían usarse como agentes prometedores para inhibir la adherencia de la *cándida* a dispositivos médicos y para prevenir infecciones fúngicas relacionadas con los catéteres mediante el recubrimiento de catéteres con NP de ZnO para aplicaciones biomédicas. [35]

Por otro lado, el dopaje de nanopartículas de ZnO con algunos elementos como la plata (Ag) y el cobre (Cu) se han utilizado para aumentar el rendimiento de la actividad antimicrobiana del ZnO. Muchos investigadores se han centrado en los efectos del

tamaño, la forma y los parámetros de dopaje, como los efectos del tipo de dopante y la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de ZnO. [36]

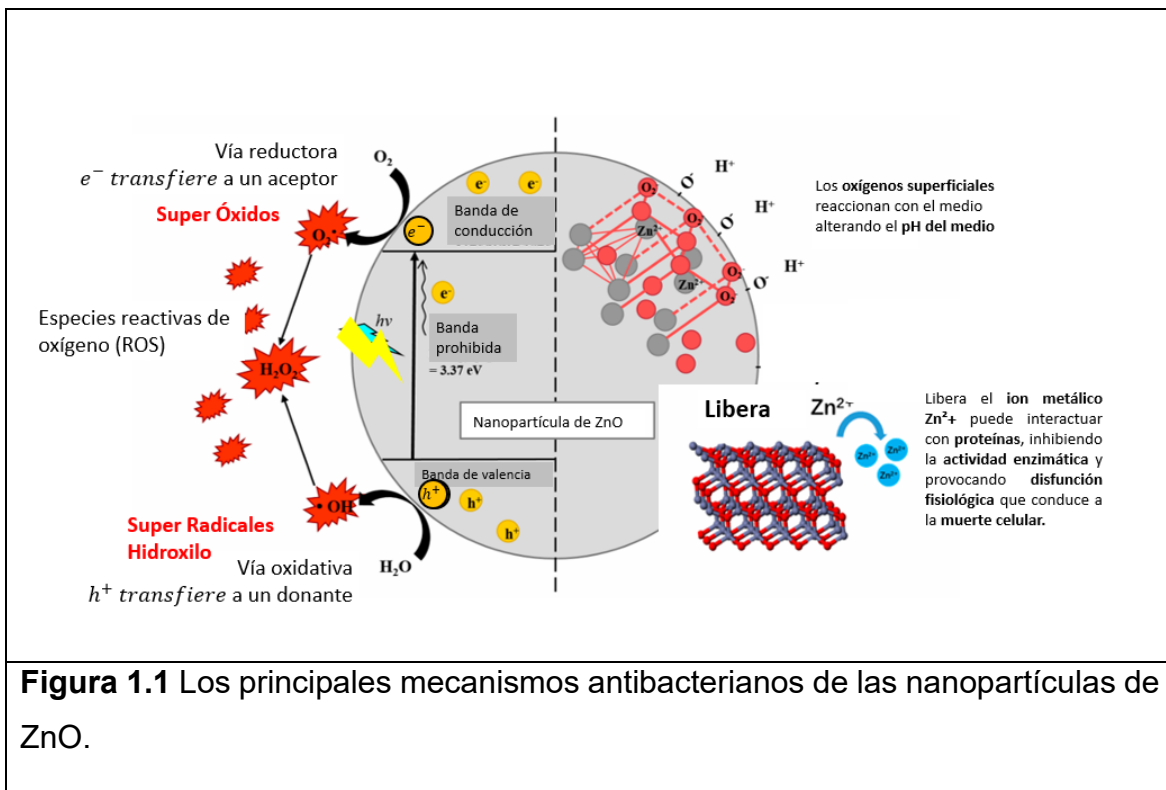
Cuando el ZnO se excita con luz (por ejemplo, UV) se genera un electrón( $e^-$ ) y un hueco ( $h^+$ ), donde el electrón excitado saltará a la banda de conducción (CB) y el hueco queda en la banda de valencia (VB). Posteriormente, los radicales libres se generan continuamente tanto a partir de la vía reductora ( $e^-$ ) como de la vía oxidativa ( $h^+$ ), donde el  $e^-$  se transfiere a un aceptor (a menudo  $O_2$ ) para producir  $O_2^{\bullet-}$  y el  $h^+$  se transfiere a un donante (a menudo  $H_2O$ ) para producir  $\bullet OH$ . Tanto el  $O_2^{\bullet-}$  como el  $\bullet OH$  son ROS tóxicos fisiológicamente relevantes, que pueden atacar bio-macromoléculas (p. ej., ADN) y componentes celulares. [26] Esta propiedad proporciona a las nanopartículas de ZnO la capacidad de tener aplicaciones biomédicas antibacterianas y anticancerígenas, etc. Por otro lado, la recombinación del hueco ( $h^+$ ) y el electrón ( $e^-$ ) emite fotones, lo que permite que las nanopartículas de ZnO se apliquen en las imágenes médicas (bioimágenes). [26, 37] El ZnO como óxido metálico, libera de forma gradual el ion metálico  $Zn^{2+}$ , el cual puede interactuar con proteínas, inhibiendo la actividad enzimática y provocando disfunción fisiológica que eventualmente conduce a la muerte celular. Por otro lado, sus características estructurales, como el tamaño, la carga superficial y su alta área de superficie específica, confiere a las nanopartículas de ZnO múltiples capacidades, entre ellas la fácil internalización celular, la identificación precisa de objetivos y la eficiente administración de fármacos. [26]

El ZnO puede causar la muerte bacteriana a través del daño directo a las células o la generación indirecta de especies reactivas de oxígeno (ROS) para inhibir la función de las proteínas, destruir el ácido nucleico y producir peroxidación lipídica dañina en las bacterias. Los principales mecanismos antibacterianos de las nanopartículas de ZnO (ver figura 1.1) de la siguiente manera:

- La interacción directa de las nanopartículas con la membrana bacteriana conduce a la destrucción y ruptura de la integridad de la membrana.
- Generar ROS en la célula para destruir las bacterias.
- Liberación de Zn tóxico $^{2+}$  iones para matar bacterias,  $Zn^{2+}$  tiene una afinidad especial con los grupos sulfhidrilo bacterianos. Puede unirse y oxidar los grupos para inhibir la actividad de la enzima glucolítica y, por lo tanto, inhibir la vía

glucolítica. Por lo tanto, puede inhibir la acción de las enzimas respiratorias bacterianas y, finalmente, provocar la muerte celular. Lo que cabe destacar es que, para los diferentes tipos de bacterias, los nanomateriales de ZnO ingresan a las bacterias de diferentes maneras. Para las bacterias Grampositivas, el  $Zn^{2+}$  los nanomateriales de ZnO pueden ser quelados por el ácido teicoico y el ácido lipoteicoico de la célula y translocarse a la célula. En el caso de las bacterias gramnegativas, tiene porinas que actúan como canales iónicos para promover la difusión pasiva en la célula.

- Alteración de la bomba de eflujo y del potencial de membrana en la membrana celular.
- La internalización de ZnO conduce al daño del ADN intracelular. [26]



**Figura 1.1** Los principales mecanismos antibacterianos de las nanopartículas de ZnO.

### *1.19 Bioseguridad de las nanopartículas de ZnO*

El ZnO, un material ampliamente documentado y aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), ha sido utilizado en numerosas aplicaciones biomédicas gracias a su biocompatibilidad, estabilidad y bajo costo. [37]

La evaluación de la bioseguridad o toxicidad de los nanomateriales es un paso muy importante antes de su aplicación práctica. En los últimos años, se han reportado numerosos estudios sobre la toxicidad de las nanopartículas de ZnO en distintas especies como lo son animales, plantas y algas.

Por ejemplo, Sarkar et al. estudiaron la bioseguridad de las nanopartículas de ZnO micro-sintetizadas ( $75\pm 5$  nm) mediante pruebas de citotoxicidad y genotoxicidad en células de linfocitos humanos. El análisis de la integridad de la membrana y la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial mostro que la citotoxicidad resulto significativa en dosis de tratamiento de  $500\mu\text{g/ml}$  y superiores.

Por su parte Yu et al. analizaron la toxicidad aguda oral de las nanopartículas de ZnO en ratas. No observaron signos de toxicidad después de la administración oral de nanopartículas de ZnO ( $86,3\pm 23,8$  nm, 100 mg/kg) durante 14 días.

Por otro lado, Jung et al. estudiaron el efecto de la interacción entre nanopartículas de ZnO y matrices alimentarias sobre la toxicidad oral. Los resultados mostraron que después de la administración oral de nanopartículas de ZnO ( $78\pm 26$  nm, 100 mg/kg) interactuando con glucosa (5%) o albúmina (5%) durante 14 días consecutivos, no se evidencio toxicidad aguda en las ratas de acuerdo con los análisis histopatológicos, hematológicos y bioquímicos séricos, confirmando así su baja toxicidad oral. [26]

## Capítulo 2: Métodos de caracterización

### 2.1 Caracterización de nanopartículas de ZnO

#### 2.1.1 Caracterización estructural por Difracción de rayos X (DRX)

La historia comienza con su descubrimiento en 1885 por el físico alemán Wilhelm Conrad Röntgen, quien los llamó rayos X porque su naturaleza era una incógnita. Posteriormente en 1912, Max von Laue descubrió que los materiales cristalinos dispersan los rayos X (difracción), lo que le valió el Premio Nobel de Física de 1914. Desde el descubrimiento de Laue, la difracción de rayos X (DRX) se ha convertido en una de las técnicas más útiles para revelar la estructura de los materiales cristalinos. La comprensión de la técnica de DRX ha facilitado el avance y desarrollo en varios campos, incluida la ciencia de polímeros, la metalurgia, la biología estructural y la ciencia farmacéutica, la ciencia del vidrio y la cerámica, la geología/mineralogía y el en el área de materiales. [38]

Los rayos X (RX) se han convertido en una de las herramientas fundamentales para la investigación en la determinación de las propiedades de los materiales. Por otro lado, luego del descubrimiento de los efectos de la difracción e interferencia de rayos X, se han desarrollado métodos basados en este fenómeno con éxito durante más de cien años todo ello enfocado en la determinación de la estructura de materiales cristalinos y amorfos, así como para determinar el tamaño y la forma de partículas microscópicas y submicroscópicas contenidas en estados sólidos y líquidos. [39]

Este fenómeno es explicado a través de la interacción de un haz de electrones de alta energía con un sólido cristalino dando como resultado un haz de rayos X difractados en muchas direcciones. Al medir los ángulos e intensidades resultantes de estos haces difractados, se puede dibujar una imagen tridimensional de la densidad de electrones dentro de la muestra cristalina. A su vez, a partir de este mapa de densidad electrónica, también se pueden determinar las posiciones medias de los átomos en el sólido cristalino. [38]

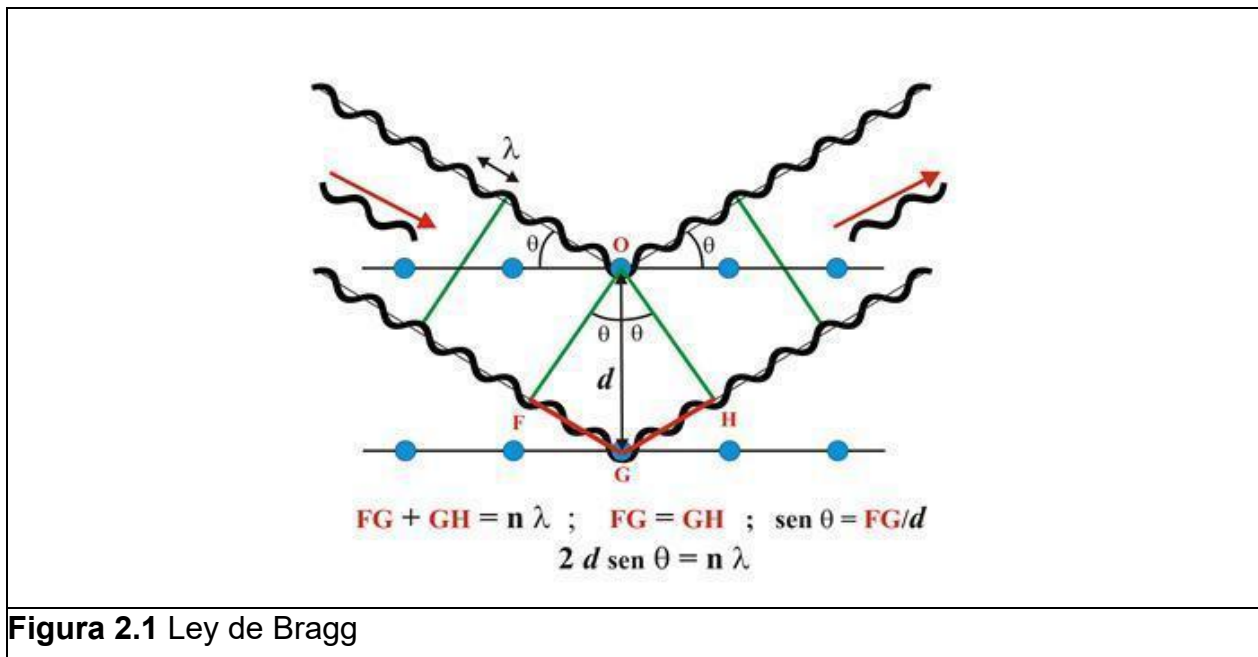
La difracción la definimos como la dispersión elástica que experimentan los rayos x cuando los electrones interactúan con los átomos en un sólido cristalino. La dispersión

elástica se lleva a cabo cuando una onda plana interactúa con un obstáculo o una rendija cuyo tamaño es aproximadamente el de la longitud de onda (0,5–2,5 Å). [38]

De una manera más sencilla, en cualquier experimento de difracción de rayos X, un haz de electrones incide en la muestra y la intensidad de los rayos dispersos se mide en función del ángulo de dispersión. A medida que múltiples rayos X se dispersan en varias direcciones al interactuar con múltiples planos dentro del sólido cristalino, se produce interferencia constructiva y destructiva en los rayos X dispersos debido a la interferencia. Cuando ocurre interferencia constructiva, la intensidad de los rayos dispersos es mayor que la de los rayos incidentes, y cuando ocurre interferencia destructiva, la intensidad es menor (a menudo insignificante). La interferencia constructiva solo ocurre cuando se cumple una condición específica, que fue descrita por los físicos ingleses Sir WH Bragg y su hijo Sir WL Bragg en 1913. La ley de Bragg, indica que la interferencia constructiva ocurre cuando:

$$n\lambda = 2d \operatorname{sen} \theta$$

Donde  $n$  es un número entero que describe el orden de reflexión,  $\lambda$  es la longitud de onda de los rayos X incidentes,  $d$  es el espaciamiento entre los planos que dispersan los rayos X y  $\theta$ , es el ángulo de incidencia (ver figura 2.1).



**Figura 2.1** Ley de Bragg

Un difractograma de rayos X es como la "huella digital" de un sólido cristalino, ya que revela información crucial, como la celda unitaria, el grupo espacial, el tamaño de los cristalitas y la deformación dentro del sólido. Idealmente, un pico en el difractograma (es decir, donde se cumple la ley de Bragg y se produce la interferencia constructiva de los rayos X dispersos) debería ser una línea nítida. Sin embargo, en la práctica, los picos de difracción de rayos X difícilmente son estrechos y presentan una anchura apreciable. Es bastante común encontrar picos con una anchura finita, es decir, ensanchándose, lo que puede revelar otro dato crucial sobre el sólido cristalino: el tamaño de su dominio de dispersión coherente (tamaño de cristal). [38]

El método de Scherrer se utiliza ampliamente para estimar el tamaño promedio de los cristalitas de materiales nano cristalinos basándose en datos de difracción de rayos X (DRX). Este método relaciona el ensanchamiento de un pico de difracción con el tamaño de los cristalitas del material de forma inversa; es decir, un mayor ensanchamiento significa un tamaño de cristalito menor y viceversa. El ancho del pico está asociado con el instrumento y el material. Por lo tanto, el ensanchamiento del instrumento debe restarse de los patrones de DRX para obtener únicamente el ensanchamiento preciso debido al material.

La ecuación de Scherrer es útil para calcular el dominio de dispersión coherente en un sólido cristalino, es decir, su tamaño de cristalito, que puede ser menor que el tamaño de partícula real. El tamaño del cristalito se define como el tamaño dentro del cual se retiene la periodicidad tridimensional en una estructura atómica, lo que puede no ser el caso si una partícula está compuesta de múltiples cristales donde el tamaño del cristalito siempre será menor que el tamaño de partícula. [38]

Es importante tener precaución con respecto a la aplicación de la ecuación de Scherrer a los resultados de DRX para calcular el tamaño. El tamaño del cristalito no es el único factor que puede conducir al ensanchamiento de pico en un difractograma, y diversos otros factores también pueden contribuir potencialmente al ensanchamiento del pico de difracción. Algunos de los factores secundarios también pueden causar ensanchamiento de pico, por ejemplo, la deformación no homogénea (compresión o tracción) y la tensión dentro de una red, imperfecciones de la red como dislocaciones, fallas de apilamiento,

maclado, vacantes, heterogeneidades químicas y la forma anisotrópica del cristalito donde una dimensión es significativamente menor que la otra, como es el caso de las nano barras. [38]

### *2.1.2 Microscopía de barrido de alta resolución (HRSEM)*

En 1965 la microscopía electrónica dio un gran salto en cuanto al análisis de materiales esto fue fuertemente impulsado con el microscopio electrónico de barrido (SEM) la cual dio posibilidad de poder observar imágenes íntegras y en tres dimensiones de escala micrométrica. Sin embargo, los conceptos básicos para que esto sucediera fueron propuestos en 1935 por Knoll, 3 años después de que Ruska y Knoll desarrollaran la información necesaria para el microscopio electrónico de transmisión (TEM).

En 1938, Manfred von Ardenne adicionó bobinas de barrido a un TEM y desarrolló el primer STEM (Scanning Transmission Electron Microscope). La primera micrografía por STEM fue de un cristal de ZnO tomada a un voltaje de 23 Kv, aumento de 8,000x y con una resolución espacial de entre 50 y 100 nm. [40]

La microscopía de barrido tuvo que esperar hasta que, en 1965, la Cambridge Instrument Co. lanzó el primer SEM. Desde entonces hasta la fecha, este tipo de microscopía ha avanzado rápidamente constituyéndose en una técnica imprescindible en distintos tipos de estudio, tanto sobre material biológico como en el campo inorgánico. [41]

Es importante mencionar que la aparición del microscopio electrónico de barrido comercial (SEM) se remonta al año de 1965, varios años después de que Siemens y Halske comercializaran el primer microscopio electrónico de transmisión en 1939 (TEM) como ya se mencionó anteriormente.

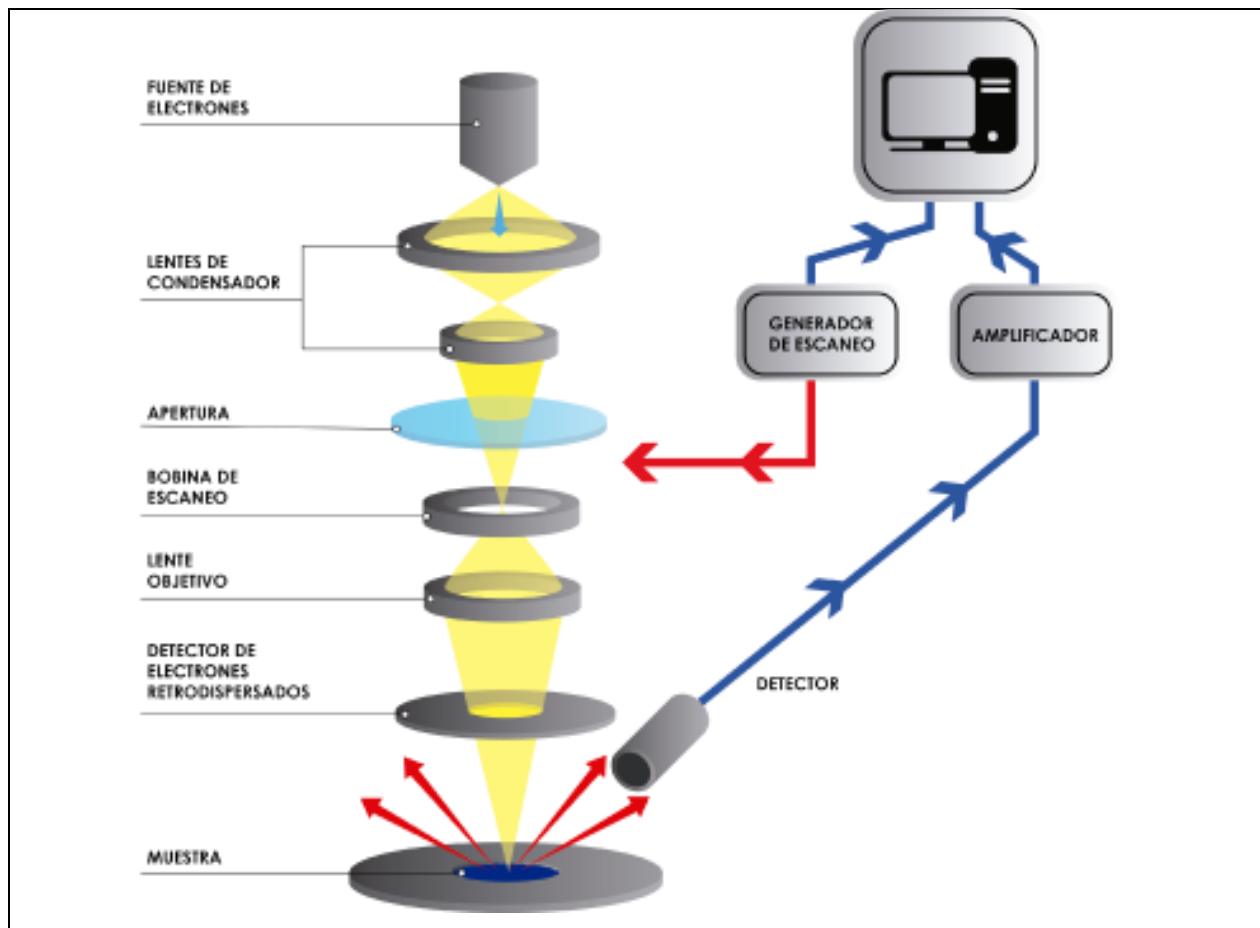
El principio básico de un microscopio electrónico es el uso de electrones en lugar de fotones o luz visible (como lo hace el microscopio óptico) para la formación de las imágenes de la muestra. En un SEM un haz de electrones focalizado recorre la superficie de la muestra, produciéndose así varias señales que pueden ser colectadas por diversos detectores y que contienen información acerca de la topografía de la superficie y de la composición de la muestra.

