



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE PUEBLA**



Facultad de Ciencias Químicas BUAP

Facultad de Ciencias Químicas

Licenciatura en Químico Fármaco-Biólogo

**“Efecto bactericida de material nanoestructurado intercambiado con
plata”**

**Tesis para obtener el título de
Químico Farmacobiólogo**

Presenta

p.Q.F.B. Brenda Gómez Aguilar

Director de tesis

M.C. Martha Alicia Salgado Juárez

Codirectores

D.C J.Miguel Angel Hernández Espinosa

Dra. Reyna Almiray Pinzón de Dios

Contenido

1	RESUMEN	4
2	INTRODUCCION	5
2.1	Enfermedades infecciosas.....	5
2.2	Antibióticos	5
2.3	Resistencia bacteriana.....	6
2.4	1.4 Zeolita Clinoptilolita (ZC)	8
2.5	1.5 Actividad antimicrobiana de la plata.....	11
2.6	1.6 Nanopartículas de plata	11
2.7	Mecanismo de acción bactericida de la plata	12
3	Marco teórico.....	13
4	Definición del problema	14
5	Pregunta científica	15
6	Justificación	15
7	Hipótesis.....	15
8	Objetivos	15
8.1	Objetivo general.....	15
8.2	Objetivos específicos.....	16
9	Diseño de la investigación	16
9.1	Tipo de estudio.....	16
9.2	Definición del universo.....	16
9.3	Tamaño de la muestra.....	16
9.4	Criterios de inclusión.....	17
9.5	Criterios de exclusión.....	17
9.6	Criterios de eliminación	17
10	Diagrama de trabajo.....	18
11	Metodología	19
11.1	Material de trabajo	19
11.2	Material biológico	19
11.3	Reactivos	19
11.4	Equipo	19
12	Caracterización de zeolita	20
12.1	.Obtención del talco	20

12.2	Modificación de la zeolita	20
12.3	Acondicionamiento de la zeolita con Plata	20
13	Estudio microbiológico	21
13.1	Metodo por bioensayos (difusión en pozos).....	21
14	Resultados	22
14.1	Caracterización de zeolita clinoptilolita.	22
14.1.1	Difraccion de rayos X.....	22
14.1.2	SEM (Scanning Electron Microscope).....	22
14.1.3	EDS (Espectroscopia de rayos X de energía dispersiva)	23
14.1.4	Adsorción de N ₂	24
15	ESTUDIO MICROBIOLOGICO.....	27
16	DISCUSION DE RESULTADOS	30
17	CONCLUSIONES	31
18	Anexos	32
19	Referencias.....	36

1 RESUMEN

Actualmente las enfermedades infecciosas son un serio problema de salud. Con el desarrollo de los antimicrobianos, se pensó que se alcanzaría el control de las infecciones de cualquier tipo, sin embargo, millones de personas, ven afectado su estado de salud, por la creciente resistencia bacteriana. Por lo que el siguiente trabajo se planteó como objetivo, emplear una Zeolita Clinoptilolita (ZC), intercambiada con nanoparticulas de plata (AgNPs) para potencializar su actividad antimicrobiana. Para cumplir esta finalidad se emplearon 8 cepas ATTC. 4 Gram negativas (*E. coli* ATCC 25922, *K. pneumonie* ATCC 700603, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *A. baumannii*) y 4 Gram positivas (*S. aureus* ATCC 29213, *S. saprophyticus salvaje*, *S. epidermidis* ATCC 12228, *E. feacalis* ATCC 29211) estas cepas se sembraron por la técnica de diffusion en pozo, con las concentraciones de ZC-Ag de 0.01, 0.03, 0.06 y 0.09 N. En todas las cepas se observo la formación de un halo de inhibición de 10 a 17 mm, en las diferentes concentraciones de ZC- Ag. Siendo la concentración de 0.09N en la que se identifico el halo de inhibición de mayor tamaño. Se concluye que esta zeolita intercambiada con plata en esta concentración, presenta un producto alternativo con efectividad bactericida. Este comportamiento permite resaltar la importancia de encontrar nuevos materiales nanoestructurados, que apoyen el combate a la resistencia microbiana, al hacer uso de compuestos inocuos al organismo y con potencial para poder producirlos a bajo costo.

2 INTRODUCCION

Durante su existencia en el planeta el ser humano ha estado expuesto a toda una serie de microorganismos causantes de enfermedades, mismas que debido al mal uso de los farmacos se han convertido en problema de salud pública.

2.1 Enfermedades infecciosas

Las enfermedades infecciosas representan una situación problemática para la sociedad. El desarrollo de los antimicrobianos, hizo pensar que se alcanzaría el control de las infecciones de cualquier tipo, sin embargo en la actualidad millones de personas, sobre todo en países con recursos limitados amplios sectores de su población se ven afectados en su estado de salud. Por otra parte, aunque en nuestro entorno han disminuido enfermedades altamente contagiosas, en las últimas décadas hemos claramente observado un resurgimiento de enfermedades que se creían controladas, y a su vez hemos visto el surgimiento de otros patógenos (virus de la inmunodeficiencia humana [VIH], coronavirus, virus de la gripe A H5N1 o H1N1) además de microorganismos resistentes a la mayoría de los antimicrobianos disponibles en la actualidad (Periago, 2018)

Los antimicrobianos son el componente clave para el tratamiento de las enfermedades infecciosas, sin embargo, si se emplean de manera inadecuada, pueden generar resistencia.

Día a día se incrementa el número de microorganismos resistentes, lo que genera aumento en los costos del tratamiento, la diseminación de la enfermedad y la duración de la misma (Okeke IN, 2005).

La OMS hizo un llamado a gobiernos, profesionales de la salud, la industria, sociedad civil y a los pacientes para que actúen de manera urgente y coordinada a fin de atenuar la propagación de la resistencia, limitar sus repercusiones actuales y preservar los adelantos médicos para las generaciones futuras. (World Health Day, 2012)

2.2 Antibioticos

Desde su descubrimiento en los primeros años del siglo xx, con el descubrimiento por Paul Ehrlich de la salvarsan usado para el tratamiento de la sífilis, se consideró que la batalla contra las enfermedades estaba ganada, dado que los antibióticos previenen el crecimiento bacteriano funcionando como bacteriostático o bactericida y forman parte integral para asegurar la salud. (Shukuri, 2017).

Los mecanismos por los que alteran la biología de las bacterias es de lo mas variado, sin embargo los principales son los siguientes: (Roca, 2004).