Actualmente, los nuevos SEM pueden conseguir una resolución menor a 1 nanómetro (nm), siendo 1 nanómetro la millonésima parte de un milímetro, por lo que son llamados “microscopios electrónicos de barrido de alta resolución” (HR-SEM). Para obtener una alta resolución, el haz de electrones del microscopio debe ser uniforme, coherente y muy fino. Entre más pequeño sea el diámetro del haz de electrones, mayor será la resolución espacial, por lo que podemos obtener mayor y mejores detalles de la superficie de las muestras.

Por lo tanto, una de las partes esenciales del microscopio electrónico es la fuente emisora del haz de electrones. Un SEM convencional utiliza una fuente de electrones con un filamento de tungsteno, lo cual origina que el diámetro del haz sea igual o mayor a 200 nm, limitando su resolución. En cambio, un HR-SEM utiliza como fuente de electrones un cañón de emisión de campo que proporciona un haz muy focalizado con un diámetro entre 10 y 25 nm, lo que mejora notablemente la resolución espacial. Esto, además, permite trabajar a voltajes muy bajos, que en el caso de un SEM convencional no es posible; lo que ayuda a minimizar el efecto de la carga en las muestras que no son conductoras y a evitar daños en muestras que son sensibles al haz. Otra forma de aumentar la resolución es utilizando una fuente de electrones llamado “cátodo frío”. Este cañón de emisión de campo permite que el haz tenga un diámetro entre 3 y 5 nm, lo que significa un aumento considerable en la resolución espacial de las imágenes, además de una resolución mejorada a bajos voltajes de aceleración para reducir el daño de la muestra. En los últimos años, el uso de bajos voltajes de aceleración en el SEM ha hecho posible observar las capas superficiales más externas de las muestras mientras se utilizan simultáneamente uno o más detectores adicionales para adquirir varios tipos de información sobre la muestra.

Una de las ventajas que ofrecen los microscopios electrónicos y en específico un SEM es poder obtener la composición química de los elementos presentes en la muestra mediante el detector de rayos X de energía dispersiva (EDS).

Algunos microscopios SEM de emisión de campo vienen equipados con tecnología de desaceleración del haz de electrones. En muestras sensibles al haz de electrones o muestras no conductoras, la tecnología de desaceleración de haz logra una mayor resolución y un mayor detalle de la superficie.



**Figura 2.2.** Microscopio electrónico de barrido

La microscopía electrónica de barrido permite la caracterización y observación de muestras sólidas mediante imágenes obtenidas con electrones secundarios y retro dispersados. Se pueden analizar una amplia gama de materiales como metales, cerámicos, poliméricos, híbridos, compuestos y biológicos. El uso de bajos voltajes nos permite obtener más información sobre la superficie de los materiales analizados. Se puede determinar el tipo y la cantidad respectiva de los elementos químicos de la muestra, además de mostrar cómo se distribuyen en la superficie mediante el análisis por EDS. La tecnología de aceleración del haz de electrones nos permite analizar muestras sensibles al haz de electrones sin destruirlas. [42]

### 2.1.3 Fotoluminiscencia

Esta técnica en el área de materiales es comúnmente utilizada para identificar propiedades ópticas intrínsecas. Tales como vacancias de oxígeno o Zn, intersticios, y transiciones relativas a estados doblemente excitados. Todos estos defectos están directamente relacionados a la promoción del electrón desde la banda de valencia hacia la banda de conducción. [43]

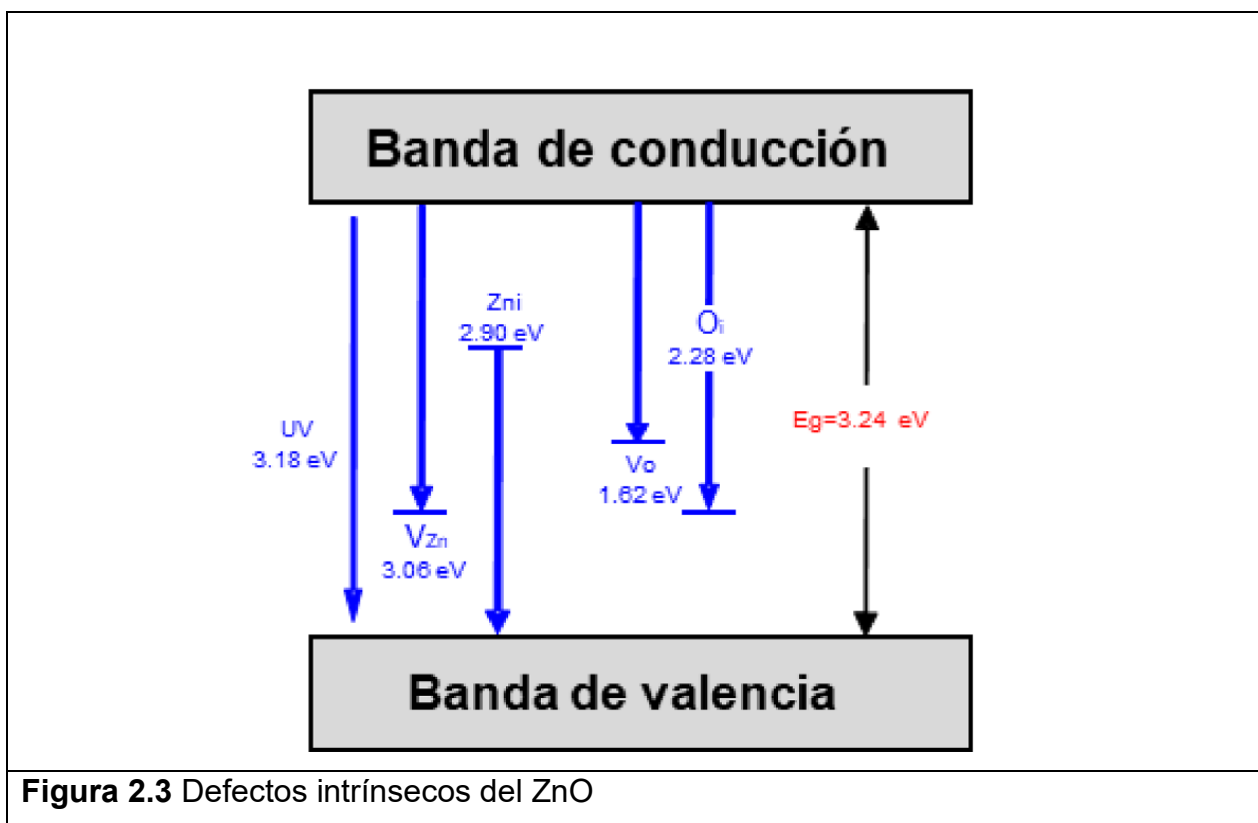


Figura 2.3 Defectos intrínsecos del ZnO

### 2.2 Caracterización de la inhibición bacteriana

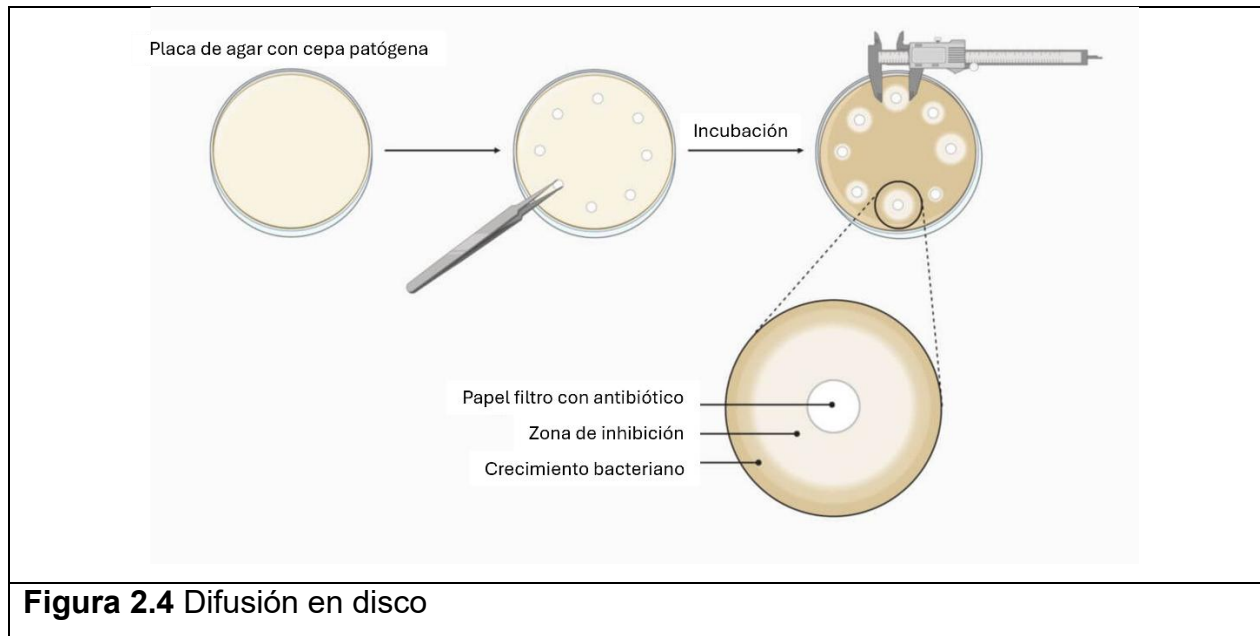
Por su parte, para la evaluación de la actividad antimicrobiana con las nanopartículas de ZnO se utilizan los siguientes métodos:

### 2.2.1 Difusión en disco

Esta prueba ha sido útil por más de 70 años en los laboratorios de microbiología. Un ejemplo de ello es Alexander Fleming quien utilizó una variante de esta técnica cuando trabajaba con la penicilina en los años cincuenta. Por su parte los doctores Bauer, Kirby, Sherris y Turck probaron minuciosamente todas las variables involucradas en el proceso, tales como los medios de cultivo, la temperatura y el espesor del agar. Posteriormente en 1966, ellos publicaron su estudio sobresaliente describiendo la prueba que se usa en la actualidad. El NCCLS adoptó los pasos básicos del procedimiento descritos en el estudio de Bauer y colaboradores como el método de referencia para difusión por disco. Estos pasos se quedaron como la base a seguir en forma minuciosa para obtener resultados precisos. [25]

Este método consiste en depositar en una caja Petri agar que previamente fue inoculado con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos. Una vez el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico se esparce al agar. El antibiótico se expande radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18-24 horas de incubación los discos se muestran rodeados por una zona de inhibición. [44]

El antibiograma es útil cuando se aísla una bacteria responsable de un proceso infeccioso y no puede predecirse su sensibilidad, especialmente si se sabe que este tipo de bacteria puede presentar resistencia a los antimicrobianos más habituales. El método de disco-placa es fácil de realizar, rápido y barato. Es una metodología aplicable a una amplia variedad de bacterias, especialmente en bacterias aerobias no exigentes de crecimiento rápido como Enterobacteriaceae, Pseudomonas spp., Stenotrophomonas maltophilia, Burkholderia cepacia, Acinetobacter spp., Staphylococcus spp. y Enterococcus spp. Además, con ligeras modificaciones, puede ser aplicado a Haemophilus spp., Neisseria gonorrhoeae, Streptococcus pneumoniae y Streptococcus spp. [44]



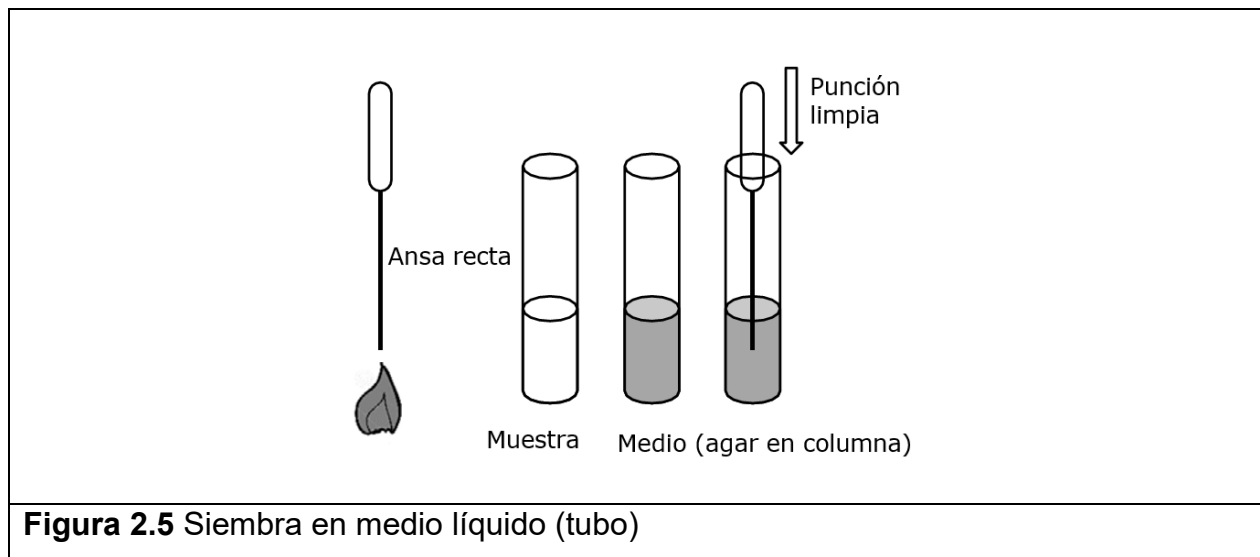
### 2.2.2 Siembra (inoculación) en medios líquidos (tubo)

Esta es la otra alternativa propuesta para la siembra de bacterias en un medio líquido (tubos), mejor conocida como dilución que consiste en tomar un tubo de ensayo con medio líquido, en donde el material a diluir se siembra en el tubo con el uso de un asa cargada con el material bacteriológico, se agita, con movimientos moderados. [45]

En este tipo de siembra el medio de cultivo a inocular líquidos o caldos, están distribuidos en tubos, o Erlenmeyer. El cultivo de procedencia puede estar en una caja Petri, en tubos o en pico de flauta. Para transferir las colonias desarrolladas en un medio sólido, ya sea en placas o tubos, se toma el cultivo con un ansa aguja u ojal, extrayendo una parte de este cuidando las condiciones de esterilidad. Se procede a quitar el tapón del tubo a inocular y se procede a inclinar el tubo a un ángulo aproximado a  $30^\circ$  y se acerca el asa con el material a inocular, a la superficie del interior del vidrio, justo sobre el punto en el que la superficie del líquido forma un ángulo agudo. Posteriormente realizar movimientos sobre el vidrio para esparcir el cultivo. Cuando el tubo de cultivo se regresa a la posición vertical, el área de inoculación queda sumergida debajo de la superficie.

Cuando se inicia a partir de un medio líquido, se recomienda quitar el tapón de algodón con el dedo meñique de la mano derecha, tomando el tubo con el cultivo en la mano

izquierda, elevando el mismo hacia la llama del mechero, para flamear su boca, tratando de mantenerlo inclinado. Introducir el ansa previamente esterilizada, en el tubo, y tomar la muestra sumergiendo el ansa en el cultivo. Se siembra a un medio de cultivo líquido, introduciendo la aguja o anillo cargada y agitando luego con la misma dentro del tubo para producir homogeneización de la carga microbiana aplicada, y desprendimiento total de los gérmenes del ansa. Posteriormente tapar el tubo y llevar a incubar. [46]



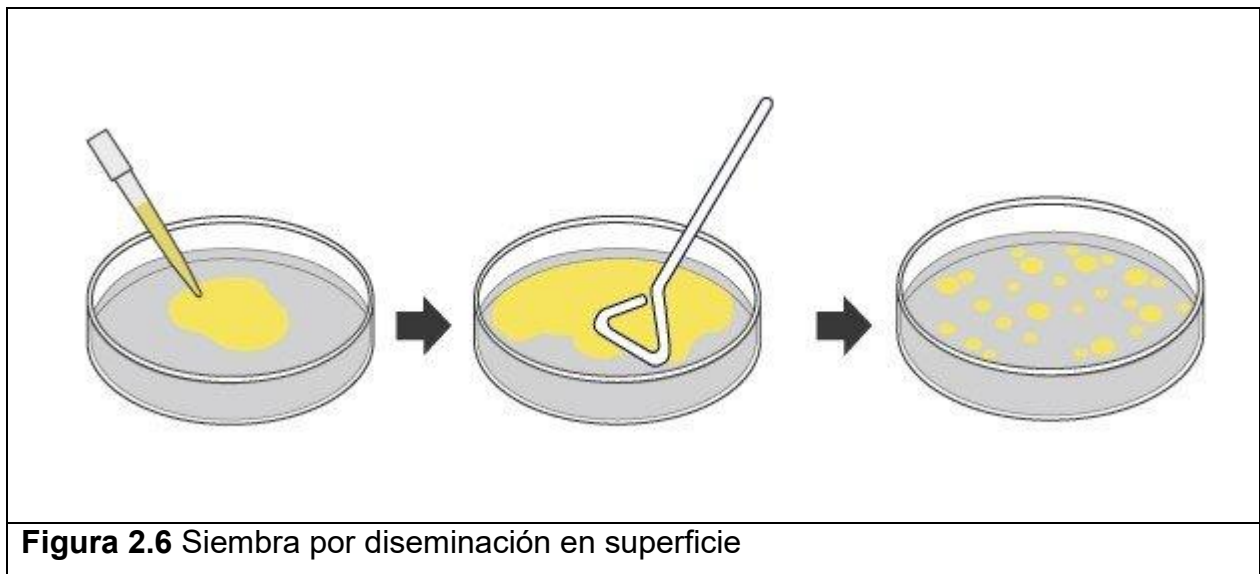
### 2.2.3 Siembra por diseminación en superficie (inoculación en medios sólidos)

Al extender una mezcla de células sobre una superficie de agar, cada célula aislada se multiplicará formando una colonia independiente, formación o agrupación macroscópicamente visible de microorganismos sobre un medio sólido, misma que representa un cultivo puro. La siembra por extensión es una manera directa y fácil de conseguir este resultado.

Este método consiste en pasar un volumen pequeño de una mezcla microbiana diluida, al centro de una placa de agar y extender uniformemente sobre la superficie con una varilla acodada de vidrio estéril o asa de Digralsky. El número de colonias debe ser igual al número de organismos viables de la muestra.

Siembra en superficie o masiva consiste en verter sobre una caja de Petri el medio de cultivo fundido, se deja solidificar y se coloca sobre la superficie el inóculo. Se utiliza una espátula de Digrafsky, una varilla de vidrio con un ángulo de 90° o un hisopo estéril, este se extiende el inóculo hasta su absorción total por el medio de cultivo. [45]

La diseminación en superficie consiste en distribuir la muestra de manera uniforme sobre la superficie del medio de cultivo contenido en la placa. Se utiliza para ello la espátula de Digrafsky, hisopo o ansa ojal. Cuando se utiliza una espátula de Digrafsky se coloca el inóculo primario con una pipeta graduada o micropipeta en el centro de la placa y luego se disemina el inóculo en la superficie del medio sólido, mediante: 20 movimientos concéntricos, girando la placa en el sentido de las agujas del reloj; movimientos de vaivén que cubran toda la placa. Las espátulas de Digrafsky se disponen en un vaso de precipitado conteniendo etanol y se esterilizan por flameado. Es el método adecuado para el recuento de colonias y para la realización del antibiograma por el método de difusión (utilizando ansas calibradas y espátula de Digrafsky). [46]



### Capítulo 3: Desarrollo experimental

En esta sección se detalla el desarrollo experimental el cual fue optimizado a razón de los experimentos propuestos. Para ello es importante mencionar que los experimentos se diseñaron y modificaron con el objetivo de obtener resultados reproducibles y confiables, por lo que se realizó el análisis de inhibición del crecimiento de las bacterias en cada uno de los procesos propuestos, con la finalidad de tener un control específico de todas las etapas del proceso experimental.

Pero para conseguir dicha optimización es necesario reducir los errores experimentales debido al instrumental usado durante el proceso, dicho esto es necesario llevar a cabo la esterilización de todo el material a utilizar el cual se enlistan en la tabla 3.1:

**Tabla 3.1** Materiales usados para la preparación de soluciones de nanopartículas a diferentes concentraciones.

Material
4 viales de 5 mL
4 pastillas de agitación
Espátula de metal
Discos de papel filtro de 1 cm de diámetro

**Tabla 3.2** Material utilizado para la siembra de las bacterias.

Material
Asa digralsky
Micropipeta
Puntas de capacidad variable (20, 200 y 1000 µl)
Mechero
Cajas de Petri desechables

Tubos de cultivo
Matraces (250 y 500 mL)

### Procedimiento para esterilizar

El método de esterilización consta de colocar agua en la autoclave hasta el borde de la rejilla sin que se moje el material, posterior a ello se ingresa todo el instrumental que va a ser utilizado durante todo el experimento (ver listado anterior), una vez hecho esto se sella de manera correcta. La autoclave que se mantiene a una presión de 15 lb a 121°C, manteniendo estas condiciones durante 20 minutos a fin de controlar y mantener constantes estos valores. Pasado dicho tiempo, esperar a que la presión baje a 0 para poder abrir la autoclave.

**Tabla 3.3** Material utilizado para la preparación del medio de cultivo.

<b>Reactivos</b>
Peptona de caseína (MCD LAB)
Extracto de levadura (BD Bioxon)
Cloruro de sodio (J.T. Baker)
Agar bacteriológico (BD Bioxon)

### Procedimiento para medir pH

Para medir el pH del medio Lb o de cualquier otra solución con el conductímetro primero debemos calibrarlo. Por lo tanto, iniciamos encendiendo el equipo y colocando el electrodo en la solución de referencia 7, se deja dentro hasta que el equipo nos marque que está registrado, procedemos a enjuagar el electrodo con agua destilada y secar cuidadosamente. Ahora colocamos el electrodo en la solución de referencia 4 y se retira hasta después de que el equipo nos indique que se encuentra registrado, enjuagamos

con agua destilada y secamos. Finalmente colocamos el electrodo en el medio Lb, si el pH es menor a 7 añadir gotas de NaOH hasta obtener el pH deseado, en caso contrario se ajusta con HCl.

### **Proceso de preparación del caldo de cultivo**

Iniciamos calculando la cantidad de medio Lb a preparar, es importante recordar que por cada litro de medio Lb se necesitan 10 g de peptona, 5 g de extracto de lavadura, 10 g de cloruro de sodio y 15 g de agar, dependiendo de la cantidad a preparar se hacen las operaciones necesarias para calcular las cantidades correspondientes. Dependiendo de la cantidad a preparar, primero procedimos a medir aproximadamente 50 mL menos de los mililitros que deseamos preparar de agua tridestilada en un vaso de precipitados de 1 litro y le añadimos la peptona, extracto de levadura y NaCl pesados anteriormente en una balanza analítica, y colocamos en agitación magnética. Una vez que la mezcla se observa homogénea procedemos a medir el pH con el conductímetro, ajustándolo con gotas de NaOH hasta que el pH fuera de 7. Teniendo el medio con el pH deseado se procedió a verter en una probeta de 1 litro y se aforo a los mililitros con agua tridestilada que inicialmente queríamos preparar.

Si el medio Lb es para placas: para esterilizar el medio Lb se divide en los matraces Erlenmeyer necesarios respetando la regla de no colocarle más de la tercera parte de su capacidad, calculamos los g de agar a agregar a cada matraz. Finalmente le colocamos un tapón y aluminio para esterilizar en limpio como se explicó en los métodos. Una vez que el medio Lb es esterilizado esperamos el tiempo suficiente para poder verter en las cajas Petri, en la campana y con el mechero encendido. Vertido el medio las acomodamos alrededor del mechero y con el suficiente cuidado las abrimos para que el agar realizara su trabajo y gelatinizara el medio Lb. Una vez frías procedimos a cerrarlas, asegurarlas con cinta y etiquetarlas con la leyenda "Lb s/ab fecha". Las ingresamos a la prueba de esterilidad que consistió en poner las placas en un horno a 37 °C por 12 horas, pasado ese tiempo las observamos cuidadosamente y si no existía crecimiento bacteriano eran útiles para el experimento, en caso contrario tendríamos que desecharlas y realizar más placas. Se recomienda refrigerarlas a 4°C hasta que se utilicen.

Si el medio Lb es para tubos: con una pipeta graduada se colocó 5 mL de medio Lb a cada tubo previamente etiquetado con la leyenda "Lb s/ab fecha", al colocarles la tapa no se cerraron por completo para que se esterilizaran de manera correcta a 120°C y 15 lb de presión. Después de esterilizar se ingresaron a la prueba de esterilidad, después de ese tiempo analizamos los tubos y corroboramos que no existiera crecimiento bacteriano para poder utilizarlos en el experimento.

### **Procedimiento detallado del cultivo de bacterias**

De un cultivo de bacterias de E. coli (cepa DH5α) se tomaron 30 µl y se adicionaron en un tubo con medio Lb sin antibiótico y se colocó en incubación a 30°C y 150 rpm, durante 12 horas. A partir de ese tubo se tomaron 100 µl y se añadieron a un tubo nuevo con medio Lb sin antibiótico nuevamente a incubación por 12 horas a 30°C y 150 rpm, pasadas las 12 horas ya tenemos las bacterias en crecimiento, es decir son aptas para utilizarse en la experimentación.

### **Propuestas de ensayos y proceso de optimización de los experimentos de inhibición.**

#### **Experimento 1: Cajas Petri y círculos de papel filtro con 15 µg/mL de Np**

Para llevar a cabo el primer experimento fue necesario preparar el material para trabajar, en primer lugar, las cajas Petri que es donde sembramos las bacterias y analizamos el crecimiento bacteriano, por lo tanto, calculamos la cantidad de medio Lb a preparar para las cajas Petri, en este caso 600 mL. Para preparar 600 mL de medio Lb pesamos 6 g de peptona, 3 g de levadura y 6 g de NaCl en la balanza analítica. Procedimos a medir 500 mL de agua tridestilada en un vaso de precipitados de 1 litro y le añadimos la peptona, extracto de levadura y NaCl pesados anteriormente, y colocamos en agitación magnética. Una vez que la mezcla se observa homogénea procedemos a medir el pH con el conductímetro, ajustándolo con gotas de NaOH hasta que el pH fuera de 7. Teniendo el medio con el pH deseado se procedió a verter en una probeta de 1 litro y se aforo a 600

mL con agua tridestilada. Para esterilizar el medio Lb se dividió en dos matraces Erlenmeyer de 500 mL colocándole 300 mL y 4.5 g de agar a cada uno, le colocamos un tapón y aluminio para esterilizar en limpio durante 15 minutos a 15 lb a 120 °C.

Una vez que el medio Lb es esterilizado esperamos el tiempo suficiente para poder verter en las cajas Petri, en la campana y con el mechero encendido. Vertido el medio las acomodamos alrededor del mechero y con el suficiente cuidado las abrimos para que el agar realizara su trabajo y gelatinizara el medio Lb. Una vez frías procedimos a cerrarlas, asegurarlas con cinta y etiquetarlas con la leyenda "Lb s/ab SRC 25.03.24". Las ingresamos a la prueba de esterilidad que consistió en poner las placas en un horno a 37 °C por 12 horas, pasado ese tiempo las observamos cuidadosamente y si no existía crecimiento bacteriano eran útiles para el experimento, en caso contrario tendríamos que desecharlas y realizar más placas. Se recomienda refrigerarlas a 4°C hasta que se utilicen.

Por otro lado, para la preparación del papel filtro, se propuso utilizar papel filtro de porosidad media, del cual se recortaron 30 círculos de 1 cm de diámetro con guantes y tijeras debidamente desinfectadas en un área estéril, se procedió a colocarlos en una caja Petri para su esterilización a 120 °C y 15 lb de presión.

Para la preparación de la solución de las nanopartículas (NP) de ZnO las cuales se sintetizaron en el laboratorio de síntesis y depósito de nanomateriales, se pesaron 0.050 g de cada tipo de Np de ZnO (D1R, D2R, D3R y D4R) y se añadieron a cada vial previamente esterilizado y con la pastilla de agitación dentro, se añadieron 5 mL de agua estéril y se colocó en agitación magnética durante 1 hora, posteriormente se colocó en ultrasonido a baño maría durante una hora más.

A cada placa se le coloco un nombre distintivo. De los 4 tipos de NP de ZnO hicimos 3 repeticiones, además de otras 3 con agua (control negativo), 3 con Gentamicina (control positivo), 1 con la cepa DH5 $\alpha$  y una más con el papel filtro.

El procedimiento propuesto para sembrar las bacterias fue el siguiente, en una campana y en un medio estéril abrimos el tubo de ensayo con las bacterias DH5 $\alpha$  y con una micropipeta se toman 100  $\mu$ l y se colocan en el centro de una caja Petri, que se esparcieron con un asa digralsky previamente esterilizada.

Para la colocación de las nanopartículas se tomó una alícuota de 15  $\mu\text{l}$  de la solución de nanopartículas preparada previamente y se colocó en un disco de papel filtro previamente esterilizado que se colocó con cuidado en medio de la caja Petri. Se hizo el mismo procedimiento con agua (control negativo) y gentamicina (control positivo). Una vez sembradas las nanopartículas y los controles (positivo y negativo) se incubaron en un horno a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 12 horas. Pasadas las 12 horas observamos los resultados que analizaremos en el siguiente capítulo.

## **Experimento 2: Tubos de ensayo con 5 mL de medio Lb y Np en solución a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$**

Debido a que en el experimento anterior no se observó inhibición, procedimos a experimentar con tubos con medio Lb sin antibiótico como se describe a continuación.

Para este experimento preparamos medio Lb para 50 tubos de ensayo (cada uno con 5 mL de medio Lb), realizando las operaciones necesarias pesamos en la balanza analítica 2.5 g de peptona, 1.75 g de extracto de levadura y 2.5 g de NaCl. Se midió 200 mL de agua tridestilada y se añadió a un vaso de precipitados con capacidad de 500 mL, posteriormente se le agregó la peptona, el extracto de levadura y NaCl pesados para posteriormente colocarle una pastilla de agitación y poner la mezcla en agitación magnética. Una vez que la mezcla se observa homogénea se procedió a medir el pH con el conductímetro y ajústalo a 7 con gotas de NaOH. Se procedió a verter la mezcla en una probeta graduada y se aforo a 250 mL. Con una pipeta graduada se colocó 5 mL de medio Lb a cada tubo, al colocarles la tapa no se cerraron por completo para que se esterilizaran de manera correcta a  $120^{\circ}\text{C}$  y 15 lb de presión. Después de esterilizar se ingresaron a la prueba de esterilidad en donde se ingresan a un horno a  $37^{\circ}\text{C}$  por 12 horas, después de ese tiempo analizamos los tubos y corroboramos que no existiera crecimiento bacteriano para poder utilizarlos en el experimento.

Para la preparación de la solución de las NP de ZnO utilizamos 4 viales con capacidad de 5 mL y 4 pastillas de agitación previamente esterilizados que etiquetamos como D1R, D2R, D3R y D4R respectivamente a cada vial. Pesamos de cada tipo de Np 0.050 g en la balanza analítica y en la campana en un medio estéril los añadimos a cada vial

correspondiente, posteriormente añadimos 5 mL de agua estéril y colocamos en agitación magnética durante 24 horas.

El método para sembrar las bacterias consistió en abrir el tubo de ensaye con las bacterias en la campana en un medio estéril, del cual se tomaron 100  $\mu$ l de DH5 $\alpha$  y se colocaron a cada uno de los 18 tubos con medio Lb sin antibiótico que se utilizaron en el experimento.

El procedimiento que se siguió para colocar las nanopartículas en los tubos con medio Lb sin antibiótico consistió en colocar con una micropipeta 50  $\mu$ l de la solución de las nanopartículas previamente preparadas por triplicado, es decir 3 tubos con nanopartículas de D1R, 3 tubos con nanopartículas de D2R, y así sucesivamente con las nanopartículas D3R y D4R, además del triplicado con 2.5  $\mu$ l de gentamicina (control positivo) y 3 tubos más sin antibiótico, solo con los 100  $\mu$ l de DH5 $\alpha$  (control negativo). Todos los tubos se etiquetaron debidamente y se incubaron por 14 horas a 37°C y 150 rpm. Posteriormente se observaron los resultados.

### **Experimento 3: Tubos de ensayo con 5 mL de medio Lb y Np en solución a 15 $\mu$ g/mL**

En el experimento anterior no se observó inhibición por el hecho de que los  $\mu$ l agregados de nanopartículas no tomaban en cuenta los 5 mL de medio Lb, por lo cual se procedió calcular los mililitros necesarios para tener una concentración de 15  $\mu$ g/mL en un tubo con 5 mL de medio Lb, de acuerdo con los cálculos realizados se encontró que era necesario agregar 0.375 mL (375  $\mu$ l) de un stock de 200  $\mu$ g/mL.

En este experimento para la preparación de las soluciones de las nanopartículas se pesaron en la balanza analítica 0.4 g de cada tipo de nanopartícula (D1R, D2R, D3R y D4R) y se agregaron a cada vial que previamente fue esterilizado y etiquetado, se le añadió 2 mL de agua estéril y se colocaron en agitación magnética durante 24 horas.

En la siembra de las bacterias (DH5 $\alpha$ ) se realizó en la campana en un medio estéril, donde se tomaron 100  $\mu$ l del cultivo de bacterias y se añadió a un tubo con medio Lb sin antibiótico que previamente fue esterilizado, se prepararon 18 tubos en total.

Para la colocación de las nanopartículas se tomó de cada vial 375  $\mu$ l con una micropipeta y se colocó a el tubo con 5 mL de medio Lb al que previamente se le colocaron las

bacterias, esto por triplicado, es decir 3 tubos con D1R, 3 tubos con D2R y así consecutivamente para D3R y D4R. Para el control positivo se colocó 2.5 µl de gentamicina por triplicado y no se colocó el control negativo (3 tubos con solo las bacterias). Cada tubo fue debidamente etiquetado y se ingresaron a incubación por 14 horas a 37°C a 150 rpm, posteriormente se fotografiaron los resultados.

#### **Experimento 4: Tubos de ensayo con 5 mL de medio Lb y Np en solución a 15 µg/mL**

En el experimento anterior no fue posible observar solo en los tubos si existía inhibición o no, por lo tanto, se decidió plaquear 100 µl de cada tubo para poder observar claramente si las nanopartículas funcionaban como inhibidor o no.

Para este experimento en primera instancia se preparó el material a utilizar, que son placas y tubos con medio Lb, para ello calculamos los g de peptona, extracto de levadura y NaCl necesarios para 50 tubos y 18 placas aproximadamente. Calculamos que aproximadamente prepararíamos 750 mL de medio Lb por lo cual pesamos en la balanza analítica 7.5 g de peptona, 3.75 g de extracto de levadura y 7.5 g de NaCl. En un vaso de precipitados de 1 litro se midió aproximadamente 600 mL y colocamos la peptona, extracto de levadura y NaCl, para posteriormente colocar la mezcla en agitación magnética. Una vez que se observó una mezcla homogénea procedimos a medir el pH con el conductímetro, si es menor a 7 ajustamos con unas gotas de NaOH cuidadosamente. Con una probeta graduada aforamos la mezcla a 750 mL, posteriormente vertimos en un matraz Erlenmeyer de 500 mL de capacidad 250 mL de medio Lb, en otro matraz de 250 mL le colocamos 150 mL de medio Lb y en otro matraz de 200 mL le vertimos 100 mL de medio. Calculamos para la cantidad contenida en cada matraz los g de agar a adicionar, por lo cual pesamos 3.75 g, 2.25 g y 1.5 g de agar respectivamente para cada matraz. Finalmente, se le colocó un tapón y se cubrió con aluminio para esterilizar a 15 lb de presión a 120°C.

Con el restante de medio Lb (250 mL) haciendo uso de una pipeta graduada colocamos 5 mL de medio Lb en cada tubo de ensayo, hasta tener los 50 tubos. Cada tubo no lo cerramos por completo para que puedan esterilizarse correctamente a 15 lb de presión y

120°C. Una vez esterilizados los ingresamos a la prueba de esterilidad por 12 horas, pasado el tiempo los ingresamos a refrigeración a 4°C hasta que se utilizaron.

El medio Lb esterilizado y a temperatura caliente pudiendo ser manipulado en una campana y en medio estéril se vertió cuidadosamente en las cajas Petri, solo al matraz de 100 mL se le agrego 25 µl de gentamicina (para las placas de control negativo) y se dejó por unos minutos enfriar hasta que el agar gelatinizará, hecho esto se procedió a cerrarlas, asegurarlas con cinta y etiquetarlas de manera correcta con fecha y nombre respectivamente. Por último, se ingresaron a la prueba de esterilidad que consiste en ingresarlas a un horno a 37°C durante 12 horas, pasado el tiempo se observa con detenimiento placa por placa para corroborar que no existió crecimiento bacteriano, de lo contrario se desecharían, se procedieron a refrigerar a 4°C hasta que se utilizaran.

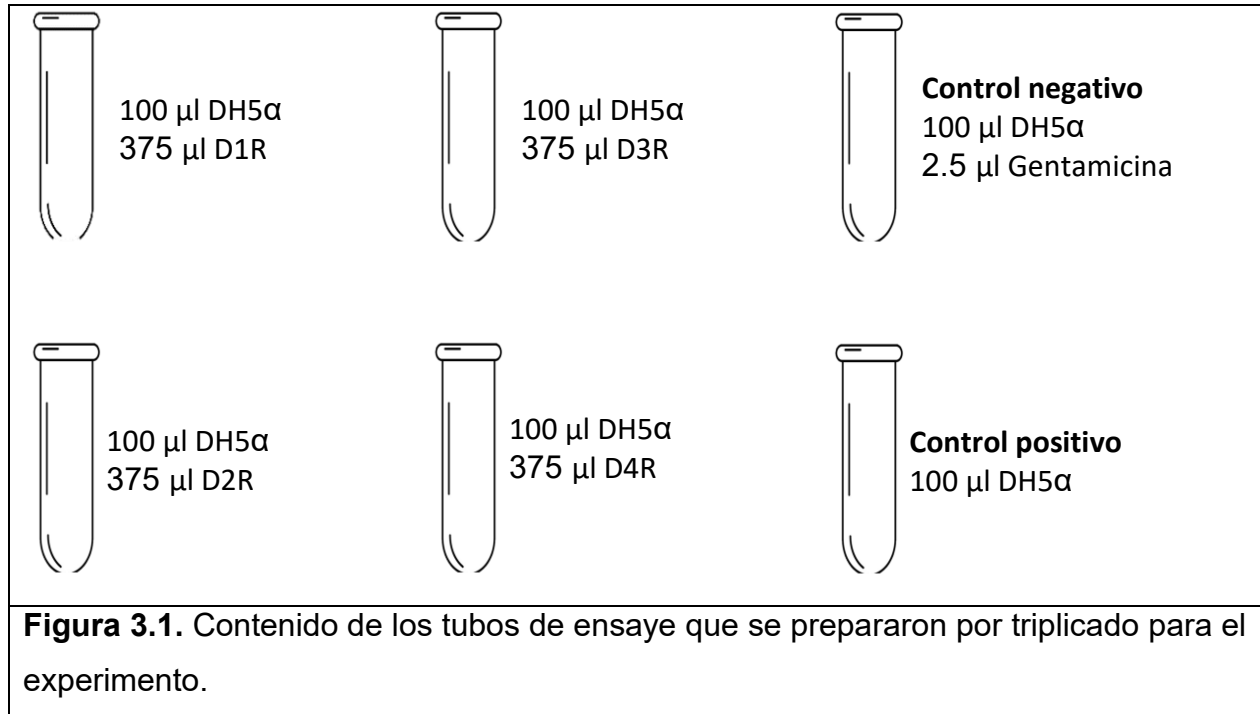
El método utilizado para la preparación de las soluciones de las nanopartículas de ZnO fue utilizar los viales y pastillas de agitación previamente esterilizados y etiquetados como D1R, D2R, D3R y D4R, para cada tipo de nanopartícula pesamos 0.4 g en la balanza analítica y con cuidado se vertieron en los viales respectivamente, se le añadieron 2 mL de agua estéril a cada uno y se cerraron para posteriormente colocarlos en agitación magnética por 24 horas.

El experimento consistió en 4 fases descritas a continuación:

Primera fase (precultivo): en la campana y en medio estéril a un tubo con medio Lb sin antibiótico se le colocaron 30 µl de la cepa DH5α y se colocó en incubación a 30°C a 150 rpm durante 14 horas.

Segunda fase (cultivo): transcurridas las 14 horas del precultivo en la campana en un medio estéril con una micropipeta se tomaron 100 µl y se colocaron en un tubo nuevo con medio Lb sin antibiótico, que posteriormente fue colocado en incubación a 30°C, 150 rpm durante 12 horas. Transcurrido el tiempo del tubo con el precultivo se tomaron 100 µl y se colocaron a un nuevo tubo con medio Lb sin antibiótico, este procedimiento se repitió 18 veces en los tubos que previamente se prepararon para el experimento, a 3 tubos se le añadieron 375 µl a cada uno de la solución previamente preparada D1R, a otros 3 tubos se le añadieron 375 µl a cada uno de la solución D2R y así sucesivamente se prepararon 3 tubos para la solución de D3R y D4R. Para el control negativo se les añadieron a 3 tubos 2.5 µl de gentamicina a cada uno y para el control positivo los 3 tubos

solo se quedaron con los 100  $\mu$ l de la cepa DH5 $\alpha$  que se añadieron previamente (observar figura 3.1).



Todos los tubos debidamente etiquetados se ingresaron a la incubadora a 30°C a 150 rpm durante 12-14 horas.

Tercera fase: transcurridas las 12 horas, sacamos los tubos de la incubadora y fotografiamos. Procedimos sembrar 100  $\mu$ l de cada tubo a una caja Petri, teniendo 18 cajas Petri, formamos grupos por triplicado del control positivo, control negativo, D1R, D2R, D3R y D4R. Las ingresamos a incubación a un horno a 37°C por 24 horas.

Cuarta fase: pasadas las 24 horas sacamos las placas del horno y las evaluamos, tomando fotografías de cada una.

El experimento lo realizamos 3 veces más para comprobar que es replicable.

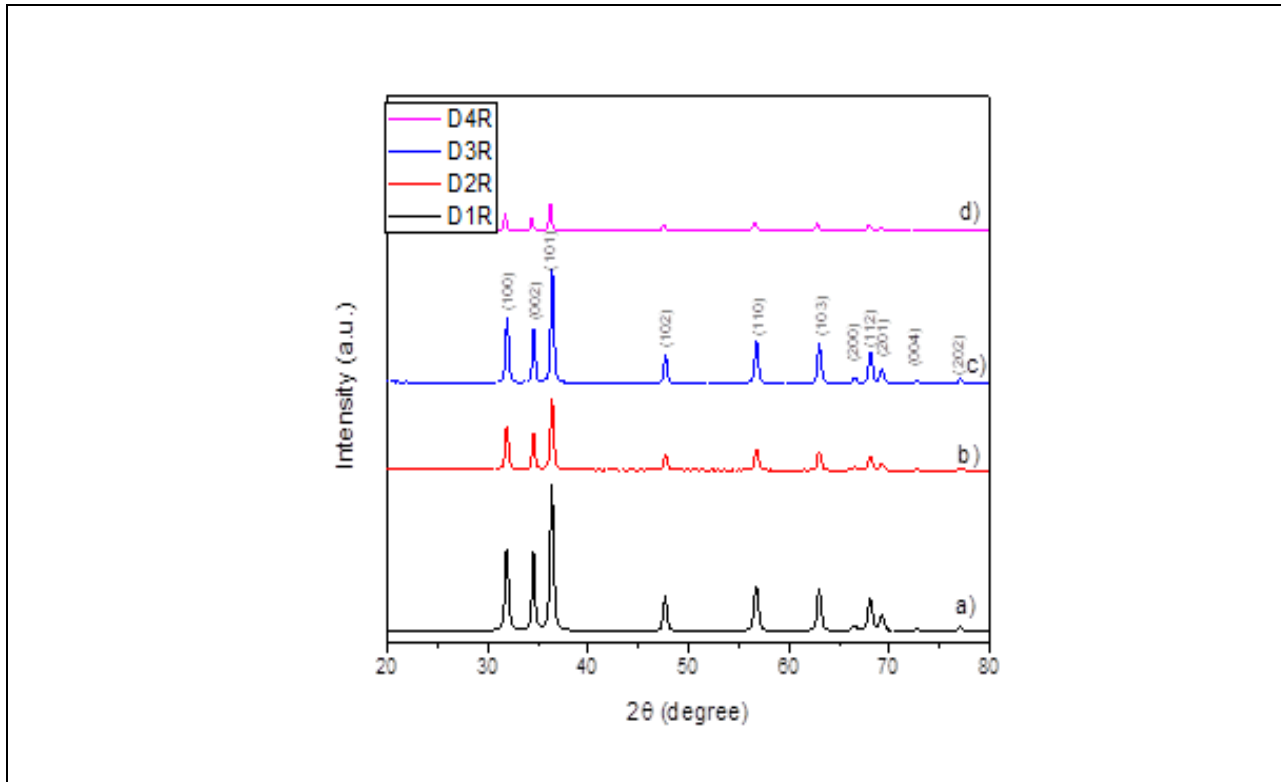
## Capítulo 4: Resultados y discusión

### 4.1 Caracterización de las Nps de ZnO

Para la caracterización estructural del material obtenido a través de la síntesis coloidal fue mediante la técnica de difracción de rayos X utilizando un difractómetro Bruker D8-Discover con una radiación  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 0.15418 \text{ nm}$ ) desde  $20^\circ < 2\theta < 80^\circ$ , operado a 40 mA y 40 kV. Por otro lado, para la obtención de las micrografías de HRSEM, se utilizó un microscopio de barrido de alta resolución Carl Zeiss, mientras que para la fotoluminiscencia se usó un espectrofotómetro Sciencetech modelo 6040.