- Inhibición de la síntesis de la pared celular.
- Desorganización de la membrana citoplasmática.
- Inhibición de la síntesis de proteínas.
- Interferencia en la síntesis y/o metabolismo de los ácidos nucleicos.
- Antimetabolitos que bloquean la síntesis de ácido fólico.

La eficacia que muestran los antibióticos, lleva consigo un problema grave que es la resistencia a los mismos. Dicha resistencia fue reconocida por el mismo Alexander Fleming; en los últimos veinte años se han producido cepas peligrosas y resistentes con una regularidad significativa. (Tor, 2014).

2.3 Resistencia bacteriana

Los microorganismos resistentes a la mayoría de los antimicrobianos se conocen como ultrarresistentes. (Salud, Sistema mundial de vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos. Manual para la primera fase de implementación, 2017). Para 1946, después de iniciada la disponibilidad de la penicilina para uso médico abierto, el 14% de las cepas de *Staphylococcus aureus* mostraron resistencia a la penicilina, y ya para 1950 la resistencia creció al 59%, y en 2014 se reporto una resistencia del 99%.

Un número significativo de infecciones extraintestinales resistentes se reparten entre *Klebsiella* (KPC) y *Escherichia coli* (fenotipo ESBL). En México, en las últimas tres décadas se han incrementado las clonas multirresistentes. (Samuel Ponce de León-Rosales, 2015).

Las principales causas que han originaron la crisis de la resistencia son:

1. Uso indiscriminado de antibióticos
2. Prescripciones médicas inapropiadas
3. Uso en industrias agropecuaria, piscicultura y alimentaria.
4. Disponibilidad antibióticos nuevos
5. Barreras regulatorias de organismos internacionales

1. **Uso excesivo de antibióticos:** estudios epidemiológicos han demostrado una relación directa entre el consumo de antibióticos y la emergencia y diseminación de cepas bacterianas resistentes. (C. Lee Ventola, 2015). En varios países desarrollados, el uso excesivo es debido a una fácil disponibilidad de medicamentos antimicrobianos que pueden ser adquiridos sin receta médica. La Red Europea de Vigilancia del Consumo de

Antimicrobianos (ESAC) reportó que durante el año 2012 los medicamentos beta-lactámicos/penicilínicos representaron un 50% del consumo total de antibióticos de uso sistémico y amoxicilina. En los Estados Unidos proveedores de servicios de salud recetaron 258 millones de tratamientos con antibióticos (833 prescripciones por cada 1000 personas) en el año 2010. Las categorías de antibióticos con mayor incidencia fueron: penicilínicos en un 23% seguido de macrólidos en un 22%. (Francesca Prestinaci, 2015).

2. **Prescripciones médicas inapropiadas:** estudios han demostrado que la indicación del tratamiento, elección del agente o duración de la terapia con antibióticos es incorrecta en un intervalo del 30-50% de casos. Además, del 30-60% de antibióticos prescritos en unidades de cuidado intensivo han sido detectadas como: innecesarias, inapropiadas o deficientes. (C. Lee Ventola, 2015).
3. **Uso en industrias agropecuaria, piscicultura y alimentaria:** la OMS ha adoptado nuevas medidas con la finalidad preservar la eficacia de los antibióticos importantes para la medicina humana reduciendo su uso innecesario en animales.
4. **Disponibilidad antibióticos nuevos:** la industria farmacéutica ha limitado su desarrollo en la creación de nuevos antibióticos por lo que la OMS ha puesto en marcha la Alianza Mundial para la Investigación y el Desarrollo de Antibióticos, lo que tiene como objetivo para el año 2023 desarrollar y entregar antibióticos nuevos y mejorados apartir de los ya existentes.
5. **Barreras regulatorias:** Para que nuevos antibióticos puedan estar disponibles es necesario desarrollar vías regulatorias y mejorar la capacidad de evaluarlos en ensayos clínicos. (Samuel Ponce de León-Rosales, 2015).

La resistencia antimicrobiana ha generado problemas a la salud, tal es el caso de las enfermedades que se presentan en los hospitales llamadas infecciones nosocomiales. (Alós, 2015). En el año 2017 la OMS dio una lista dividida en tres categorías: prioridad crítica, alta o media.

- a) Prioridad crítica incluye las bacterias multirresistentes que son especialmente peligrosas en hospitales, residencias de ancianos y entre los pacientes que necesitan ser atendidos con dispositivos como ventiladores y catéteres intravenosos. Entre tales bacterias se incluyen las siguientes: *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y varias enterobacteriáceas como *Klebsiella*, *E. coli*, *Serratia*, y *Proteus*. Son bacterias que pueden provocar infecciones graves y a menudo letales, como infecciones de la corriente sanguínea y neumonías.

- b) Prioridad alta y media. Bacterias que exhiben una farmacorresistencia creciente y provocan enfermedades comunes como la gonorrea o intoxicaciones alimentarias por salmonella. Además creo un sistema para la vigilancia mundial de la resistencia antimicrobiana Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS), cuyo objetivo es documentar los esfuerzos de participación y resultados de los sistemas de vigilancia de resistencia antimicrobiana y datos de resistencia microbiana de los países asociados. (Salud, La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos, 2017)

Es imprescindible el apoyo de la investigación desde todos los ángulos: ciencias básicas, farmacológica, clínica, operacional, estudios económicos, para proporcionar una base de evidencias que sustenten intervenciones eficaces para la contención de la resistencia a los antimicrobianos. La resistencia a los medicamentos no está en el horizonte futuro, se encuentra en la realidad cotidiana, y las respuestas se han de encontrar de manera urgente. (World Health Day, 2012)

Bajo este panorama hoy día se buscan nuevas alternativas a este problema, como es la búsqueda de sustancias o compuestos ya presentes en la naturaleza que sean accesibles y de bajo costo. Una de las propuestas es la aplicación de nanomateriales, diseñando sistemas a escala de nanómetros, estas estructuras debido al pequeño tamaño de sus partículas, poseen propiedades y características nuevas o mejoradas tal es el caso de la Zeolita Clinoptilolita (ZC) modificada, que intercambiada con plata potencializa la actividad antimicrobiana, realizando investigación en aislados bacterianos multirresistentes, sobre los cuales se observaría el efecto bactericida.

2.4 1.4 Zeolita Clinoptilolita (ZC)

En aplicaciones industriales, muchos sólidos que poseen poros de dimensiones cercanas a las moleculares (microporos) son usados como adsorbentes selectivos debido a la especificidad fisicoquímica que despliegan hacia ciertas moléculas en contraste con los substratos mesoporosos más comunes. Adsorbentes con estas propiedades selectivas incluyen carbones activados, sílice microporosa y zeolitas (C. Wang, 2004).