#### 4.1.1 Caracterización estructural por difracción de rayos X (DRX)

De la caracterización de las nanopartículas a través de la técnica de XRD se pudo identificar de manera concreta los picos relacionados a los planos cristalográficos 100, 002, 101, 102, 110, 103, 200, 112, 201, 004, y 202 correspondientes al ZnO hexagonal tipo wurtzita los cuales fueron comparados con la ficha cristalográfica PDF JCPDS 36–145, con ello también podemos observar que no existe ningún pico en el patrón de difracción que nos pudiese predecir la presencia de subproductos de reacción que hubiesen co-precipitado con nuestro material de interés en cada una de las concentraciones propuestas en este trabajo .



**Figura 4.1.** Patrones de difracción de rayos-X de a) D1R, b) D2R, c) D3R y d) D4R respectivamente.

De igual manera con ayuda de los patrones de difracción se lograron obtener los tamaños de cristal para cada una de las muestras obtenidas para el presente trabajo de tesis. La tabla 4.1 resume los datos correspondientes los cuales fueron obtenidos a través del uso de la fórmula de Sherrer.

$$D = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta}$$

Donde **D**, es el tamaño de cristal promedio, **K** es la constante de Sherrer (0.9), **λ** es la longitud de onda de los rayos X (1.54056 Å), **β** es el ancho medio del pico de difracción o por sus siglas en inglés conocido como FWHM y por último **θ**, se define como el ángulo de difracción de Bragg.

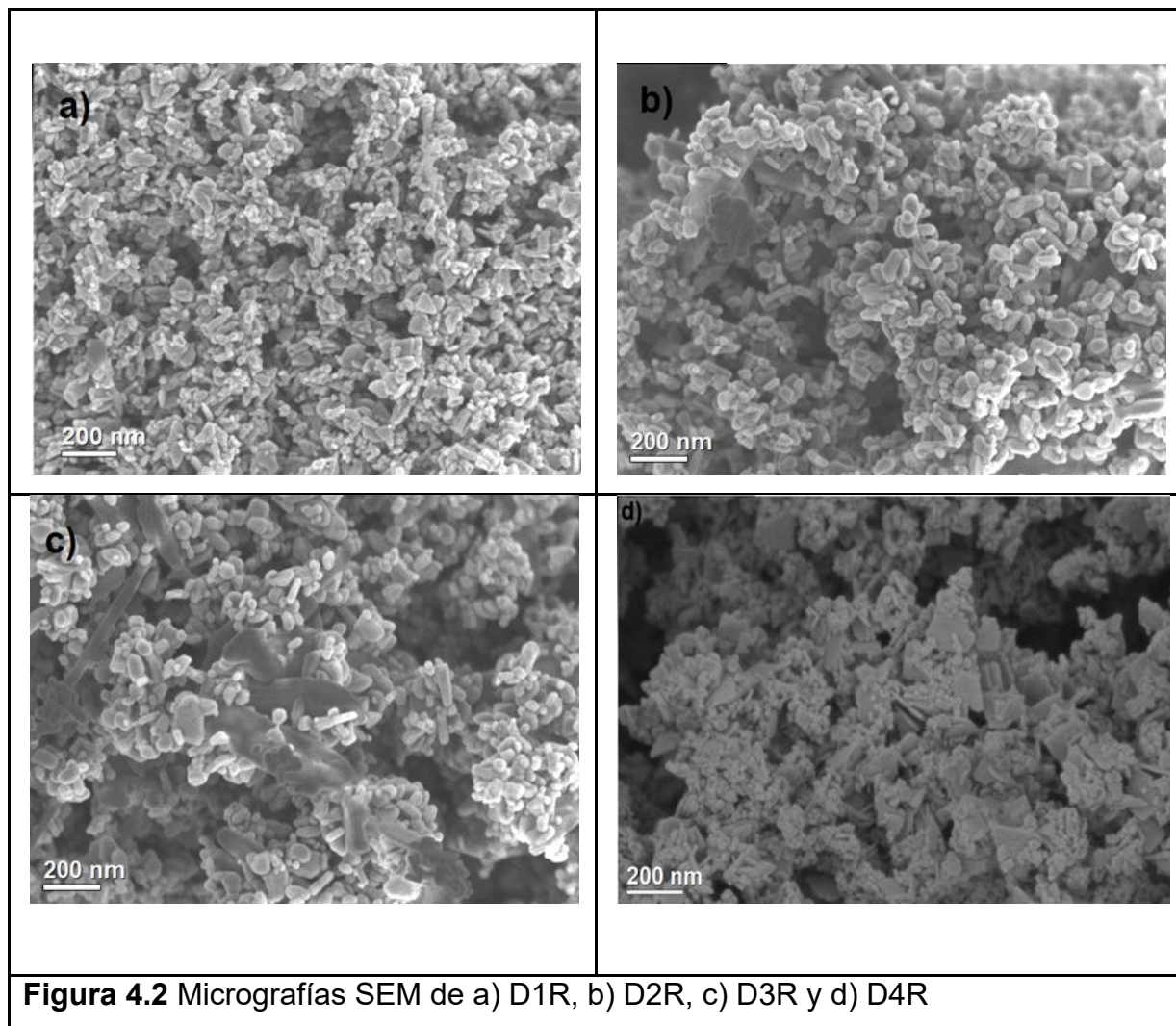
**Tabla 4.1** Tamaños de cristal promedio calculados para cada una de las muestras.

Muestra	Tamaño de cristal promedio (nm)
D1R	27
D2R	18.2
D3R	25
D4R	20.4

Una vez obtenida la información fundamental de la estructura, cristalinidad y tamaño de cristal para cada una de las muestras, y con ello saber si el material es óptimo en tamaño y morfología se propone su análisis topográfico a través de microscopia electrónica de alta resolución.

#### *4.1.2 Caracterización morfológica por microscopia de barrido de alta resolución (HRSEM)*

Con el uso de un microscopio de alta resolución, se realizaron las caracterizaciones correspondientes para cada una de las muestras obtenidas a diferentes concentraciones, obteniéndose las siguientes micrografías donde se puede observar que de alguna manera el cambio en la concentración en el precursor de Zn (0.1-0.4M) influye en las características morfológicas y de tamaño de las nanopartículas de ZnO.



**Figura 4.2** Micrografías SEM de a) D1R, b) D2R, c) D3R y d) D4R

En la figura 4.2 se puede observar las diferencias entre morfologías entre las muestras D1R y D2R (figura 4.2a y b), se ve una distribución de tamaño de las nanopartículas cuasi similar, pero en la muestra 4.2a existe una mezcla de partículas con forma triangular y con otras elongadas en comparación con la muestra 4.2b donde solo la forma elongada es observada con partículas de mayor tamaño. En comparación de la muestra D3R (figura 4.2c) donde se logra apreciar que las partículas son más grandes, es decir hay una mezcla de tamaños nanométricos con micrométricos y no se logró notar la presencia de las partículas con formas triangulares. Por último, al analizar la figura 4.2d correspondiente a la muestra D4R, se logra ver que existe una mayor presencia de partículas triangulares y una menor cantidad de nanopartículas elongadas; este cambio

en la distribución morfológica podría estar asociada al incremento en la concentración del precursor de Zn.

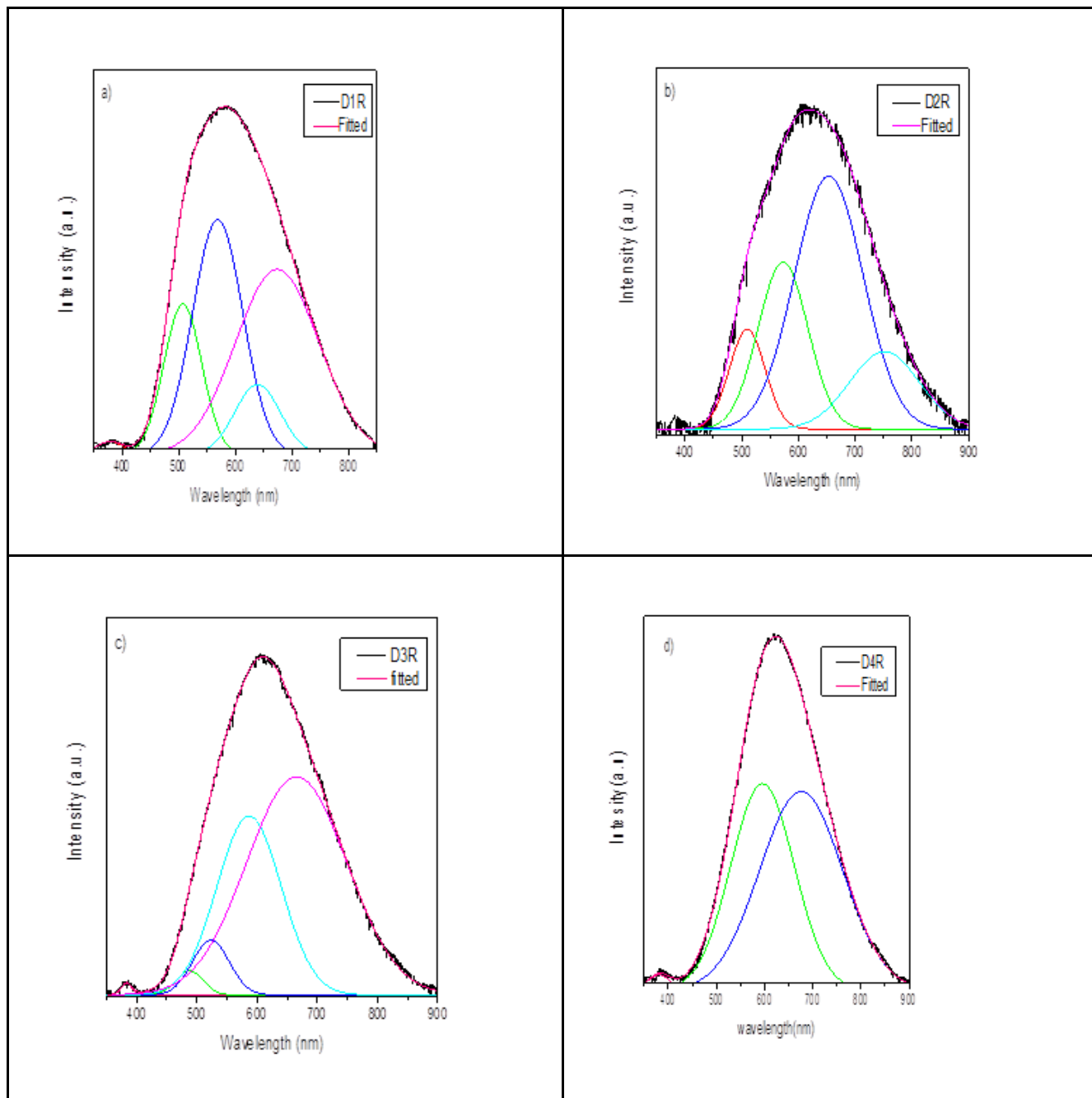
De los resultados obtenidos a través de RX y de HRSEM se pudo observar que el material posee buenas características para poder ser aplicadas en la inhibición microbiológica las cuales podrían complementarse con los análisis de las propiedades ópticas del material las cuales se detallan a continuación.

#### *4.1.3 Caracterización óptica por fotoluminiscencia (FL)*

Una de las técnicas que nos permite identificar de manera específica las propiedades ópticas del material es la técnica de fotoluminiscencia, a través de ella podemos identificar los defectos intrínsecos de las nanopartículas, los cuales están asociadas a los fenómenos de absorción-emisión de la materia con la luz. Como ya se ha mencionado en la literatura el ZnO muestra dos emisiones principales una de ellas aparece usualmente en la región del ultravioleta (UV), mientras que la otra aparece en la región del visible (Vis) del espectro electromagnético.

Por ejemplo, la emisión banda-banda está localizada en  $\sim 380$  nm y se relaciona con la recombinación de los excitones libres, mientras que la emisión en la región del visible que va de (440-850) es correlacionado a las recombinaciones radiactivas debido a los defectos nativos, esos defectos asociados a niveles localizados dentro de la banda prohibida se han asociado con vacancias sencillas de oxígeno y vacancias doblemente ionizadas de oxígeno ( $V^*o$ ,  $V^{**}o$ ), , vacancias de zinc ( $V_{zn}$ ), oxígenos intersticiales ( $O_i$ ), zincs intersticiales ( $Zn_i$ ), anti-sitios de oxígeno ( $O_{zn}$ ) y anti-sitios de zinc ( $Zn_o$ ), así como también los clústeres nativos de  $V_oZn_i$  [43].

De los espectros obtenidos a partir de la técnica de FL de la figura 4.3 a, b, c y d con su respectiva deconvolución se pudieron identificar los defectos que contribuyen a cada una de esas emisiones, como lo es la emisión banda a banda, las transiciones  $CB \rightarrow V_o$ , complejos de  $V_oZn_i$ ,  $V_o$ , los cuales se resumen en la tabla 4.2.



**Figura 4.3** Espectros de fotoluminiscencia obtenidos para las muestras: a) D1R, b) D2R, c) D3R and d) D4R

**Tabla 4.2** Defectos intrínsecos de ZnO obtenidos a través del espectro deconvolucionado de PL para D1R, D2R, D3R y D4R respectivamente.

Defectos de transición	D1R (nm)	D2R (nm)	D3R (nm)	D4R (nm)
NBE (emisión banda-banda)	378	381	383	380
Vo	-	-	487	-
CB→Vo	507, 586	509	-	-
CB-Vo or CB-O* O**	-	-	523	-
VoZni complejos	-	572	-	-
Vo recombinación de excitones	-	-	586	595
Vo	639,674	653, 751	665	675

A partir de lo reportado en la literatura es importante mencionar que a través de la determinación de los defectos y su contribución en el pico máximo de emisión se podría hipotetizar si las muestras son viables en su aplicación en actividades fotocatalíticas o antibacterianas ya que la presencia de los defectos nativos asociados al oxígeno contribuye fuertemente a dichas actividades.

#### *4.2 Inhibición bacteriana*

Con los resultados obtenidos a través de la estructura, morfología y las propiedades ópticas del material sintetizado a diferentes concentraciones del precursor de Zinc, se plantea la aplicación de estos en su estudio como inhibidores bacterianos.

Por ello en el presente trabajo de investigación se propusieron y estandarizaron varios experimentos, con la finalidad de poder determinar si las nanopartículas eran eficientes para esta aplicación.

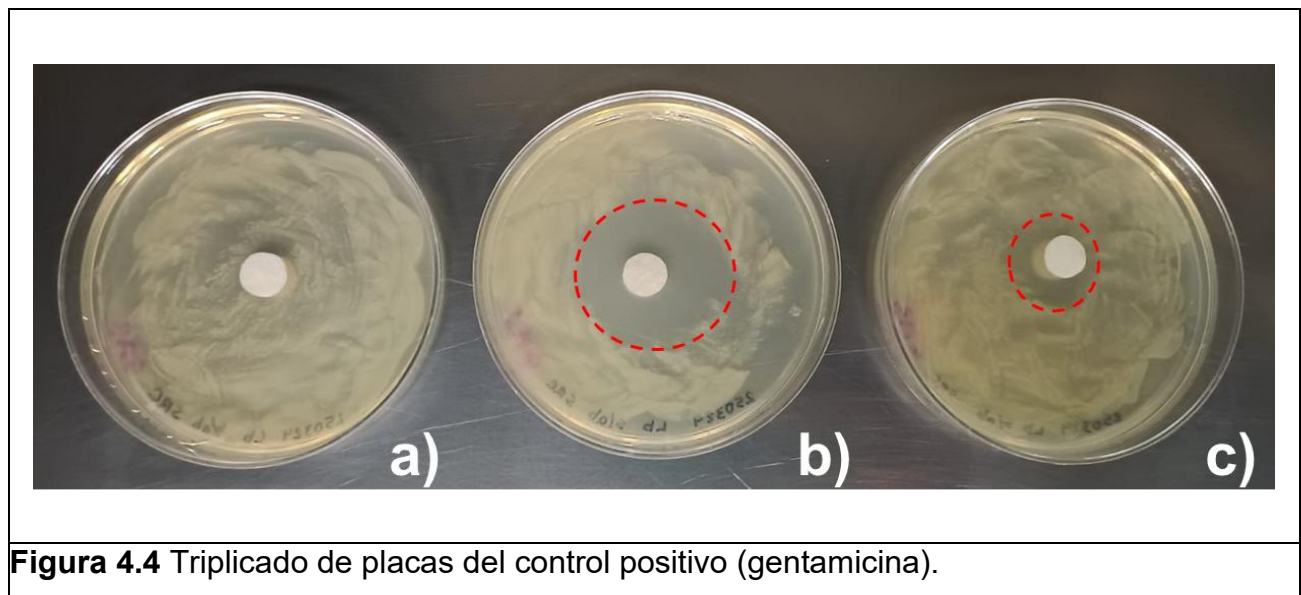
Cada uno de esos experimentos se detallan a continuación.

### 4.2.1 Experimento 1 (difusión en disco)

De la literatura y de las técnicas utilizadas en el grupo de trabajo en primer lugar se propone el método de difusión en disco utilizando el procedimiento que se discutió en el capítulo 3 denominado desarrollo experimental.

#### 4.2.1.1 Cajas Petri y círculos de papel filtro con control positivo (gentamicina) a 15 $\mu\text{g/mL}$

Con el objetivo de validar los resultados de la inhibición de las nanopartículas es imprescindible tener un control positivo (antibiótico), para este trabajo de investigación se usó gentamicina. Algo que es importante mencionar, para que los experimentos se consideren válidos es necesario que se reporte en triplicado (ver figura 4.4), a fin de evaluar la reproducibilidad a través de un halo de inhibición que se busca sea representativo y replicable como se muestra en la figura 4.4. En este caso, el halo es más notable en la placa 4.4b, seguido de la 4.4c, sin embargo, en la placa 4.4a no se logra observar.



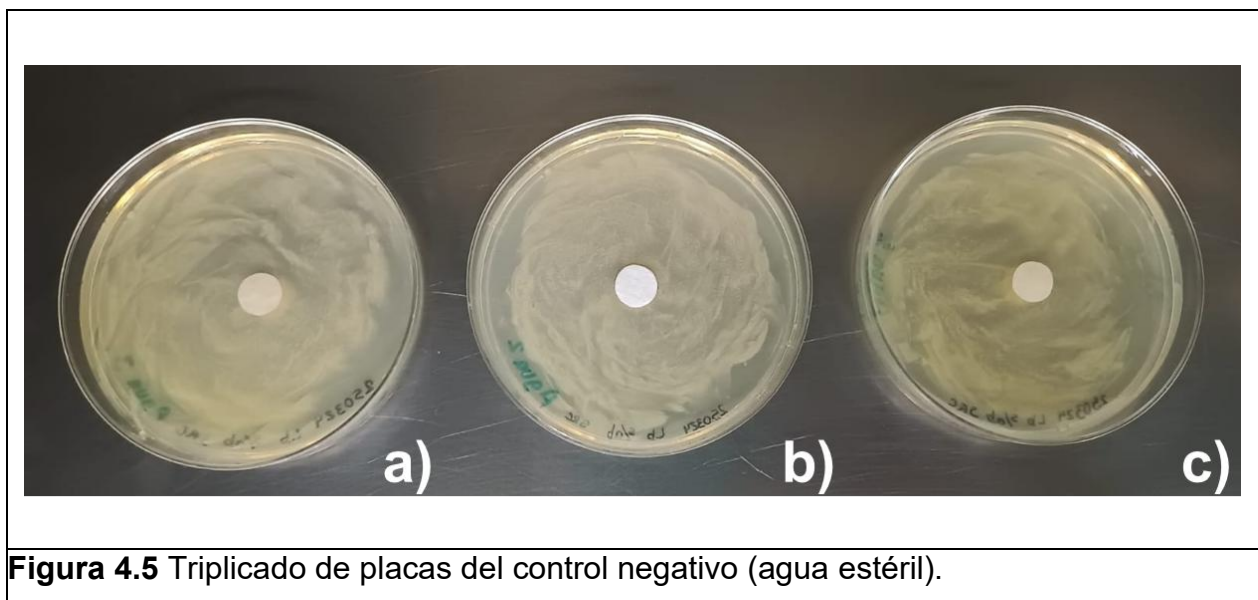
**Figura 4.4** Triplicado de placas del control positivo (gentamicina).

Aunque era de esperarse que en las 3 se notara, en este caso no se logró debido a que el procedimiento de inmersión del disco no fue óptimo.

Continuando con el procedimiento experimental, también es imprescindible durante el proceso de optimización el realizar un complemento de esta serie de experimentos a través de un control negativo con los discos, como se detalla a continuación.

#### 4.2.1.2 Cajas Petri y círculos de papel filtro con control negativo (agua estéril)

Para analizar los resultados de la inhibición también es fundamental tener un control negativo, es decir un experimento diseñado donde las bacterias no son inhibidas y crecen deliberadamente. En el experimento utilizamos agua estéril como control negativo, con ello poder demostrar que el agua utilizada en la preparación de la solución de la dispersión de las nanopartículas no jugaba un papel fundamental en el efecto de inhibición como se observa en la figura 4.5



**Figura 4.5** Triplicado de placas del control negativo (agua estéril).

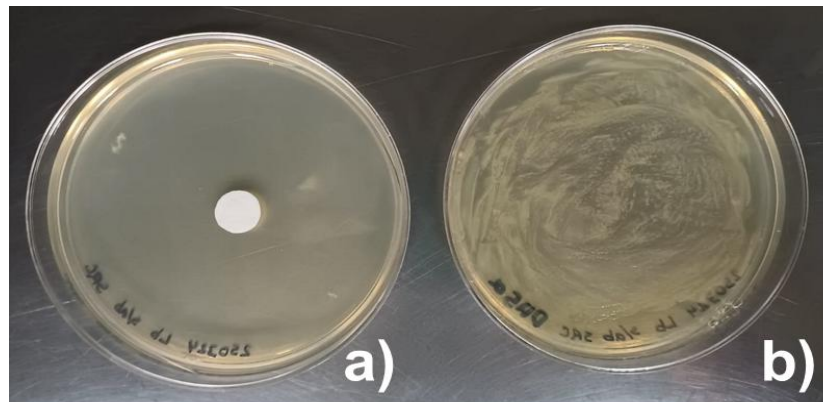
Como era de esperarse las bacterias no forman ningún halo de inhibición alrededor de los círculos de papel los cuales solo fueron sumergidos en agua únicamente, sin embargo, se logran observar pequeños espacios en donde carece de crecimiento

bacteriano dentro de la placa de cultivo, pero este efecto se puede atribuir a la dispersión de las bacterias con el asa de drigalsky.

Una vez garantizado la optimización del control positivo y control negativo es necesario también realizar una prueba sin la presencia de ellos con el fin de observar y analizar si no existen otro tipo de interferencias asociadas a los materiales utilizados (discos). Lo cual se detalla a continuación.

#### 4.2.1.3 Cajas Petri sin control positivo y negativo

Por otro lado, también se analiza únicamente el papel filtro, para corroborar que no tiene interferencia alguna en el estudio (ver figura 4.6a) se colocó en una placa un círculo de papel filtro seco y estéril. Una vez sumergido en el caldo de cultivo y pasado el tiempo de crecimiento bacteriano, se pudo observar que no hubo crecimiento bacteriano, es decir el papel filtro es inocuo y altamente estéril. De manera simultánea, en otra caja Petri (ver figura 4.6b) se plaquearon bacterias sin el papel filtro, logrando observar un crecimiento de bacterias con un comportamiento muy similar al del control negativo (agua).

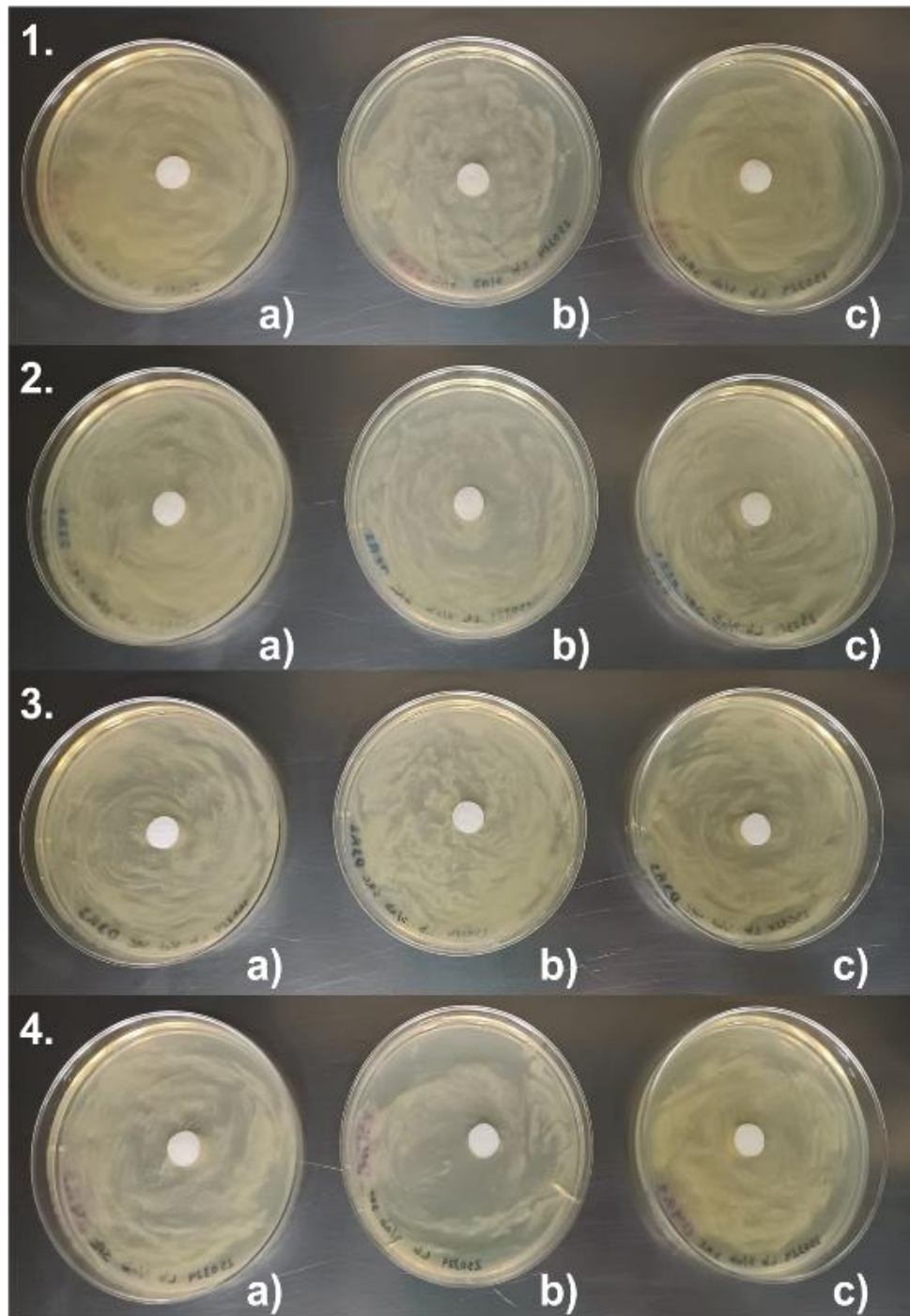


**Figura 4.6** Cajas representativas del Triplicado de placas sin control positivo (a) y negativo (b).

Una vez validado y analizado el método se procede a la aplicación de las nanopartículas de ZnO obtenidas a través de diferentes concentraciones del precursor de Zn. Se propone utilizar una concentración de partículas dispersas en agua similar a la concentración del antibiótico (15 µg/mL).

#### **4.2.1.4 Cajas Petri con las Nps de ZnO D1R, D2R, D3R y D4R a una concentración de 15 µg/ml.**

Siguiendo el procedimiento experimental propuesto (difusión en disco) se toman las alícuotas correspondientes de la solución dispersa de nanopartículas y se colocan en los discos de papel filtro. Una vez realizado ello se siembran las bacterias y se incuban. Terminado el periodo de incubación y crecimiento se analizaron los resultados del triplicado de placas de las nanopartículas de ZnO y su inhibición. De la muestra D1R 1a), 1b) y 1c) (ver figura 4.7), no se logró observar ningún efecto de inhibición de las bacterias, ya que no se observa en ninguna de ellas un halo de inhibición como se esperaría, si bien se logra observar espacios sin crecimiento bacteriano estos se atribuyen a la dispersión de las bacterias en la siembra con el asa digralsky. De igual manera al observar el triplicado de placas de las nanopartículas de ZnO para las muestras D2R y D3R no se observa ningún halo de inhibición. Situación que se repite al observar las placas de las nanopartículas de ZnO etiquetadas como D4R 4a) y 4c), aunque en la figura 4b) logramos ver espacios en la placa en las cuales no tuvimos crecimiento bacteriano, observando con ello un halo de inhibición más marcado, desafortunadamente este resultado no fue reproducible en las 2 placas restantes del triplicado.



**Figura 4.7** Triplicado de placas con Nps de ZnO (15  $\mu\text{g/ml}$ ) D1R (1), D2R (2), D3R (3) y D4R (4).

Es importante mencionar que bajo estas condiciones experimentales no se logró observar de manera clara y específica si las nanopartículas eran eficaces, por ello se propone otro método alternativo al de difusión en disco.

Para ello se plantea el método de turbidez que se detalla a continuación.

#### 4.2.2 Experimento 2 (turbidez): Tubos de ensayo con Lb y Np en solución a 10 µg/mL.

Con el objetivo de comprobar la efectividad de las nanopartículas a través de una estrategia alternativa, ya que como se mencionó anteriormente esta no fue clara a través de la difusión en disco, se propuso a realizar el experimento por turbidez en tubo de ensayo siguiendo una metodología similar a la de placa detallado en el apartado anterior repitiendo el triplicado.

##### 4.2.2.1 Control positivo (gentamicina).

De igual manera en este experimento también se considera el control positivo como se muestra en la figura 4.8.1(a-c), como era de esperarse en el triplicado se notó una transparencia notable, lo que nos asegura que nuestro antibiótico inhibe en su totalidad el crecimiento exponencial de las bacterias *E. coli DH5α* lo cual nos servirá de comparación con las a las muestras de nanopartículas de ZnO.

##### 4.2.2.2 Control negativo (caldo de cultivo más bacterias).

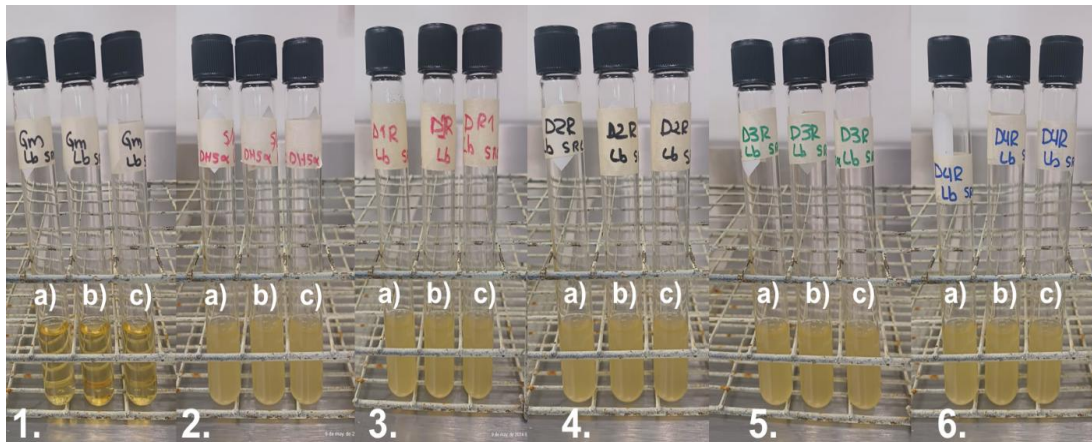
De igual forma nos ayudamos del control negativo con el fin de analizar que no tengamos una interferencia o error experimental en el procedimiento. En contraste con el control positivo, en nuestro control negativo esperábamos que las bacterias se desarrollaran exponencialmente, lo cual se puede confirmar visualmente en los tubos de ensayo correspondientes (ver figura 4.8.2a-c) confirmando nuestra hipótesis.

De manera simultánea a los experimentos con control negativo y positivo se realizan los correspondientes ensayos utilizando las nanopartículas a diferentes concentraciones dispersas en agua estéril.

#### **4.2.2.3 Tubos de ensayo con medio Lb y Nps de ZnO en una solución a 10 µg/mL de las muestras D1R, D2R, D3R y D4R.**

Al no obtener los resultados deseados por difusión en disco se optó por cambiarlo con el proceso de siembra en medio líquido (inoculación en tubo de ensaye) (ver sección 2.2.2 del procedimiento experimental), como ya se comentó anteriormente. Al analizar los resultados obtenidos del triplicado en tubos de ensaye con las nanopartículas de ZnO D1R (fig.4.8.3 a-c), se puede observar a primera vista una turbidez similar a las muestras del control negativo (fig.4.8.2 a-c), lo que nos lleva a la conclusión subjetiva de que no hubo una inhibición pero es importante mencionar que esto puede ser un falso negativo, en otras palabras puede ser por el apantallamiento debido a las partículas disueltas en el medio, ya que se vio que existe el mismo comportamiento con las muestras D2R, D3R y D4R.

Es necesario mencionar que, al analizar el procedimiento utilizado, la concentración de la solución de nuestras nanopartículas estaba a una concentración de 10 µg/mL y a cada tubo de ensaye se le colocaron respectivamente 50 µl sin tomar en cuenta que cada tubo tenía 5 mL de medio Lb, es decir nuestra solución de nanopartículas estaba más diluida (tabla 4.3) respecto al medio de crecimiento, esta es la razón posible por la cual no observamos ningún efecto de inhibición.



**Figura 4.8.** Triplicado de tubos con medio Lb y 100  $\mu\text{l}$  de *E. coli* (*DH5 $\alpha$* ) con el control positivo (gentamicina) (1), control negativo (sin antibiótico) (2), Nps de ZnO (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) D1R (3), D2R (4), D3R (5) y D4R (6).

Tabla 4.3 Identificación de la concentración adecuada de Nps para los ensayos de inhibición de cultivo en líquido (tubos).

$$\frac{(5 \text{ ml}) \left(10 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}\right)}{10 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}} = 5 \text{ ml}$$

$$\frac{(5 \text{ ml}) \left(10 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}\right)}{100 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}} = 0.5 \text{ ml}$$

$$\frac{(5 \text{ ml}) \left(10 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}\right)}{1000 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}} = 0.050 \text{ ml} = 50 \mu\text{l}$$

$10 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$  = concentración final de las disoluciones de Nps de ZnO

5 ml = cantidad de disolución (stock)

10, 100, 1000  $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$  = concentración hipotética de stock de Nps

Es por ello, que se considera realizar unos cambios respecto a esta nueva propuesta, así como se detalla a continuación.

#### 4.2.3 Experimento 3: Tubos de ensayo con Lb y Np en solución a 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Como en el ensayo anterior no se tomaron en cuenta los 5 mL de medio Lb, como consecuencia la concentración en los tubos no era la deseada, por consiguiente, se calculó nuevamente los microlitros a añadir a cada tubo de ensayo para obtener una concentración de 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  acorde al procedimiento experimental, estos cálculos se resumen en la tabla 4.4.

Tabla 4.4 Datos finales del cálculo de la concentración de las Nps.

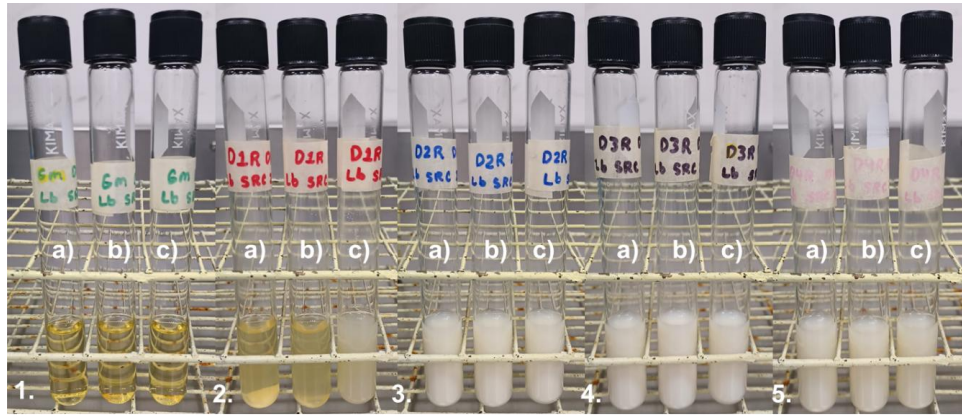
$$\frac{(15 \mu\text{g}/\text{mL})(5 \text{ mL})}{200 \mu\text{g}/\text{mL}} = 0.375 \text{ mL} = 375 \mu\text{l}$$

15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ = concentración de las Nps

5 mL= mililitros del medio Lb en cada tubo

200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ = concentración de las Nps en el stock

Una vez corrigiendo las concentraciones se replicaron los experimentos, los resultados de este ensayo fueron los siguientes (ver fig.4.9): en el triplicado de tubos de la muestra D1R (fig.4.9.2a y 4.9.2b) se observa una precipitación de las nanopartículas, por ello se puede notar que mostraban una ligera transparencia similar a el control positivo (gentamicina), en comparación con la muestra 4.9.2c donde no se logra observar si existió una inhibición debido a la alta turbidez de la muestra (alta dispersión de las nanopartículas). Este mismo comportamiento se presentó en el resto de los triplicados de las muestras etiquetadas como D2R, D3R y D4R.



**Figura 4.9.** Triplicado de tubos con medio Lb y 100  $\mu$ l de *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) con el control positivo (gentamicina) (1), Nps de ZnO (15  $\mu$ g/mL) D1R (2), D2R (3), D3R (4) y D4R (5).

A partir del análisis del experimento realizado (fig.4.9), es complejo llegar a una conclusión definitiva de los resultados obtenidos ya que no es clara si existe o no un efecto inhibitorio y por ello se plantea un segundo ensayo que precede al ya realizado el cual consiste en sembrar 100  $\mu$ l de dichas soluciones (turbidez) en cajas Petri y someterlas a incubación.

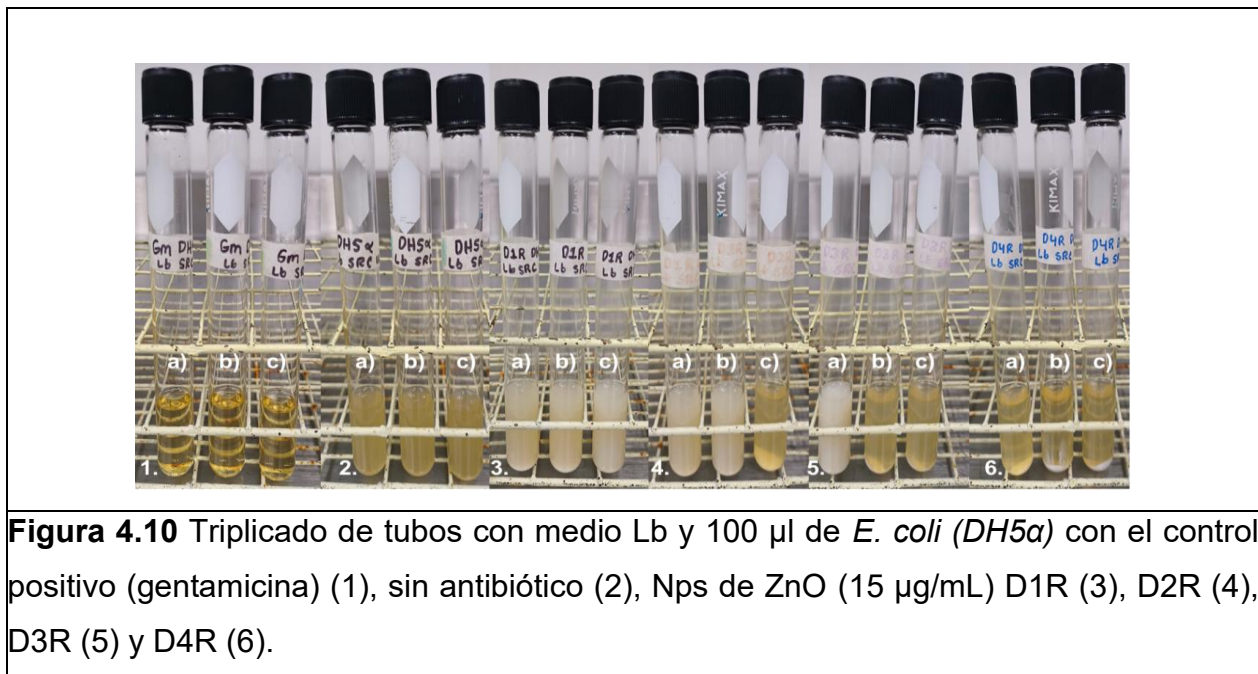
#### 4.2.4 Experimento 4a: Tubos de ensayo con Lb y Np en solución a 15 $\mu$ g/mL (incubación post-turbidez) con corrección de concentración de Nps.

Como ya se mencionó, debido a que en el anterior experimento no se mostró de manera clara el efecto de las nanopartículas, se optó por plaquear 100  $\mu$ l de muestra de cada tubo de ensayo.

En primera instancia los resultados en los tubos de ensayo fueron los siguientes (ver figura 4.10): en el triplicado de tubos de ensayo con el control positivo (fig.4.10. 1a-c) es notable la transparencia que se logra apreciar a comparación del control negativo (fig. 4.10.2a-c) donde se nota una turbidez. Realizando la comparación contra los tubos de ensayo con las nanopartículas observamos en el primer triplicado con nanopartículas D1R (fig.4.10. 3a-c) una turbidez blanquecina debida a la dispersión de nanopartículas, para el triplicado de tubos de las nanopartículas D2R (fig.4.10. 4a-c) observamos lo

mismo para 4a y 4b, siendo solo el tubo de ensaye 4c quien muestra una precipitación de estas, por lo tanto, presenta menos turbidez. Mientras que para el triplicado de tubos de ensaye con nanopartículas D3R (fig.4.10. 5a-c) observamos que solo presento turbidez blanquecina la muestra 5a), en cuanto en las muestras 5b) y 5c) se observa que las nanopartículas se precipitaron. Finalmente, en el triplicado de tubos de ensaye con nanopartículas D4R (fig.4.10. 6a-c) se observa sin excepción alguna la precipitación de todas las nanopartículas en cada uno de los tubos.

La precipitación de las nanopartículas en algunos tubos de ensaye y la turbidez blanquecina se le atribuye a la posición durante el proceso de incubación de los tubos, como se mencionó el método experimental estos se sometieron a 150 rpm a 30°C durante aproximadamente 12 a 14 horas.