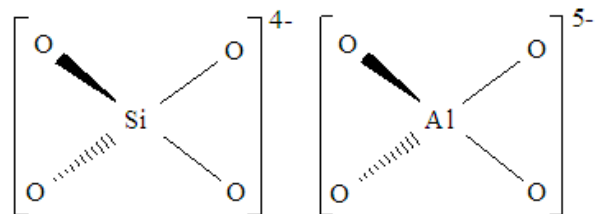
Una zeolita mineral es una sustancia cristalina con una estructura caracterizada por un armazón de tetraedros unidos, cada uno consiste de cuatro átomos oxígeno rodeando un catión. Este armazón contiene cavidades abiertas en forma de canales y jaulas, los cuales están usualmente ocupados por moléculas de agua y los

cationes fuera del armazón son comúnmente intercambiables. (DOUGLAS S. COOMBS, 1997).

La zeolita es un mineral hidratado y con forma cristalina conformada por átomos de silicio, aluminio y oxígeno, los cuales, forman una unidad conformacional tetraédrica, donde, el átomo de silicio (Si) o aluminio (Al) ocupa el centro de la molécula rodeado de cuatro átomos de oxígeno (**Figura1**). Esta estructura se conoce con el nombre de “ion ortosilicato” y contiene cuatro cargas negativas que son estabilizadas por cationes (metales alcalinos o metales alcalinotérreos) que estabilizan la carga del mineral y que pueden ser cambiados por otros iones monovalentes o divalentes. Los cationes más comunes son: sodio (Na), potasio (K) y calcio (Ca). La zeolita clinoptilolita es un mineral abundante, presente en depósitos naturales y se encuentra disponible a un bajo costo. Tiene las siguientes características:

- fórmula molecular: $(\text{Na}, \text{K})_6(\text{Si}_{30}\text{Al}_6\text{O}_{72}) \cdot 20\text{H}_2\text{O}$
- relación Si/Al de 4.0 a 5.7
- intercambio iónico de 2.0 a 2.6 meq/g de zeolita. (Mohau Moshoeshe, 2017).

Figura 1. Arreglos tetraédricos de las moléculas de SiO_4 y AlO_4 que forman la unidad de la zeolita.



La capacidad del intercambio iónico depende del radio silicio/aluminio Si/Al en la estructura, donde, generalmente las zeolitas con un radio reducido tienen una mayor capacidad de intercambio iónico (Selami Demirci, 2014).

Existen diversos grupos de zeolita (clinoptilolita, analcimas, natrolitas, filipsitas, heulanditas, mordenitas, chabasitas, faujasitas, laumontitas y pentasil (Pedro Bosch, 1997) que difieren en cuanto a estructura molecular, grado de hidratación y volumen de poro.

El siguiente esquema corresponde a la zeolita clinoptilolita compuesta por tetraedros de SiO_4 , en donde, se indica el intercambio iónico que puede ocurrir al entrar en contacto con un ambiente que propicie este intercambio o con un material afín. (Figura 2)(Sandra Kraljević Pavelić, 2018).

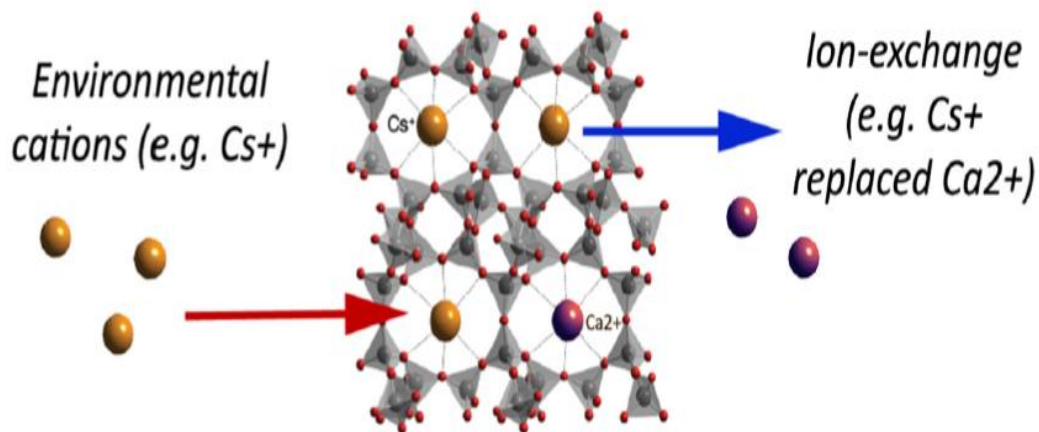


Figura 2. En este esquema se representa el intercambio iónico que ocurre con el ion Cesio proveniente del medio ambiente y desplaza a un ion calcio dentro del tetraedro SiO₄.

Este mineral cuenta con propiedades y mecanismos de acción en el cuerpo humano y que aún siguen en investigación. Tres de las características que sobresalen son las siguientes:

Intercambiador iónico. Es una de las características más importantes de la zeolita ya que tiene la capacidad de intercambiar parcial o totalmente su cationes, un caso interesante es el comportamiento que presenta la zeolita con plata que permite adquirir propiedades antimicrobianas.

Adsorbente. La alta eficiencia de adsorción de las zeolitas está relacionada a la gran superficie interna que esta posee. Cuando el tamaño del poro disminuye se produce un incremento significativo del potencial de adsorción, ocasionado por el solapamiento de los potenciales de las paredes del poro. Así, para un mismo adsorbato, la interacción con las paredes del poro es mayor cuanto menor es el tamaño del poro, y por tanto, mejor el confinamiento de la molécula adsorbida (Garcia, M.J, 2002).

Porosidad. Hace que las zeolitas presenten una superficie interna extremadamente grande en relación a su superficie externa.