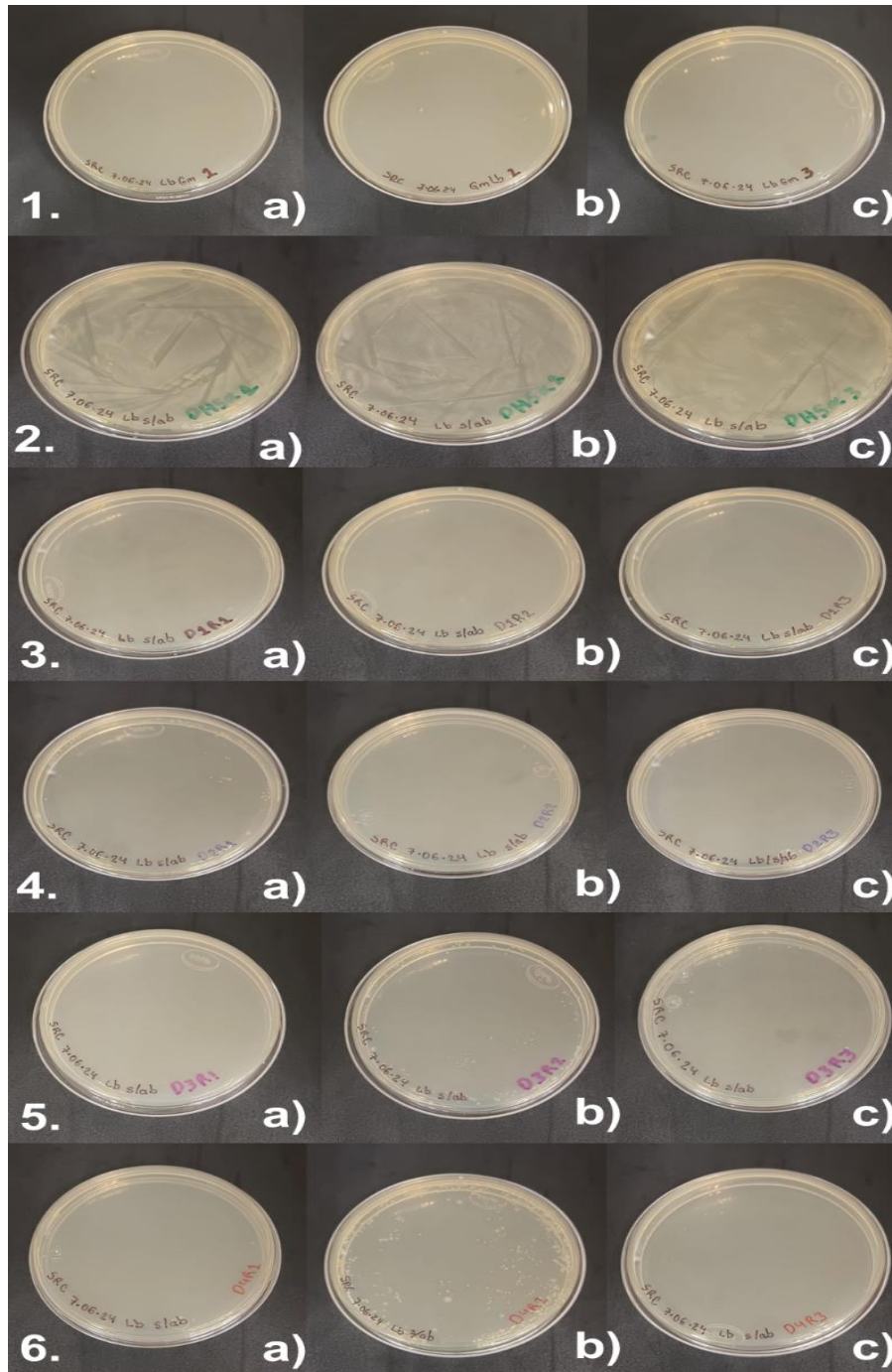
**Figura 4.10** Triplicado de tubos con medio Lb y 100  $\mu$ l de *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) con el control positivo (gentamicina) (1), sin antibiótico (2), Nps de ZnO (15  $\mu$ g/mL) D1R (3), D2R (4), D3R (5) y D4R (6).

Después de realizar el plaqueo de los tubos de ensaye y transcurridas 24 horas de incubación a 37°C obtuvimos lo siguiente (ver figura 4.11).

En las placas del control positivo (fig.4.11. 1a-c) como era de esperarse no observamos absolutamente nada de crecimiento bacteriano, es decir el antibiótico si inhibió la proliferación de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Para el triplicado de placas sin antibiótico (fig.4.11. 2a-c)

observamos la proliferación de las bacterias, solo teniendo algunas marcas que atribuimos al plaqueo con el asa drigalsky.

En cuanto al triplicado de placas de los tubos de ensaye con nanopartículas D1R (fig.4.11.3a-c) no observamos absolutamente nada de crecimiento bacteriano, es decir las nanopartículas impidieron la proliferación de las bacterias este efecto se puede deber a la alta pureza de las nanopartículas del ZnO policristalinas como se logró observar en el patrón de difracción de rayos X así como por el efecto de la dispersión de tamaño observado en HRSEM. En el caso del triplicado de placas con nanopartículas D2R (fig.4.11.4a-c) observamos de manera general un crecimiento bacteriano que se le atribuye a los puntos que se observan en las placas, como se observa la placa 4a es la que más crecimiento bacteriano muestra con aproximadamente 76 UFC a comparación de la placa 4b que solo presenta 10 UFC, por el contrario, la placa 4c en la que solo se observaron 6 UFC aunque se ve un pequeño incremento en cuanto a la cantidad de UFC no es tan significativo lo cual puede ser atribuible a la dispersión no homogénea en cuanto a la forma y tamaño de las nanopartículas ya que por rayos X se logra observar el mismo comportamiento que la D1R. Para las placas de los tubos de ensaye con nanopartículas D3R (fig.4.11.5a-c) en la placa 5a observamos 9 colonias, en la placa 5b contabilizamos 131 UFC y finalmente en la placa 5c 37 UFC de bacterias de *E. coli DH5α* comportamiento similar con las dos primeras muestras. Finalmente, para el triplicado de placas con nanopartículas D4R (fig.4.11.6a-c) observamos en la placa 6a 4 UFC, en la placa 6b 412 UFC y en la placa 6c 22 UFC. Los datos se resumen en la tabla 4.5.



**Figura 4.11** Triplicado de placas con 100  $\mu$ l de las muestras de los tubos de ensayo con el control positivo (gentamicina) (1), control negativo (sin antibiótico) (2), las nanopartículas de ZnO D1R (3), D2R (4), D3R (5) y D4R (6).

Como se observa en la tabla 8 los datos de las placas 5b y 6b (fig.4.11.5b y 4.11.6b) con nanopartículas D3R y D4R se encuentran fuera del rango de datos.

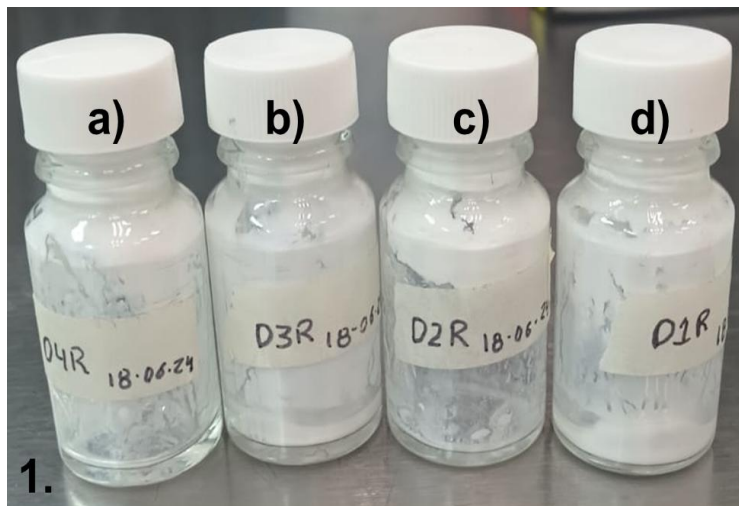
Para esta concentración de nanopartículas podemos observar que existe una gran inhibición bacteriana la cual es comparable con la efectividad del antibiótico para el caso específico de la muestra D1R, como ya se ha mencionado en la literatura (26) esto puede ser debido a varios factores entre los que tenemos son los mecanismos ROS y o de superficie como lo es la actividad del Zn u oxígeno. Aunque también podría ser la suma de todos ellos. También se ha mencionado que la forma y tamaño juegan un papel fundamental en la inhibición del crecimiento bacteriano. Si podemos observar a través de la difracción de RX se garantiza que estas partículas son altamente cristalinas al igual que su tamaño está alrededor de 30 nm. Debido a que estas partículas son policristalinas (ver sección 4.1.1), es decir crecen en varias direcciones cristalográficas lo cual nos permite obtener terminaciones ya sea en Zn o en O, lo cual podríamos deducir que la característica policristalina sumaría a la inhibición, aunado a los resultados obtenidos de SEM, podemos ver que existen diferentes morfologías donde la D1R y D4R son casi similares mientras que la D2R es más homogénea en cuanto a dispersión de tamaño y que cambia respecto a D3R

**Tabla 4.5** Conteo de colonias en el triplicado de placas del experimento 4a.

Experimento 4a				
	a)	b)	c)	Promedio (UFC)
D1R	0	0	0	0
D2R	74	10	6	30
D3R	9	131	37	27
D4R	4	412	22	15

#### 4.2.5 Experimento 4b: Tubos de ensayo con *Lb* y *Np* en solución a 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Al querer replicar el experimento anterior, como se observa en la figura 4.12 debido a un error en la agitación magnética y a que posiblemente no se cerraron de forma correcta los viales, gran parte de la cantidad de nanopartículas de las soluciones quedaron pegadas y no formaron parte de la solución. Por lo tanto, consideramos pesar los viales sucios (con las nanopartículas pegadas) (ver tabla 4.6) y limpios (después de recuperar las nanopartículas pegadas en los viales) (ver tabla 4.7), con los datos recabados en las tablas, encontramos que la cantidad real aproximada de nanopartículas que quedaron pegadas en los viales (ver tabla 4.8) fueron 0.168 g de D1R, 0.337 g de D2R, 0.213 g de D3R y finalmente 0.275 g de D4R. Finalmente, (ver tabla 4.9) obtenemos que aproximadamente las nanopartículas presentes en las soluciones son 0.232 g de D1R, 0.063 g de D2R, 0.187 g de D3R y 0.125 g de D4R. Siendo la solución de nanopartículas de D2R la que menos cantidad tenía, por lo tanto, este experimento se invalida por este error, sin embargo, a continuación, analizaremos los resultados obtenidos.



**Figura 4.12** Viales en los que se prepararon las soluciones de nanopartículas de ZnO D1R(a), D2R (b), D3R (c) y D4R (d).

**Tabla 4.6** Cantidad de nanopartículas de D1R, D2R, D3R y D4R pegadas en los viales.

	Vial con Np	Tapas con Np
D1R	24.347 g	1.218 g
D2R	24.224 g	1.379 g
D3R	24.510 g	1.212 g
D4R	24.322 g	1.250 g

**Tabla 4.7** Peso de los viales y tapas limpios (sin las nanopartículas pegadas en las paredes).

	Vial sin Np	Tapas sin Np
D1R	24.188 g	1.209 g
D2R	23.946 g	1.320 g
D3R	24.311 g	1.198 g
D4R	24.086 g	1.211 g

**Tabla 4.8** Cantidad total en gramos de las nanopartículas pegadas en los viales.

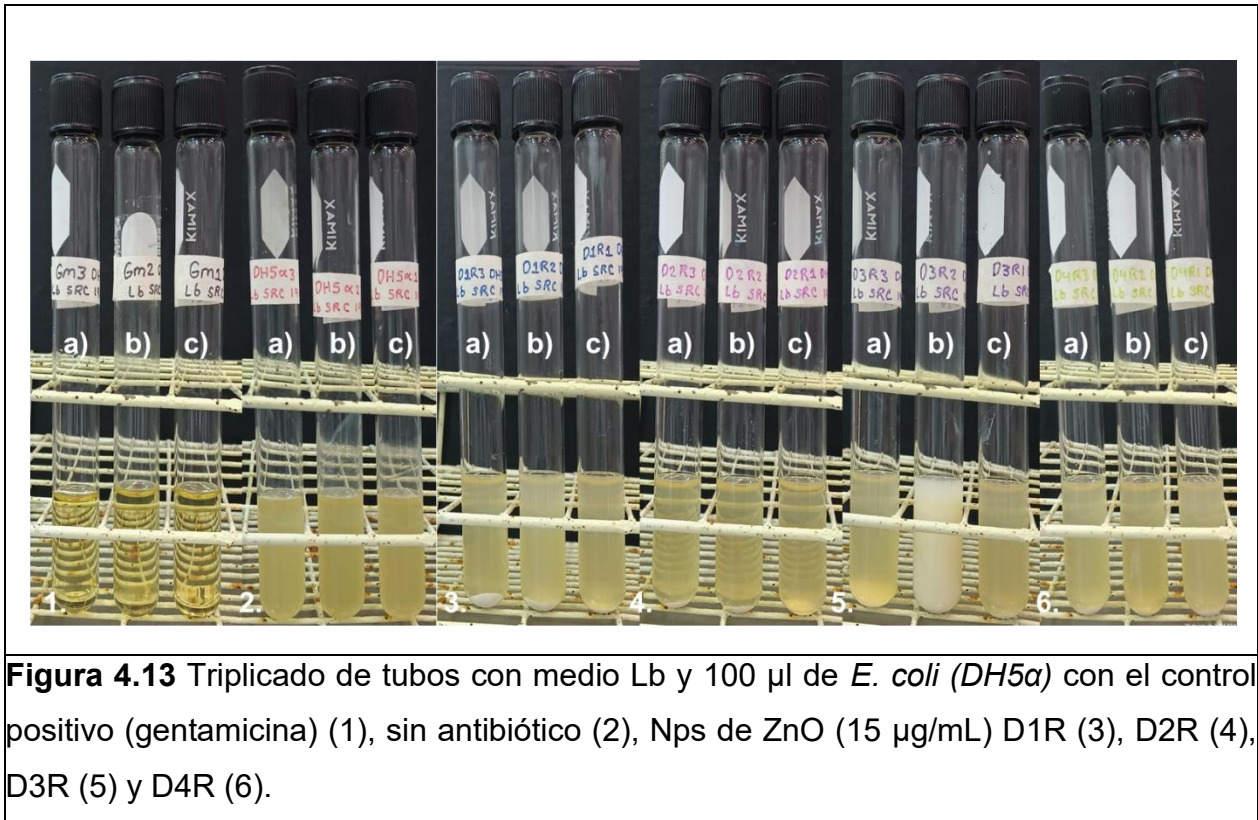
	Diferencia en el vial	Diferencia en la tapa	Total de Np
D1R	0.159 g	0.009 g	0.168 g
D2R	0.278 g	0.059 g	0.337 g
D3R	0.199 g	0.014 g	0.213 g

D4R	0.236 g	0.039 g	0.275 g
-----	---------	---------	---------

**Tabla 4.9** Cantidad calculada de nanopartículas en los viales y en las soluciones.

	Np en viales	Np en la solución
D1R	0.168 g	0.232 g
D2R	0.337 g	0.063 g
D3R	0.213 g	0.187 g
D4R	0.275 g	0.125 g

Analizando los resultados obtenidos en los tubos de ensaye (ver figura 4.13), en cuanto al triplicado con el control positivo (fig.4.13.1a-c) podemos observar claramente que se torna un líquido transparentoso, a diferencia del triplicado del control negativo (fig.4.13.2a-c) en donde observamos una turbidez. En cuanto al triplicado de las nanopartículas, en D1R (fig.4.13.3a-c) observamos una turbidez similar a las del control negativo, pero con las nanopartículas precipitadas al fondo del tubo, este suceso se repite en los demás triplicados de las nanopartículas D2R, D3R y D4R (fig.4.13.4a-c, fig.4.13.5a-c fig.4.13.6a-c), teniendo una única excepción en el tubo 5b en donde observamos una turbidez blanquecina lo que nos indica que en este tubo las nanopartículas no se precipitaron.

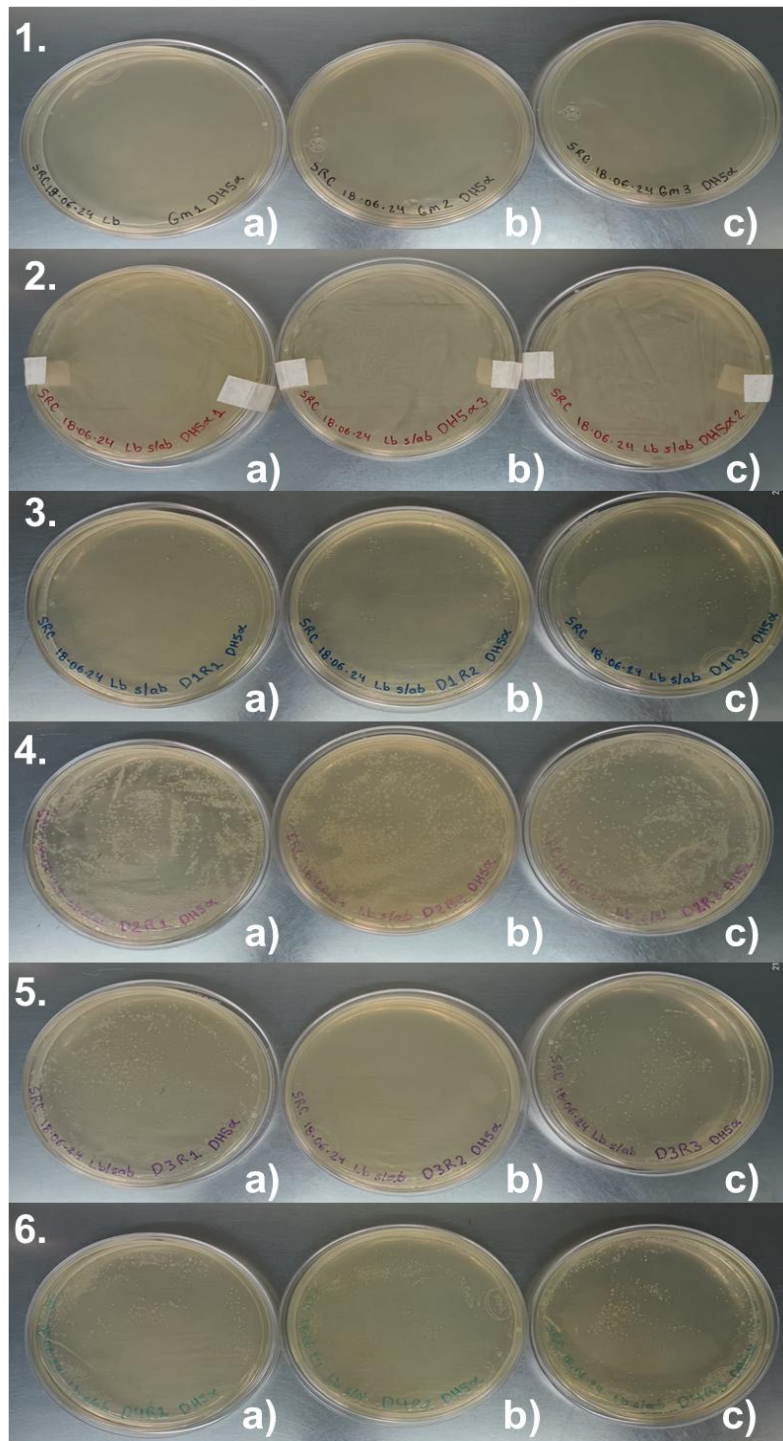


**Figura 4.13** Triplicado de tubos con medio Lb y 100  $\mu$ l de *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) con el control positivo (gentamicina) (1), sin antibiótico (2), Nps de ZnO (15  $\mu$ g/mL) D1R (3), D2R (4), D3R (5) y D4R (6).

En cuanto a los resultados obtenidos después de plaquear 100  $\mu$ l de muestra de cada uno de los tubos de ensaye y colocarlos en incubación durante 24 horas a 37°C encontramos que el crecimiento de colonias de *E. coli* DH5 $\alpha$  fue nulo en el triplicado de placas con el control positivo (gentamicina) (fig.4.14.1a-c) lo que nos valida a la gentamicina como antibiótico, por otro lado en el triplicado de placas del control negativo (sin antibiótico) (fig.4.14.2a-c) observamos bastante crecimiento de colonias al grado de no poder contabilizarlas, lo que nos avala que en el experimento si tenemos crecimiento bacteriano de *E. coli* DH5 $\alpha$ . En cuanto al triplicado de placas con nanopartículas D1R (fig.4.14.3a-c) observamos crecimiento de colonias que contabilizándolas (ver tabla 4.10) obtenemos un promedio de 130 UFC por placa, en el triplicado de placas con nanopartículas D2R (fig.4.14.4a-c) a primera vista observamos bastante crecimiento bacteriano teniendo en promedio 1056 UFC, en el triplicado de placas con nanopartículas D3R (fig.4.14.5a-c) observamos en dos placas presencia de aproximadamente 516 UFC, pero en la placa 5b solo tenemos 22 UFC resultado que coincide con el tubo de ensaye que observamos con una turbiedad blanquecina, finalmente en el triplicado de placas con

nanopartículas D4R (fig.4.14.6a-c) contabilizamos un promedio de 485 UFC aproximadamente.

Teniendo en cuenta que las soluciones de las nanopartículas fueron utilizadas con una menor concentración en este experimento, aunado a ello las nanopartículas si logran inhibir el crecimiento de la bacteria *E. coli DH5α*.



**Figura 4.14** Triplicado de placas con 100  $\mu$ l de las muestras de los tubos de ensaye con el control positivo (gentamicina) (1), control negativo (sin antibiótico) (2), las nanopartículas de ZnO D1R (3), D2R (4), D3R (5) y D4R (6).