Cuando la distancia entre dos superficies es suficientemente corta, los potenciales de adsorción se suman, de forma que una molécula situada en el interior del poro se ve atraída por toda la superficie del poro aumentando la fuerza con la que se ve atraída. Es decir, a medida que disminuye el tamaño del poro más profundo se hace el pozo de potencial. En el caso de que el poro sea suficientemente ancho las moléculas se irán adsorbiendo formando una monocapa a una distancia determinada de la superficie (distancia de adsorción), y a medida que aumenta la cantidad adsorbida el adsorbato se ordena en capas sucesivas (llenado en multicapas) (Gregg y Sing, 1967)

2.5 1.5 Actividad antimicrobiana de la plata

La plata ha sido utilizada por sus propiedades antimicrobianas por cientos de años. Originalmente, se usaban conductos construidos con este metal para preservar el agua y su aplicación como propuesta médica está documentada desde 750 D.C. El primer artículo científico que describe el uso de la plata como antibacteriano fue atribuido a Credé para la prevención de infecciones oculares en los neonatos en 1881 y como antiséptico en 1901. La eficacia del nitrato de plata contra *Pseudomonas aeruginosa* se vio como un importante beneficio debido a que estos microorganismos, 11 eran considerados una causa primaria de muerte en pacientes con heridas por quemaduras extensas (Hoyme, 1993).

Los iones de plata (Ag^+) han sido ampliamente conocidos por tener efectos inhibitorios, bactericidas y propiedades antimicrobianas de amplio espectro. Algunas sales de plata han demostrado ser efectivas contra quemaduras, osteomielitis crónica severa, infecciones del tracto urinario e infecciones por catéteres venoso centrales (Feng et al., 2000). Actualmente, la plata forma parte del listado de medicamentos esenciales de la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization, 2007).

En la actualidad se habla de nanopartículas de plata que aunado a la zeolita generan propiedades físicas y químicas que pueden ser empleadas en el área biomédica. Las nanopartículas metálicas presentan propiedades ópticas especiales debidas a la formación de ondas electromagnéticas superficiales llamadas plasmones Esta característica ha permitido desarrollar biosensores ópticos de absorción (Frederix F. et al, 2003; y Nath N y Chilkoti A., 2004).

2.6 Nanopartículas de plata

La búsqueda de nuevos materiales funcionales nanoestructurados se ha centrado en la manipulación a escala nanométrica, lo que conduce a la mejora de las propiedades en la macroescala (Berra, Irusta, Fernández y De Miguel, 2009)

Las nanopartículas de plata (NPsAg) son estructuras con un tamaño específico, el cual ronda de entre 1 a 100 nm y como consecuencia de este tamaño poseen propiedades fisicoquímicas únicas. (Roberto Vazquez Muñoz, 2014).

El tamaño y forma de las nanopartículas depende de la velocidad de reacción, que a su vez está determinada por condiciones de temperatura, pH, concentración de reactivos, capacidad reductora, tipo de agentes reductores y estabilizantes. Al finalizar la reacción química se obtienen nanopartículas en disolución que son de interés clínico. Se ha estudiado el efecto antimicrobiano que tienen sobre bacterias, hongos y virus. Así mismo, se ha demostrado su efecto cicatrizante. (Roberto Vazquez Muñoz, 2014).

A pesar de conocer el efecto bactericida de las nanopartículas de plata aún no se conoce a detalle el mecanismo de acción sobre los microorganismos.

2.7 Mecanismo de acción bactericida de la plata

El mecanismo que emplean las nanopartículas de plata para su efecto bactericida es incierto. Sin embargo, existen varias propuestas. Uno de ellos es su efecto que se relaciona con procesos biológicos, como la generación de especies de oxígeno reactivas (EROS) y la inducción de estrés oxidativo (EO), por el desacoplamiento del transporte de electrones y la desactivación de enzimas, particularmente a causa de la desnaturalización de los enlaces disulfuro de las proteínas bacterianas, que conduce a la apoptosis. (Chernousova S, Epple, M. 2013)(Thurman RB GC, Bitton G 1989) (Marin-Llera J. 2012).

3 MARCO TEÓRICO

En los últimos años las zeolitas han cobrado gran interés en la comunidad científica por sus propiedades antes citadas y en el área de la salud existen reportes que demuestran su actividad biológica.

Kreimir Paveli, 2018 Estudios recientes han demostrado que los depósitos naturales encontrados en Cuba de ZC es biológicamente activa y no tóxica donde se observa la eficiencia en la adsorción de glucosa, también como antidiarreico así como regulador del sistema inmune. También la Zeolita se ha usado en asociación a metales como: plata, cobre, zinc, como agente inhibidor de cepas bacterianas.

Jasna Hrenovic, 2013 empleando ZC con plata y cobre en cepas aisladas de *Acinetobacter baumannii*, demostró sensibilidad a diferentes concentraciones mínimas inhibitorias. Parte de este estudio reporta y hace mención de otros anteriores, que el efecto antimicrobiano de ZC en asociación a cationes es debido a la filtración y/o liberación de los mismos por parte de la ZC.

Por otra parte Selami Demirci, 2013 observo que las zeolitas cargadas con iones plata exhibieron mayor actividad bactericida en bacterias Gram negativas Gram positivas, levaduras y hongos.

Siti Aishah Mohd Hanim, 2015 ha encontrado actividad antibacteriana de Zeolita NaY modificada con diferentes concentraciones de 3-aminopropiltriétoxosilano en su superficie contra cepas bacterianas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* por la técnica de difusión en disco.

Rumeysa Tekin, 2016 en Turquía realizo un estudio demostrando el efecto antimicrobiano de Zeolita modificada, reportando que Las muestras de zeolita cargadas con iones cobre (Cu^{2+}) y iones zinc (Zn^{2+}) mostraron una excelente actividad antimicrobiana en contra de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, una levadura *Candida albicans* y un hongo *Aspergillus niger*.

Bajo esta perspectiva se presenta el siguiente trabajo que busca diseñar o identificar nuevos compuestos antimicrobianos con el fin de combatir los patógenos resistentes a fármacos existentes.

4 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

Actualmente, la alta incidencia de resistencia a los antibióticos como resultado del uso irracional de los mismos, ha generado una situación alarmante para tratar las infecciones, El continuo aumento de las cepas resistentes hacen necesario desarrollar nuevos antibióticos que puedan ser usados ante la multiresistencia. La Organización Mundial de la Salud en 2020, menciona a las resistencias bacterianas como una de las principales amenazas para la salud pública global.