**Tabla 4.10** Conteo de colonias en el triplicado de placas del experimento 4b.

Experimento 4b				
	a)	b)	c)	Promedio (UFC)
D1R	117	112	160	130
D2R	1064	1052	1053	1056
D3R	659	22	373	516
D4R	425	444	587	485

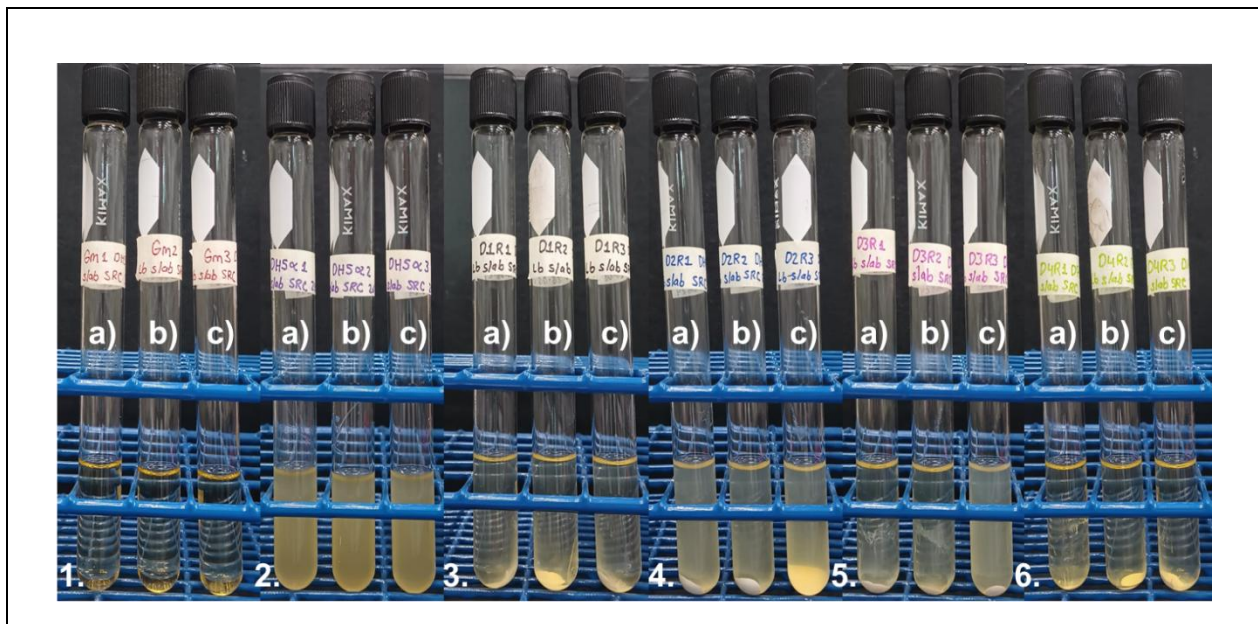
#### 4.2.6 Experimento 4c: Tubos de ensayo con *Lb* y *Np* en solución a 15 µg/mL

Como parte del proceso experimental, debíamos replicar el experimento 4a teniendo más cuidado en la concentración de las soluciones como nos sucedió en el experimento 4b. En esta tercera corrida en la preparación de las soluciones con nanopartículas no tuvimos ningún inconveniente.

Los resultados en los tubos de ensayo fueron los siguientes (ver figura 4.15): en el triplicado de tubos de ensayo con el control positivo (fig.4.15. 1a-c) es notable la transparencia que se logra apreciar a comparación del control negativo (fig.4.15. 2a-c) donde se nota una turbidez. Realizando la comparación contra los tubos de ensayo con las nanopartículas observamos en el primer triplicado con nanopartículas D1R (fig.4.15.3a-c) una transparencia similar al triplicado de tubos del control positivo con una precipitación muy notable de las nanopartículas, para el triplicado de tubos de las nanopartículas D2R (fig.4.15.4a-c) observamos una turbidez un poco menos nítida que los tubos con nanopartículas D1R y de igual manera se observa la precipitación de las nanopartículas en el fondo del tubo de ensayo. Para el triplicado de tubos de ensayo con nanopartículas D3R (fig.4.15. 5a-c) observamos que solo presente la turbidez blanquecina 5c similar al triplicado de tubos con nanopartículas D2R, en cuanto en las muestras 5a y 5b se observa una transparencia similar al control positivo. Finalmente, en el triplicado de tubos de ensayo con nanopartículas D4R (fig.4.15. 6a-c) se observa sin

excepción alguna la precipitación de las nanopartículas y una transparencia muy similar a las de los tubos del control positivo.

La precipitación de las nanopartículas se le atribuye a la posición en la incubación de los tubos que como se mencionó el método experimental se sometieron a 150 rpm a 30°C durante aproximadamente 12 a 14 horas. En esta corrida se observó sin excepción alguna en todos los tubos la precipitación de las nanopartículas, dado estos resultados en los tubos se esperaría una mejor inhibición en los tubos con nanopartículas D1R y D4R por tener una transparencia muy similar a los tubos de ensayo del control positivo (gentamicina).

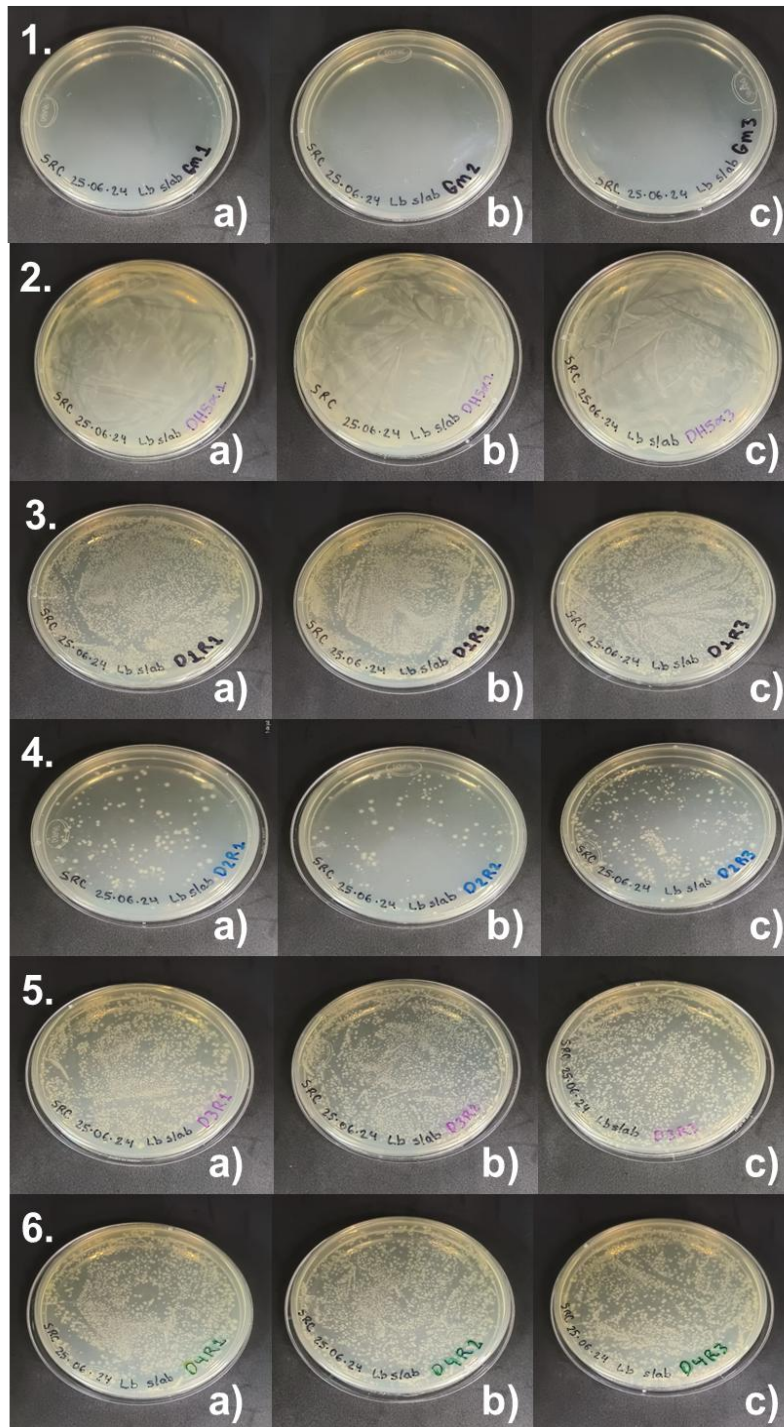


**Figura 4.15** Triplicado de tubos con medio Lb y 100  $\mu$ l de *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) con el control positivo (gentamicina) (1), sin antibiótico (2), Nps de ZnO (15  $\mu$ g/mL) D1R (3), D2R (4), D3R (5) y D4R (6).

Posteriormente a la incubación, los resultados obtenidos después de plaquear 100  $\mu$ l de muestra de cada uno de los tubos de ensayo y colocarlos en incubación durante 24 horas a 37°C encontramos que el crecimiento de colonias de *E. coli* DH5 $\alpha$  fue nulo en el triplicado de placas con el control positivo (gentamicina) (fig.4.16.1a-c) lo que nos valida a la gentamicina como antibiótico, por otro lado en el triplicado de placas del control negativo (sin antibiótico) (fig.4.16.2a-c) observamos bastante crecimiento de colonias lo

que nos avala que en el presente experimento si tenemos crecimiento bacteriano de *E. coli DH5α*. En cuanto al triplicado de placas con nanopartículas D1R (fig.4.16.3a-c) observamos un crecimiento de colonias muy notable que contabilizándolas (ver tabla 4.11) obtenemos un promedio de 2291 UFC por placa, por el contrario en el triplicado de placas con nanopartículas D2R (fig.4.16.4a-c) observamos un menor crecimiento bacteriano teniendo en promedio 249 UFC, mientras que en el triplicado de placas con nanopartículas D3R (fig.4.16.5a-c) contabilizamos aproximadamente 1557 UFC en promedio en cada placa, finalmente en el triplicado de placas con nanopartículas D4R (fig.4.16.6a-c) contabilizamos un promedio de 2117 UFC aproximadamente.

A través del análisis del experimento se pudo observar que las nanopartículas si inhiben a *E. coli DH5α*, sin embargo, a comparación del experimento 4a en esta ocasión observamos mayor crecimiento de bacterias, destacándose la inhibición con las nanopartículas D2R, pues de todos los experimentos en este tipo de nanopartícula observamos menor crecimiento de bacterias. Identificamos también que existe un falso positivo en los tubos que eran muy similares a nuestro control negativo, pues lejos a lo que se esperaba observamos mayor crecimiento de colonias.



**Figura 4.16** Triplicado de placas con 100  $\mu$ l de las muestras de los tubos de ensaye con el control positivo (gentamicina) (1), control negativo (sin antibiótico) (2), las nanopartículas de ZnO D1R (3), D2R (4), D3R (5) y D4R (6).

**Tabla 4.11** Conteo de colonias en el triplicado de placas del experimento 4c.

Experimento 4c				
	a)	b)	c)	Promedio (UFC)
D1R	2894	2156	1822	2291
D2R	174	126	447	249
D3R	1564	1707	1399	1557
D4R	1871	2531	1949	2117

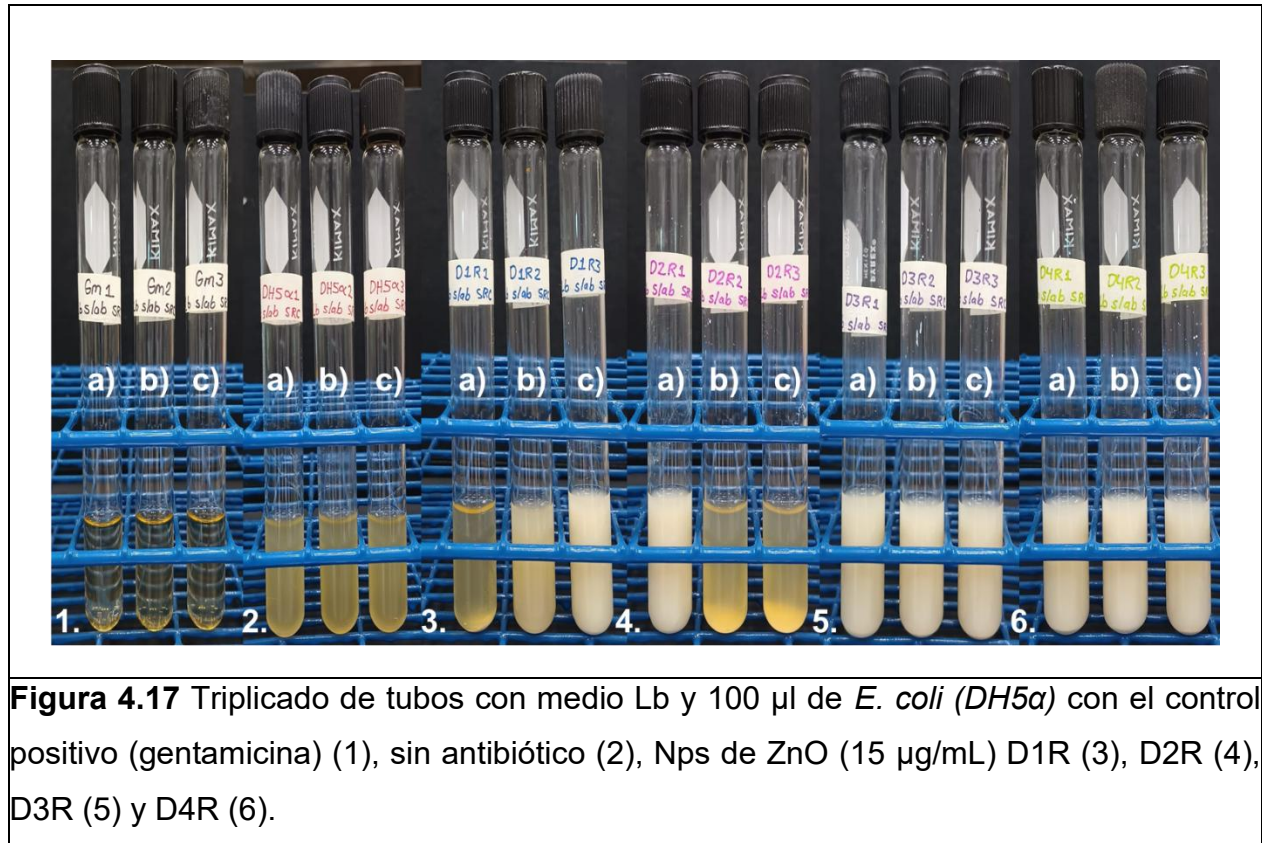
Con todo esto podemos decir que, gracias a las propiedades estructurales, morfológicas y ópticas como lo son aquellas mencionadas en la sección de fotoluminiscencia y que contribuyen de manera fuerte en la generación del par electrón hueco ya que como se puede observar en la imagen 4.3 muchos de estos defectos se encuentran localizados dentro del ancho de banda del material y de igual manera se puede observar dentro de los espectros obtenidos y deconvolucionados en la sección experimental estos contribuyen fuertemente al pico máximo de emisión pero es importante mencionar que dicha contribución esta desplazado hacia la parte visible del espectro electromagnético, sumado a ello se pudo observar que las 4 muestras obtenidas a diferentes concentraciones las cuales son cuasi similares estas provén de las características necesarias a las nanopartículas para ser aplicadas en los mecanismos inhibitorios.

Con ello a través de los fundamentos encontrados en la literatura podemos decir que, para este tipo de partícula, su naturaleza policristalina, su cristalinidad, pureza, tamaño y sumado a ello los defectos intrínsecos localizados en el visible contribuyen de manera eficiente en la inhibición. Con todo lo anterior mencionado podríamos suponer que no solo el mecanismo ROS participa fuertemente, sino que también se podría atribuir que el factor del tamaño, aunque no en gran medida suma a esta eficiencia, sin dejar de lado los iones Zn y oxígeno liberados en el medio los cuales modifican en gran medida el pH del medio de crecimiento.

#### *4.2.7 Experimento 4d: Tubos de ensayo con Lb y Np en solución a 15 µg/mL*

Finalmente, para corroborar nuestro método experimental realizamos una tercera corrida (experimento 4d), donde se pretendió replicar el experimento 4a teniendo cuidado particularmente en la concentración de las soluciones, pues como observamos en el experimento 4b es un factor muy importante dentro del proceso de inhibición. En este caso en particular no se presentó problema alguno en la preparación de las soluciones de las nanopartículas.

Los resultados de turbidez se presentan en la figura 4.17, donde observamos que el triplicado con el control positivo (fig.4.17.1a-c) como es de esperarse presenta una notable transparencia, similar a los tubos con el control positivo en los experimentos anteriores, en cuanto a el control negativo nuevamente observamos turbidez, lo que nos indica en primer lugar que si tenemos bacterias en el experimento y en segundo lugar que estas si proliferaron (fig.4.17.2a-c). En cuanto a los tubos con nanopartículas, del triplicado de tubos de ensaye con nanopartículas D1R (fig.4.17.3a-c) observamos en el tubo 3a una turbidez similar a los tubos del control negativo, pero con una precipitación de las nanopartículas, en cuanto a los tubos 3b y 3c se nota una turbidez blanquecina aunada a las nanopartículas, es decir en estos dos tubos las nanopartículas no se precipitaron; para el triplicado de tubos de las nanopartículas D2R (fig.4.17.4a-c) observamos que el tubo 4a presenta una turbidez blanquecina y en este caso los tubos restantes 4b y 4c se lograr ver con una turbidez similar al control negativo; en el triplicado de tubos de ensaye con nanopartículas D3R (fig.4.17.5a-c) observamos sin excepción alguna en los tres tubos de ensaye la turbidez blanquecina, lo mismo observamos para el triplicado de con nanopartículas D4R (fig.4.17.6a-c). En esta corrida se esperaría observar la diferencia entre los tubos que tuvieron o no una precipitación de las nanopartículas.



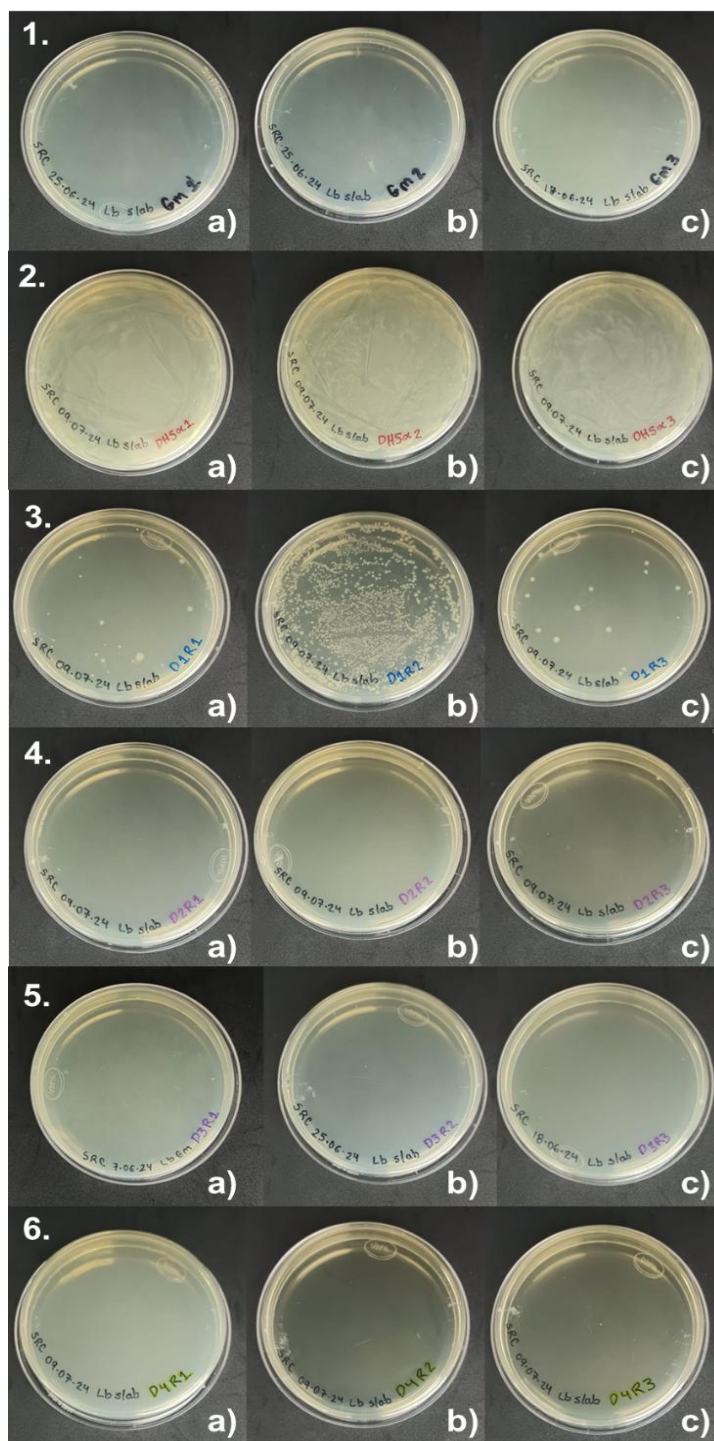
**Figura 4.17** Triplicado de tubos con medio Lb y 100  $\mu$ l de *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) con el control positivo (gentamicina) (1), sin antibiótico (2), Nps de ZnO (15  $\mu$ g/mL) D1R (3), D2R (4), D3R (5) y D4R (6).

Transcurridas las 24 horas de incubación de las placas a 37°C, observamos nuevamente como en los experimentos anteriores un nulo crecimiento de colonias en las placas con el control positivo (fig.4.18.1a-c), en cuanto al triplicado con el control negativo (fig.4.18.2a-c) nuevamente logramos observar un crecimiento de colonias exuberante que no es posible contabilizar, recordemos que estos resultados no avala en primer lugar que la gentamicina si inhibe el crecimiento bacteriano, y en cuanto al control negativo nos indica que en este experimento si tenemos bacterias presentes.

Mientras que para el triplicado de placas con nanopartículas D1R (fig.4.18.3a-c) mostraron un mayor crecimiento de colonias en la placa 3b a comparación de las placas 3a y 3c. Se atribuyó esta diferencia a un posible sesgo debido al procedimiento experimental en la placa 3b pues, como se logra observar en la tabla 4.12 la diferencia cuantitativa es enorme por lo cual omitimos dicho dato y se obtuvo un promedio entre la placa 3a y 3c de aproximadamente 29 UFC ya que estas guardan correlación en cuanto a la cantidad de UFC. De los resultados obtenidos para el triplicado de placas con nanopartículas D2R (fig.4.18.4a-c) se logró observar una buena inhibición bacteriana en

todas las placas, pues se obtuvo un promedio aproximado de 27 UFC. Por otro lado, para el triplicado de placas de la muestra D3R (fig.4.18.5a-c) se contabilizaron aproximadamente 24 colonias en promedio en cada placa, finalmente en el triplicado de placas con nanopartículas D4R (fig.4.18.6a-c) observamos mayor crecimiento en la placa 6c en donde se contabilizaron 68 UFC aproximadamente a comparación de las placas 6a y 6b donde se observaron 27 y 32 UFC respectivamente, obteniendo un promedio de 29 UFC aproximadamente.