Existen diversos trabajos referidos a combatir la resistencia, sin embargo, en relación a la obtención del producto implica costos elevados, no haciendo fácil la adquisición de los mismos. Por lo que se requiere que el producto sea de bajo costo. Por otra parte, en las últimas décadas se trabaja en el desarrollo de fármacos que permitan llegar de forma específica y controlada al sitio de acción. El tamaño nanométrico presenta ventajas en la administración. Las nanopartículas pueden utilizarse como base para el diseño de sistemas variados desarrollando productos alternativos a esta resistencia, como es la zeolita, mineral que se encuentra en grandes yacimientos en la república mexicana y por sus propiedades químicas, estructurales hacen que las zeolitas tengan una amplia variedad de usos en el ámbito farmacéutico. Donde se incorporan en fórmulas farmacéuticas como excipientes, para mejorar las propiedades farmacoterapéuticas, de principios activos como el diclofenaco o para potenciar el efecto de moléculas antibacterianas. Trabajar con una zeolita natural intercambiada con iones de plata potencializa el efecto bactericida, por su tamaño de partícula y la capacidad de la zeolita en el intercambio iónico. Permitiendo la disponibilidad de nuevos biomateriales caracterizados, con iniciativas de formulaciones innovadoras.

5 PREGUNTA CIENTÍFICA

¿La zeolita natural con iones de plata potencializa su efecto bactericida?

6 JUSTIFICACIÓN

La organización mundial de la salud (OMS) prevé que para el año 2050 sea uno de los principales problemas a tratar en el sector salud debido a esto se requiere la investigación de nuevas formas de presentación de los principios activos tales como los nano materiales mismos que están teniendo impacto en productos del cuidado de la salud como nanopartículas de plata , los productos médicos que incorporan nanopartículas de plata están entre los primeros éxitos comerciales de la nanotecnología , asu vez las zeolitas son materiales de muy baja toxicidad y fácilmente asequibles, de bajo costo debido a estas ventajas relacionadas con sus características químicas y estructurales lo hacen un material seguro.

En el presente trabajo resulta de interés combinar las propiedades bactericidas de la plata con las propiedades de la zeolita natural ya que, de esta manera, obtenemos una zeolita natural acondicionada con Ag que tendrá eficiencia en la eliminación de las bacterias brindando con ello una alternativa viable y eficaz para combatir microorganismos patógenos.

7 HIPÓTESIS

Mediante un tratamiento de la zeolita natural y acondicionamiento con plata es posible obtener un compuesto eficiente y eficaz con efecto bactericida.

8 OBJETIVOS

8.1 Objetivo general

Evaluar el efecto bactericida de la Zeolita Clinoptilolita con plata (ZC-Ag), en cepas bacterianas ATTC.

8.2 Objetivos específicos

- Caracterizar la zeolita clinoptilolita (ZC)
- Caracterizar la zeolita clinoptilolita intercambiada con plata (ZC-Ag)
- Analizar el efecto de ZC-Ag en cepas bacterianas.
- Identificar sensibilidad de cepas bacterianas.
- Implementar metodología de difusión en pozo.

9 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

9.1 Tipo de estudio.

- Prospectivo
- Analítico
- Transversal

9.2 Definición del universo.

Bacterias Gram-negativas y Gram-positivas ATCC proporcionadas por el servicio médico.

9.3 Tamaño de la muestra.

Se emplearon un total de 8 cepas bacterianas ATCC. de las cuales 4 fueron Gram negativas y 4 Gram positivas

- Gram negativas:

Escherichia coli ATCC 25922,
Klebsiella pneumoniae ATCC 700603
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853
Acinetobacter baumannii.

- Gram positivas :

Staphylococcus aureus ATCC 29213
Staphylococcus saprophyticus salvaje
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228.

9.4 Criterios de inclusión.

- Cepas bacterianas no exigentes
- Cepas ATCC proporcionadas por el servicio medico

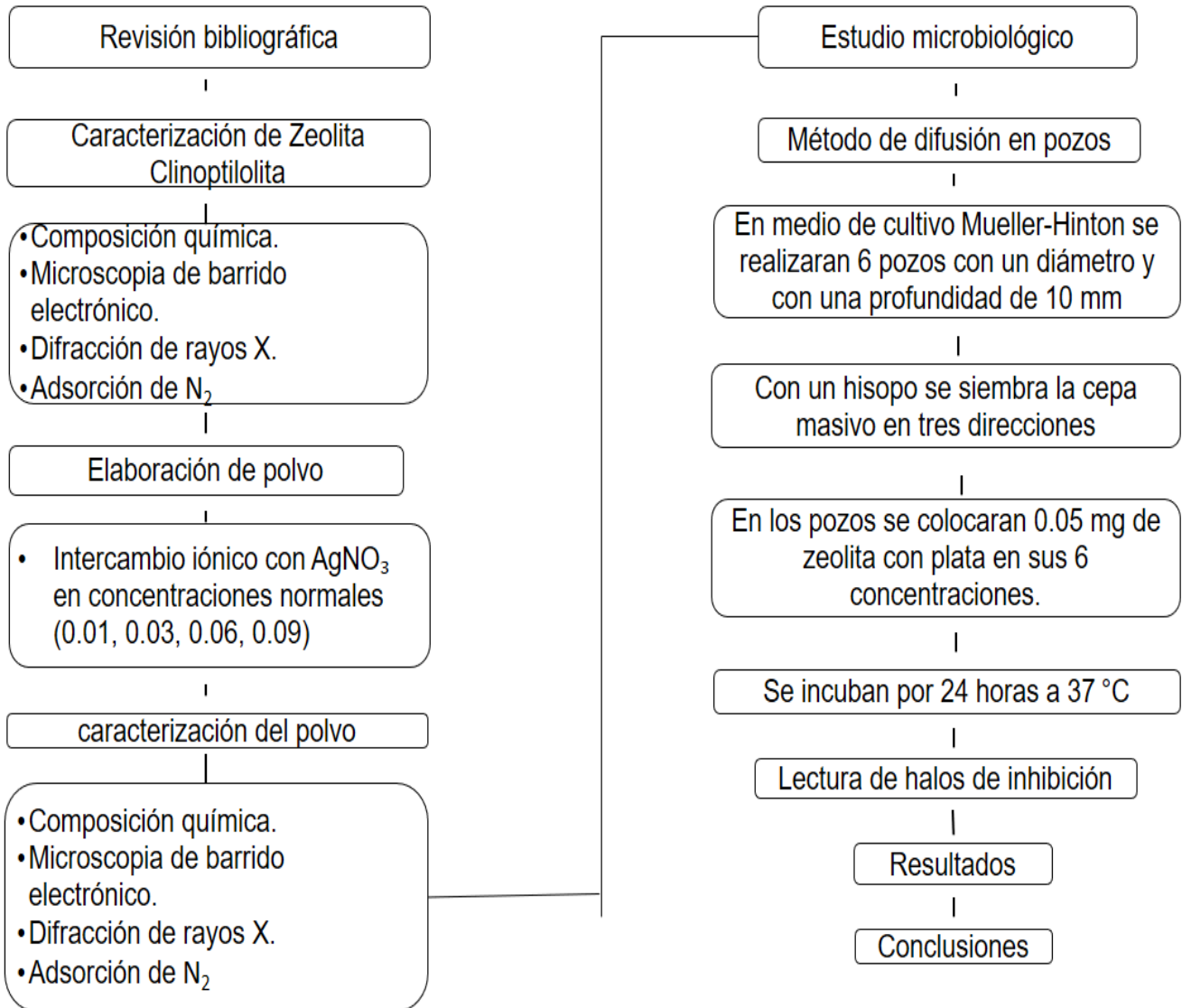
9.5 Criterios de exclusión.