Con este experimento en el cual se tuvo un alto control en las interferencias y de parámetros experimentales se logró determinar que las nanopartículas sí inhiben de manera eficiente el crecimiento de las bacterias *E. coli DH5 $\alpha$* , y los resultados son muy similares a los del experimento 4a. Es importante destacar la inhibición con las nanopartículas D3R, pues en este caso, este tipo de nanopartícula mostró menor crecimiento de bacterias, aunque es importante aclarar que la diferencia no es muy grande. Identificamos también un punto importante en la turbidez pues si el tubo mostraba una turbidez blanquecina, es decir que las nanopartículas no se habían precipitado los resultados en cuanto a la inhibición mostraron mayor efectividad.



**Figura 4.18** Triplicado de placas con 100  $\mu$ l de las muestras de los tubos de ensaye con el control positivo (gentamicina) (1), control negativo (sin antibiótico) (2), las nanopartículas de ZnO D1R (3), D2R (4), D3R (5) y D4R (6).

**Tabla 4.12** Conteo de colonias en el triplicado de placas del experimento 4d.

Experimento 4d				
	a)	b)	c)	Promedio (UFC)
D1R	31	1669	27	29
D2R	26	23	32	27
D3R	21	17	35	24
D4R	27	32	68	29

Con todo ello y con la reproducibilidad de los experimentos podemos decir que las 4 muestras probadas y obtenidas a diferentes concentraciones y debido a que ellas guardan una similitud en cuanto a características físicas y químicas estas funcionan de forma eficiente en la inhibición del crecimiento de la cepa *E. coli DH5α*.

## Capítulo 5: Conclusiones

### 5.1 Síntesis

Con la propuesta de síntesis planteada a diferentes concentraciones del precursor de Zn se logró sintetizar ZnO con excelentes características estructurales, morfológicas y ópticas como se detalla a continuación.

- A través de la difracción de rayos X (DRX) se pudo determinar que el tamaño de cristal y la estructura de ZnO, concluyendo que esta posee una estructura hexagonal tipo wurtzita, con características policristalinas y un tamaño de cristal que va desde los 18 a los 27 nm.
- Por otro lado, mediante la técnica de HRSEM se observó claramente que las partículas poseían una morfología nanométrica, y que estas variaban en cuanto a la dispersión, ya que algunas solo eran nanopartículas elongadas, mientras que otras eran una mezcla con partículas tipo hojuela de forma triangulares.
- Sumado a ello al realizarles una caracterización óptica como lo es fotoluminiscencia se logró determinar a través de la deconvolución de los espectros la presencia de defectos intrínsecos como lo son las vacancias de oxígeno ( $V_o$ ), oxígenos ionizados ( $O^*$ ), oxígenos doblemente ionizados ( $O^{**}$ ) y complejos de vacancias de oxígeno con zinc intersticiales ( $V_oZn_i$ ).

### 5.2 Aplicación

Una vez determinado las características anteriores se plantea su aplicación como agente inhibidor de la bacteria *E. coli DH5 $\alpha$* .

- De acuerdo con la bibliografía consultada para este trabajo de investigación en primer lugar se planteó utilizar el método de difusión en disco. Después de realizar el procedimiento experimental y del análisis de resultados por difusión en disco; desafortunadamente no se logró notar un efecto de inhibición, esto es debido a que el método de depósito de las partículas de todas las muestras en el disco no es efectivo como se describió en la sección de resultados.

- Posterior a ello se propone el método de turbidez conservando las concentraciones propuestas al inicio de la dispersión (10  $\mu\text{gr/ml}$ ), desafortunadamente dicha concentración no era óptima para la inhibición, por ello a primera instancia los resultados se observaron similares a el control negativo.
- Realizando los cálculos pertinentes y habiendo calculado de manera correcta la concentración (15  $\mu\text{gr/ml}$ ) nuevamente no observamos de manera clara una inhibición ahora porque los tubos se tornaban blanquecinos (lo cual podría ocasionar que se diese un falso positivo o un falso negativo) y a fin de optimizar estos experimentos y ser concluyentes se procedió a plaquear una alícuota derivado de dichas muestras.
- Finalmente, posterior a el método de inoculación en medio liquido se procedió a plaquear una alícuota de cada una de las muestras de ZnO para observar de manera clara la inhibición, este método demostró ser factible y reproducible, de los resultados se observó que todas las nanopartículas (D1R, D2R, D3R y D4R) presentan una fuerte actividad ante la E. coli DH5 $\alpha$ .
- Para poder tener una alta reproducibilidad, es necesario tener en cuenta 2 factores y eliminarlos a fin de que no interfieran en ello; la preparación de la dispersión de Nps y mantener una alta dispersión en el proceso de incubación.
- Podemos concluir que esta alta eficiencia en el mecanismo de inhibición puede ser debido el mecanismo ROS (Especies Reactivas de Oxígeno) o la reactividad de los iones Zn y Oxígeno presentes en el medio dado a las características de las Nps que se pudieron observar a través de DRX, HRSEM y de FL.
- Comparando los resultados de inhibición de las nanopartículas es difícil mencionar que una destaca ya que todas comparten características físicas, químicas y ópticas similares.

# **Anexos**

## **Anexo A: índice de Imágenes**

- 1.1** Los principales mecanismos antibacterianos de las nanopartículas de ZnO
- 2.1** Ley de Bragg
- 2.2** Microscopio electrónico de barrido
- 2.3** Defectos intrínsecos del ZnO
- 2.4** Difusión en disco
- 2.5** Siembra en medio líquido (tubo)
- 2.6** Siembra por diseminación en superficie
- 3.1** Contenido de los tubos de ensaye que se prepararon por triplicado para el experimento.
- 4.1** Patrones de difracción de rayos-X de a) D1R, b) D2R, c) D3R y d) D4R respectivamente.
- 4.2** Micrografías SEM de a) D1R, b) D2R, c) D3R y d) D4R
- 4.3** Espectros de fotoluminiscencia obtenidos para las muestras: a) D1R, b) D2R, c) D3R and d) D4R
- 4.4** Triplicado de placas del control positivo (gentamicina).
- 4.5** Triplicado de placas del control negativo (agua estéril).
- 4.6** Cajas representativas del Triplicado de placas sin control positivo (a) y negativo (b).
- 4.7** Triplicado de placas con Nps de ZnO (15 µg/ml) D1R (1), D2R (2), D3R (3) y D4R (4).
- 4.8** Triplicado de tubos con medio Lb y 100 µl de E. coli (DH5α) con el control positivo (gentamicina) (1), control negativo (sin antibiótico) (2), Nps de ZnO (10 µg/mL) D1R (3), D2R (4), D3R (5) y D4R (6).
- 4.9** Triplicado de tubos con medio Lb y 100 µl de E. coli (DH5α) con el control positivo (gentamicina) (1), Nps de ZnO (15 µg/mL) D1R (2), D2R (3), D3R (4) y D4R (5).
- 4.10** Triplicado de tubos con medio Lb y 100 µl de E. coli (DH5α) con el control positivo (gentamicina) (1), sin antibiótico (2), Nps de ZnO (15 µg/mL) D1R (3), D2R (4), D3R (5) y D4R (6).

**4.11** Triplicado de placas con 100 µl de las muestras de los tubos de ensaye con el control positivo (gentamicina) (1), control negativo (sin antibiótico) (2), las nanopartículas de ZnO D1R (3), D2R (4), D3R (5) y D4R (6).

**4.12** Viales en los que se prepararon las soluciones de nanopartículas de ZnO D1R(a), D2R (b), D3R (c) y D4R (d).

**4.13** Triplicado de tubos con medio Lb y 100 µl de E. coli (DH5α) con el control positivo (gentamicina) (1), sin antibiótico (2), Nps de ZnO (15 µg/mL) D1R (3), D2R (4), D3R (5) y D4R (6).

**4.14** Triplicado de placas con 100 µl de las muestras de los tubos de ensaye con el control positivo (gentamicina) (1), control negativo (sin antibiótico) (2), las nanopartículas de ZnO D1R (3), D2R (4), D3R (5) y D4R (6).

**4.15** Triplicado de tubos con medio Lb y 100 µl de E. coli (DH5α) con el control positivo (gentamicina) (1), sin antibiótico (2), Nps de ZnO (15 µg/mL) D1R (3), D2R (4), D3R (5) y D4R (6).

**4.16** Triplicado de placas con 100 µl de las muestras de los tubos de ensaye con el control positivo (gentamicina) (1), control negativo (sin antibiótico) (2), las nanopartículas de ZnO D1R (3), D2R (4), D3R (5) y D4R (6).

**4.17** Triplicado de tubos con medio Lb y 100 µl de E. coli (DH5α) con el control positivo (gentamicina) (1), sin antibiótico (2), Nps de ZnO D1R (3), D2R (4), D3R (5) y D4R (6).

**4.18** Triplicado de placas con 100 µl de las muestras de los tubos de ensaye con el control positivo (gentamicina) (1), control negativo (sin antibiótico) (2), las nanopartículas de ZnO D1R (3), D2R (4), D3R (5) y D4R (6).

## **Anexo B: índice de Tablas**

**3.1** Materiales usados para la preparación de soluciones de nanopartículas a diferentes concentraciones.

**3.2** Material utilizado para la siembra de las bacterias.

**3.3** Material utilizado para la preparación del medio de cultivo

**4.1** Tamaños de cristal promedio calculados para cada una de las muestras.

- 4.2** Defectos intrínsecos de ZnO obtenidos a través del espectro deconvolucionado de PL para D1R, D2R, D3R y D4R respectivamente.
- 4.3** Identificación de la concentración adecuada de Nps para los ensayos de inhibición de cultivo en líquido (tubos)
- 4.4** Datos finales del cálculo de la concentración de las Nps
- 4.5** Conteo de colonias en el triplicado de placas del experimento 4a.
- 4.6** Cantidad de nanopartículas de D1R, D2R, D3R y D4R pegadas en los viales.
- 4.7** Peso de los viales y tapas limpios (sin las nanopartículas pegadas en las paredes).
- 4.8** Cantidad total en gramos de las nanopartículas pegadas en los viales.
- 4.9** Cantidad calculada de nanopartículas en los viales y en las soluciones.
- 4.10** Conteo de colonias en el triplicado de placas del experimento 4b.
- 4.11** Conteo de colonias en el triplicado de placas del experimento 4c.
- 4.12** Conteo de colonias en el triplicado de placas del experimento 4d.

## Bibliografía

[1] Rodríguez-Ángeles, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud pública de México*, 44(5), 464–475. <https://doi.org/10.1590/S0036-36342002000500011>

[2] Kibret, M., & Abera, B. (2011). Antimicrobial susceptibility patterns of *E. coli* from clinical sources in northeast Ethiopia. *African Health Sciences*, 11 Suppl 1, S40-5. <https://doi.org/10.4314/ahs.v11i3.70069>

[3] Li, Z., Shi, L., Wang, B., Wei, X., Zhang, J., Guo, T., Kong, J., Wang, M., & Xu, H. (2021). In vitro assessment of antimicrobial resistance dissemination dynamics during multidrug-resistant-bacterium invasion events by using a continuous-culture device. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(6). <https://doi.org/10.1128/AEM.02659-20>

[4] Hamed, S., & Emara, M. (2023). Antibacterial and antivirulence activities of acetate, zinc oxide nanoparticles, and vitamin C against *E. coli* O157:H7 and *P. aeruginosa*. *Current Microbiology*, 80(2), 57. <https://doi.org/10.1007/s00284-022-03151-6>

[5] Li, D., Chen, S., Zhang, K., Gao, N., Zhang, M., Albasher, G., Shi, J., & Wang, C. (2021). The interaction of Ag<sub>2</sub>O nanoparticles with *Escherichia coli*: inhibition-sterilization process. *Scientific Reports*, 11(1), 1703. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81305-5>

[6] Li, Y., Yang, D., Wang, S., Li, C., Xue, B., Yang, L., Shen, Z., Jin, M., Wang, J., & Qiu, Z. (2018). The detailed bactericidal process of ferric oxide nanoparticles on *E. coli*. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(3). <https://doi.org/10.3390/molecules23030606>

[7] Saha, R. K., Debanath, M. K., & Saikia, E. (2020). Multifractal analysis of ZnO nanoparticles. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, 106(110177), 110177. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110177>

[8] Karp, G. (2016). *Cell and molecular biology: Concepts and experiments 8e WileyPLUS LMS card* (8a ed.). John Wiley & Sons.

[9] Anzaldúa ASR, Caballero CI, Cardoso RME, Espinosa PM, Hernández EJ, Juárez MML, Ocampo LJ, Palma LI, Pérez MM, Rodríguez MO, Zepeda DLD. *Biología celular veterinaria*. CD-ROM 1a. ed. México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2014.

[10] Amada Aleyda Angulo Rodríguez, Alma Rebeca Galindo Uriarte, Carolina Pérez Angulo. (2012). *Biología celular*. UAS-DGEP.

[11] Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2005). *Medical microbiology*. Mosby.

[12] Jawetz, M. y. A. (2011). *Microbiología médica*. The McGraw-Hill Companies, Inc.

[13] Acuña, G. C. (2018). *Bacterias ¿Por qué me enferman?* Universidad Politécnica y Artística del Paraguay.

[14] Blount, Z. D. (2015). The unexhausted potential of *E. coli*. *eLife*, 4. <https://doi.org/10.7554/eLife.05826>

[15] Molina, N. B., Oderiz, S., López, M. A., Basualdo, J. Á., & Sparo, M. D. (2024). Caracterización molecular de *Escherichia coli* diarreogénica proveniente de población pediátrica ambulatoria con diarrea, atendida en dos hospitales de Buenos Aires, Argentina. *Revista Argentina de microbiología*, 56(1), 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2023.06.002>

[16] Poirel, L., Madec, J.-Y., Lupo, A., Schink, A.-K., Kieffer, N., Nordmann, P., & Schwarz, S. (2018). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 6(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0026-2017>

[17] Santos, J. R., Contreras Ferrat, G., Carmen, M., & Eichelmann, G. (s/f). *La fase estacionaria en la bacteria Escherichia coli*. Medigraphic.com. Recuperado el 7 de noviembre de 2025, de [https://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2005/mi05-3\\_4f.pdf](https://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2005/mi05-3_4f.pdf)

[18] Cárdenas, C., & Josefina, F. (2017). *Enfermedades producidas por Escherichia coli*. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP).

[19] Rosenbluth, T. (2024). *Las Cuarto de Libra de McDonald's son vinculadas a un brote de E. coli*. Nytimes.com. <https://www.nytimes.com/es/2024/10/22/espanol/ciencia-y-tecnologia/cuarto-libra-mcdonalds-e-coli.html>

[20] Revista, A., Roldán, M. L., Chinen, I., Otero, J. L., Miliwebsky, E. S., Alfaro, N., Burns, P., & Rivas, M. (s/f). *Aislamiento, caracterización y subtipificación de cepas de Escherichia coli O157:H7 a partir de productos cárnicos y leche*. Redalyc.org. Recuperado el 11 de noviembre de 2025, de <https://www.redalyc.org/pdf/2130/213016791012.pdf>

[21] Ariyama, C., & Andrea, H. (2015). *Diversidad genotípica y perfil de resistencia a antibióticos de cepas de escherichia coli aisladas de la cadena de producción de chile jalapeño, tomate y melón del noreste de México*. <http://eprints.uanl.mx/9722/>

[22] Chinemerem Nwobodo, D., Ugwu, M. C., Oliseloke Anie, C., Al-Ouqaili, M. T. S., Chinedu Ikem, J., Víctor Chigozie, U., & Saki, M. (2022). Antibiotic resistance: The challenges and some emerging strategies for tackling a global menace. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 36(9), e24655. <https://doi.org/10.1002/jcla.24655>

[23] World Health Organization. (2023). *Resistencia a los antimicrobianos*. Who.int. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>

[24] Aarestrup, F. M., & Wegener, H. C. (1999). The effects of antibiotic usage in food animals on the development of antimicrobial resistance of importance for humans in *Campylobacter* and *Escherichia coli*. *Microbes and Infection*, 1(8), 639–644. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(99\)80064-1](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(99)80064-1)

[25] Cavalieri, S. J. (2009). *Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiano*. ASM Press.

[26] Xie, J., Li, H., Zhang, T., Song, B., Wang, X. y Gu, Z. (2023). Avances recientes en aplicaciones biológicas y mecanismos de acción mediados por nanomateriales de ZnO. *Nanomaterials*, 13 (9), 1500. <https://doi.org/10.3390/nano13091500>

[27] Guisbiers, G., Wang, Q., Khachatryan, E., Mimun, L. C., Mendoza-Cruz, R., Larese-Casanova, P., Webster, T. J., & Nash, K. L. (2016). Inhibition of *E. coli* and *S. aureus* with selenium nanoparticles synthesized by pulsed laser ablation in deionized water. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 3731–3736. <https://doi.org/10.2147/IJN.S106289>

[28] Ye, Z., Wang, S., Xu, Y., Zhang, J. y Yan, W. (2022). Inhibición mejorada de *Escherichia coli* resistente a fármacos mediante nanopartículas de sílice mesoporosa multiporosa cargadas con clorhidrato de tetraciclina. *Molecules*, 27 (4), 1218. <https://doi.org/10.3390/molecules27041218>

[29] Ashmore, D., Chaudhari, A., Barlow, B., Barlow, B., Harper, T., Vig, K., Miller, M., Singh, S., Nelson, E., & Pillai, S. (2018). Evaluation of *E. coli* inhibition by plain and polymer-coated silver nanoparticles. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 60, e18. <https://doi.org/10.1590/s1678-9946201860018>

[30] Cho, S., Jang, J.-W., Jung, S.-H., Lee, B. R., Oh, E., & Lee, K.-H. (2009). Precursor effects of citric acid and citrates on ZnO crystal formation. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 25(6), 3825–3831. <https://doi.org/10.1021/la804009g>

[31] Sirelkhatim, A., Mahmud, S., Seeni, A., Kaus, N. H. M., Ann, L. C., Bakhori, S. K. M., Hasan, H., & Mohamad, D. (2015). Review on zinc oxide nanoparticles: Antibacterial activity and toxicity mechanism. *Nano-Micro Letters*, 7(3), 219–242. <https://doi.org/10.1007/s40820-015-0040-x>

[32] Oskay Kahraman, Riza Binzet, Ersan Turunc, Aylin Dogen, Hakan Arslan. (2018). Synthesis, characterization, antimicrobial and electrochemical activities of zinc oxide nanoparticles obtained from sarcopoterium spinosum (L.) spach leaf extract. *IOP Science*. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/aad953>

[33] Luksiene, Z., Rasiukeviciute, N., Zudyte, B., & Uselis, N. (2020). Innovative approach to sunlight activated biofungicides for strawberry crop protection: ZnO nanoparticles. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, 203(111656), 111656. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111656>

[34] Zanet, V., Vidic, J., Auger, S., Vizzini, P., Lippe, G., Iacumin, L., Comi, G., & Manzano, M. (2019). Activity evaluation of pure and doped zinc oxide nanoparticles against bacterial pathogens and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology*, 127(5), 1391–1402. <https://doi.org/10.1111/jam.14407>

[35] Jalal, M., Ansari, M. A., Ali, S. G., Khan, H. M., & Rehman, S. (2018). Anticandidal activity of bioinspired ZnO NPs: effect on growth, cell morphology and key virulence attributes of *Candida* species. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46(sup1), 912–925. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1439837>

[36] Demirel, R., Suvacı, E., Şahin, İ., Dağ, S., & Kılıç, V. (2018). Antimicrobial activity of designed undoped and doped MicNo-ZnO particles. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 47, 309–321. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.07.024>

[37] Sharma, P., Jang, N.-Y., Lee, J.-W., Park, B. C., Kim, Y. K., & Cho, N.-H. (2019). Application of ZnO-Based Nanocomposites for Vaccines and Cancer Immunotherapy. *Pharmaceutics*, 11(10), 493. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11100493>

[38] Wachs, I. E., & Bañares, M. A. (Eds.). (2023). *Springer handbook of advanced catalyst characterization*. Springer International Publishing.

[39] Fetisov, G. V. (2020). X-ray diffraction methods for structural diagnostics of materials: progress and achievements. *Physics--Uspekhi*, 63(1), 2–32. <https://ufn.ru/en/articles/2020/1/b/>

[40] Mancera, G. G., & Amaya, M. E. N. (2006). *Principios de microscopía electrónica de barrido y microanálisis por rayos X característicos*.

[41] Felpeto, J. M., Villanueva, E. C., Torres, A. M. R., & Universidad de La Coruña. Servicio de Publicacións. (1994). *Técnicas de microscopía, micromanipulación y análisis de imagen*. Universidad de da Coruña, Servizo de Publicacións.

[42] Muños, R. A. E. (s/f). *La microscopia electrónica de barrido en la caracterización de materiales*. <https://revistas.anahuac.mx/index.php/masciencia/article/view/1492/1475>

[43] Alvarado, J. A., Gonzalez, G. S. A., & Cao, G. (2024). Rapid and efficient mineralization of methylene blue dye (above 95 % in 20 min) catalyzed by ZnO nanoparticles under sunlight. *Materials Today Sustainability*, 27(100883), 100883. <https://doi.org/10.1016/j.mtsust.2024.100883>

[44] Cercenado, E., Cantón, R., Dolores, M., Martín, R., Manuel, J., Merino, A., & Cercenado Mansilla, E. (s/f). *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Seimc.org. Recuperado el 11 de noviembre de 2025, de <https://seimc.org/wp-content/uploads/2025/06/seimc-procedimientomicrobiologia32.pdf>

[45] Rodríguez D, Sotelo J, Espinosa C, Arroyo O, Villaseñor N. (2025). *Manual de prácticas del laboratorio de Ingeniería de los Procesos Biológicos*. Unam.mx:8080. [http://dicyg.fi-c.unam.mx:8080/LaboratorioSanitaria/laboratorios-1/mado-95\\_ipb\\_-2025-2-\\_v3.pdf](http://dicyg.fi-c.unam.mx:8080/LaboratorioSanitaria/laboratorios-1/mado-95_ipb_-2025-2-_v3.pdf)

[46] Giménez, J. B., & Giraudó, H. (2006). *Guía de Trabajos Prácticos Cátedra de Microbiología e Inmunología*. Edu.ar. Recuperado el 11 de noviembre de 2025, de [https://editorial.unam.edu.ar/images/documentos\\_digitales/Guia\\_TP\\_Catedra\\_Microbiologia\\_e\\_Inmunologiaa-.pdf](https://editorial.unam.edu.ar/images/documentos_digitales/Guia_TP_Catedra_Microbiologia_e_Inmunologiaa-.pdf)