- Cepas bacterianas exigentes.
- Cepas no proporcionadas por el servicio medico

9.6 Criterios de eliminación

- Cepas bacterianas no ATCC
- Cepas bacterianas no proporcionadas por el servicio medico

10 DIAGRAMA DE TRABAJO



11 METODOLOGÍA

11.1 Material de trabajo

- Tubos de ensaye de 3, 5, 10 y 20 mL
- Vasos de precipitados 50, 100 y 200 mL
- Matrazes Erlenmeyer de 150 y 1000 mL
- Placas Petri
- Gradillas
- Mechero Bunsen
- Puntas de Micropipetas
- Pinzas de presión para laboratorio
- Probeta de 100 mL
- Sensidiscos de papel filtro

11.2 Material biológico

- Cepas bacterianas proporcionadas por el servicio medico

11.3 Reactivos

- Agua destilada.
- Medios de cultivo para estriado: Müeller-Hinton, MacConkey.
- Medio de cultivo para revitalizar: sangre de carnero y MacConkey

11.4 Equipo

- Incubadora (France Etuves/XBO58)
- Autoclave (Viresa/ALL1915X)

12 CARACTERIZACIÓN DE ZEOLITA

La zeolita natural extraída de un yacimiento proveniente de San Gabriel Chilac, Puebla, México fue analizada antes de ser utilizada, con la finalidad de asegurar su calidad y tipo de zeolita, empleando los siguientes estudios

- SEM (Scanning Electron Microscope)
- Difracción de Rayos X
- Estudios de absorción de nitrógeno
- Composición química Energía dispersiva (EDS)

12.1. Obtención del talco

Después de la caracterización de la zeolita se procedió a una molienda con un mortero de porcelana, para obtener un tamaño de partícula óptima menor a $38\mu\text{m}$ y evaluar sus propiedades físicas. El ensayo se realizó por triplicado, con 3 distintas zonas de muestreo del lote.

12.2 Modificación de la zeolita

En un matraz se colocaron 10g de zeolita (Z17) en 250 mL. De una solución de HCl al 0.01 N. la mezcla se mantuvo en agitación por 3 horas, después se dejó sedimentar para posteriormente lavar con agua destilada, en un segundo proceso de agitación por 30 minutos, se dejó reposar, se decantó y del agua eliminada en la filtración, fue extraída una alícuota a la cual se agregó unas gotas de AgNO_3 0.1 N para corroborar la ausencia de cloruros.

12.3 Acondicionamiento de la zeolita con Plata

De las zeolitas previamente lavadas se prepararon las siguientes concentraciones de plata.

AgNO_3 Concentración (N)
0.01
0.03
0.06
0.09
0.1
0.2

Las zeolitas con las diferentes concentraciones, fueron secadas a una temperatura de 150°C por 8hrs.

13 ESTUDIO MICROBIOLÓGICO

Partiendo de las 8 cepas de referencia ATTC y para demostrar la inhibición bacteriana se empleo el metodo por bioensayo.

13.1 Metodo por bioensayos (difusión en pozos)

- Inoculación en medio de cultivo Müller-Hinton: se relizaron 6 pozos con un diámetro y profundidad de 10 mm. Una vez solidificados (24 h), se inocularon con las cepas correspondientes (estandarizadas a 0,5 de MacFarland) utilizando un hisopo estéril y realizando la estría en tres direcciones sobre el medio de cultivo bajo condiciones de esterilidad. Las cepas inoculadas fueron obtenidas de las placas de agar sangre de carnero.
- Con una espátula esterilizada de acero inoxidable se colocaron 0.5 mg de zeolita con plata en cada pozo con cada una de las concentraciones.
- Se metieron a incubar a una temperatura de 37 °C por 24 horas.
- Con una regla se mide el diámetro del halo de inhibición tomando en cuenta el pozo de zeolita con plata hasta donde se inhibio el crecimiento
- Las longitudes obtenidas determinan si es resistente, intermedio o suseptible.

14 RESULTADOS

14.1 Caracterización de zeolita clinoptilolita.

14.1.1 Difracción de rayos X

La difracción de rayos X se basa en la dispersión coherente del haz de rayos X por parte de la materia. La difracción de rayos en muestra policristalina permite abordar la identificación de fases cristalinas, puesto que todos los sólidos cristalinos poseen su difractograma característico. Es decir es un método que permite identificar los minerales por su estructura cristalina. En la Figura 1 se observa el difractograma de los patrones de difracción de las zeolitas en estudio. Estos resultados fueron obtenidos usando el programa de computo High Score Plus 3.0 procesando los patrones de difracción y las coordenadas atómicas de las fases presentes en cada muestra estudiada. observando que corresponde a una zeolita natural

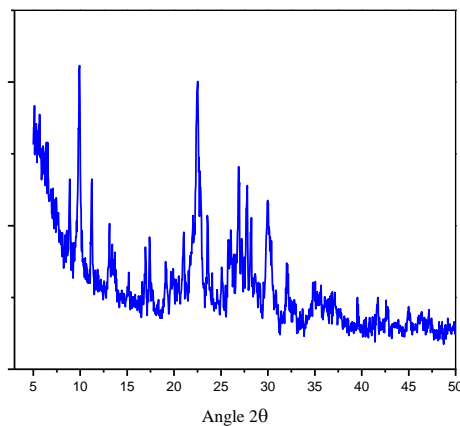


Fig. 1. Patrón de difracción de Rayos X de zeolita clinoptilolita de San Gabriel Chilac-Puebla, México

14.1.2 SEM (Scanning Electron Microscope)

El microscopio electrónico de barrido, permite la observación y caracterización superficial de materiales orgánicos e inorgánicos, dando información morfológica y de composición química rápida, eficiente y simultáneamente del material analizado. Su versatilidad está dada en su alta resolución (de 20 a 50 Å) y apariencia tridimensional de las imágenes, producto de su gran profundidad de foco.

En la Fig. 2 se muestran Imágenes de zeolita: Ca-clinoptilolita natural ATZ-P con distintos acercamientos mostrando la presencia de poros lamelares con diferente tamaño. (Miguel Angel Hernandez)

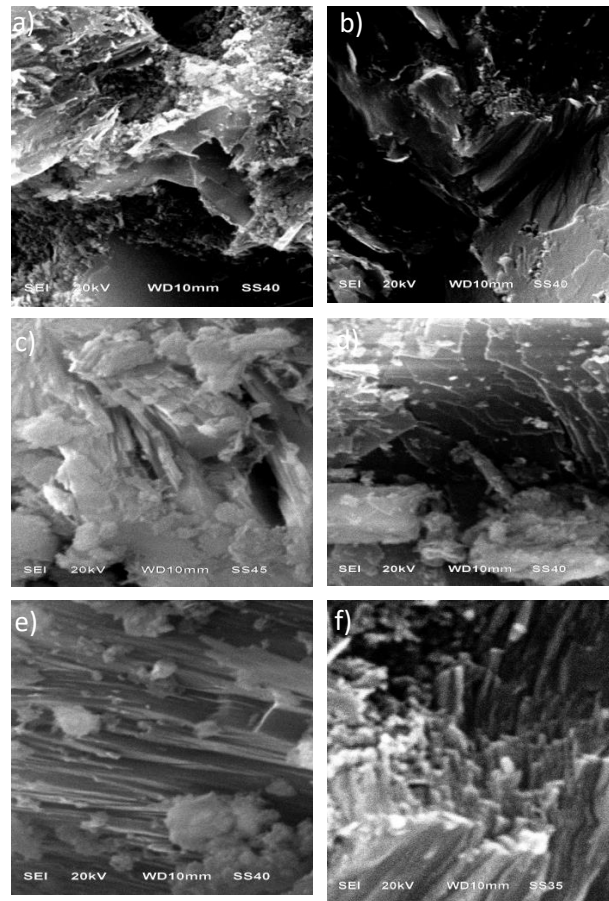


Fig. 2. Imágenes SEM de natural Ca-clinoptilolita con distintos acercamientos: (a, b, y c) 10000x, d y e) 15000x, y f) 40000x

14.1.3 EDS (Espectroscopia de rayos X de energía dispersiva)

EDS es una técnica analítica que permite la caracterización química/análisis elemental de materiales. El principal principio operativo es la capacidad de la

radiación electromagnética de alta energía (rayos X) para expulsar electrones del "núcleo" (electrones que no están en la capa más externa) de un átomo. La eliminación de estos electrones del sistema dejará un agujero que un electrón de mayor energía puede llenar y liberará energía a medida que se relaje. La energía liberada durante este proceso de relajación es única para cada elemento de la tabla periódica y, como tal, el bombardeo de una muestra con rayos X se puede utilizar para identificar qué elementos están presentes y en qué proporción están presentes. En la Tabla 1. Se muestran los resultados de composición química de la zeolita estudiada. Se observa que esta composición refleja los elementos constituyentes de las fases presentes, de estos resultados se observa el establecimiento de la siguiente secuencia:

Si/Al: ATZ-P > SGCH-P ~ SF-SLP; CaO: ATZ-P > SF-SLP > SGCH-P; MgO: ATZ-P > SGCH-P > SF-SLP;

TABLA 1.
COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS MUESTRAS (% EN PESO) SEGÚN DATOS EDS

Muestra	SiO ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	CaO	MgO	Na ₂ O	K ₂ O	TiO ₂	FeO	Si/Al	DOI
SGCH-P	64.97	12.32	ND	1.71	1.30	1.80	4.14	ND	1.616	5.27	ND

14.1.4 Adsorción de N₂

La superficie es el parámetro más importante que caracteriza y diferencia los sólidos entre sí, desde el punto de vista de su capacidad adsorbente. Su evaluación se realizó a partir de las isothermas de adsorción de gases y vapores de nitrógeno para determinar su área superficial, volumen y distribución de tamaño de poros.

Las isothermas de adsorción de N₂ a 77 K en las zeolitas estudiadas son mostradas en la Fig. 3.

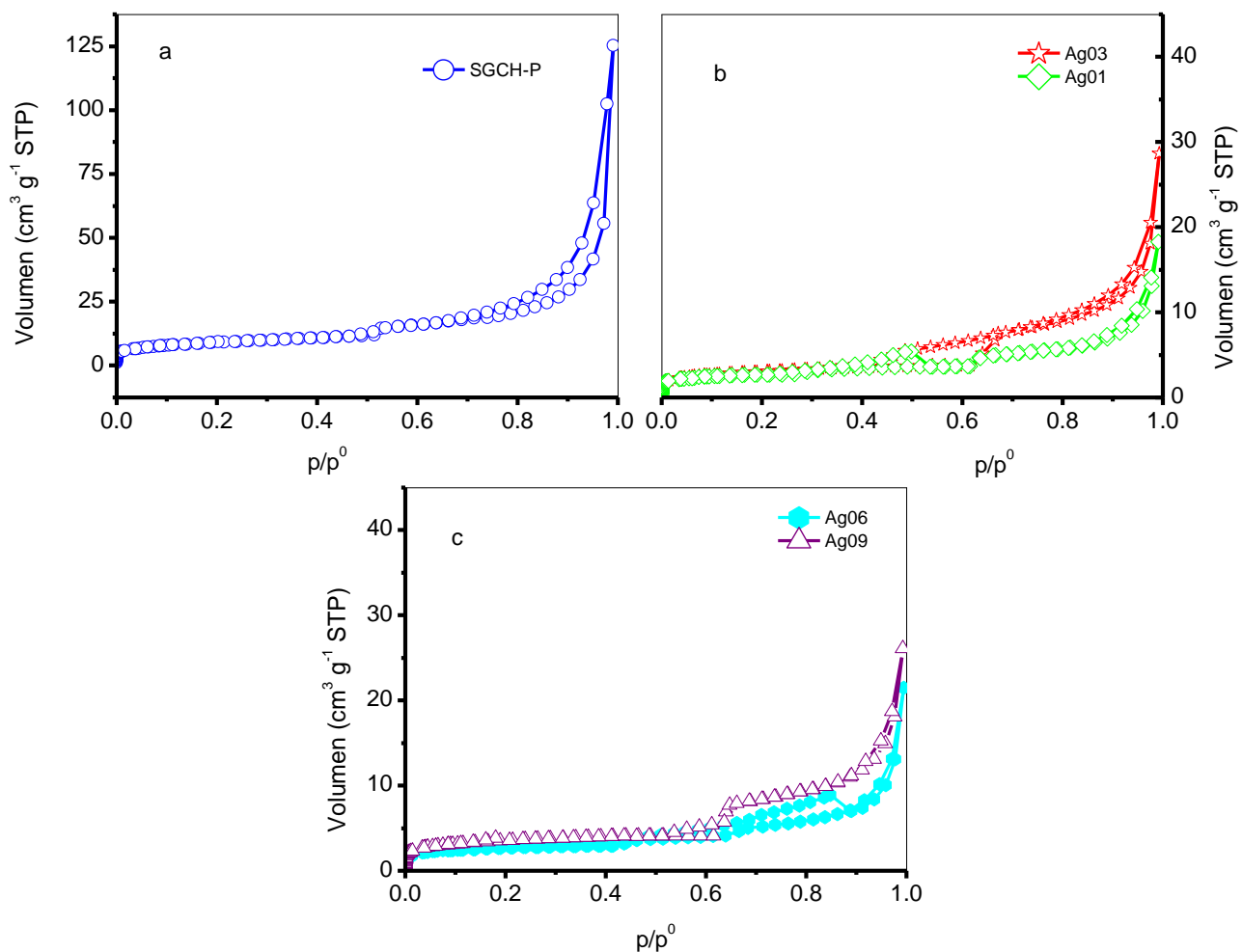


Fig. 3. Isothermas de adsorción de N₂ a 77 K en zeolitas Clinoptilolita natural e intercambiada con Ag

Los resultados texturales obtenidos de las isothermas de adsorción están dados en la Tabla 2.

TABLA 2. Parametros de textura en zeolitas clinoptilolita natural e intercambiada con Ag, determinada a partir de la adsorción de N₂ a 77 K.

Muestra	A _{SB}	C _B	A _{SL}	A _{St}	V _Σ	D _{p_{BJH}}
	m ² g ⁻¹		m ² g ⁻¹	m ² g ⁻¹	cm ³ g ⁻¹	Nm

ZSGCH- P	13.59	65	20.98	8.109	0.031	1.262/1.933/3.824/4.282
Ag01	8.94	-199	12.37	2.731	0.0157	5.545/5.533
Ag03	10.34	-610	15.88	6.682	0.028	NA
Ag06	8.85	-179	13.09	4.742	0.0155	3.666/7.021
Ag09	11.81	-41	17.69	4.906	0.0224	1.853/4.275/5.967

Siendo A_{SL} , superficie específica estimada por el método Langmuir; A_{SB} , superficie específica estimada por el método BET; A_{St} , área externa estimada por el método t, C_B constante de ecuación BET; V_{Σ} volumen total de poros y D_{pBJH} tamaño de poros, ecuación BJH.

15 ESTUDIO MICROBIOLÓGICO

TABLA 3. Cepas Gram negativas con clasificación ATCC empleadas en el estudio de la zeolita modificada con plata

Cepas	ATCC
<i>Escherichia coli</i>	25922
<i>Pseudomona aureoginosa</i>	27853
<i>Klepsiella pneumonie</i>	700603
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Sin/ATCC

FUENTE: elaboración propia

En la tabla 3 se muestran cepas Gram positivas con clasificación ATCC que se emplearon en el estudio, proporcionadas por el servicio médico

TABLA 4. Cepas Gram positivas con clasificación ATCC empleadas en el estudio.

Cepas	ATCC
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	salvaje
<i>Staphylococcus aureus</i>	29331
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228
<i>Enterococcus faecalis</i>	29211

FUENTE: elaboración propia

En la tabla 4 se muestran cepas Gram positivas con clasificación ATCC que se emplearon en el estudio, proporcionadas por el servicio médico.

TABLA 5. Halos de inhibición medios producidos en cepas Gram positivas en presencia de zeolita-plata por el método de difusión en pozo.

Cepa	Concentración de Ag-zeolita clinoptilolita	Halos de inhibición (mm)
<i>Escherichia coli</i>	0.01 N	10
	0.03 N	10
	0.06 N	12
	0.09 N	12
<i>Pseudomona aureoginosa</i>	0.01 N	11
	0.03 N	11
	0.06 N	14
	0.09 N	15
<i>Klepsiella pneumonie</i>	0.01 N	10
	0.03 N	10
	0.06 N	11
	0.09 N	11
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0.01 N	11
	0.03 N	14
	0.06 N	16
	0.09 N	17

FUENTE: elaboración propia

En la tabla 5 se muestran las medidas de los halos de inhibición en presencia de zeolita- plata en cepas Gram positivas, respecto a las 4 cepas; se encontró diferencia en las 6 concentraciones siendo la concentración de 0.09 N la que presenta un mayor halo de inhibición en las 4 bacterias, seguida de la concentración de 0.06 N

TABLA 6. Halos de inhibición medios producidos en cepas Gram negativas en presencia de zeolita- plata por el método de difusión en pozo

Cepa	Concentración de Ag-zeolita clinoptilolita	Halos de inhibición (mm)
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	0.01 N	11
	0.03 N	13
	0.06 N	14
	0.09 N	15
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.01 N	10
	0.03 N	10
	0.06 N	13
	0.09 N	13
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0.01 N	11
	0.03 N	13
	0.06 N	14
	0.09 N	15
<i>Enterococcus faecalis</i>	0.01 N	-
	0.03 N	9
	0.06 N	11
	0.09 N	12

FUENTE: elaboración propia

En la tabla 6 se muestran promedios de medidas de los halos de inhibición en presencia de zeolita- plata en cepas Gram negativas, respecto a las 4 cepas; se encontró diferencia en las 6 concentraciones siendo la concentración 0.09 N que presenta un mayor halo de inhibición en las 4 bacterias, seguida de la concentración 0.06 N.

TABLA 7. Control positivo y negativo para *staphylococcus aureus* ATCC 29331

	Halo de inhibición (mm)	Cepa
Control positivo Vancomicina	25	<i>Staphylococcus aureus</i>
Control negativo Zeolita clinoptilolita	-	

FUENTE: elaboración propia

16 DISCUSION DE RESULTADOS

Para iniciar este estudio fue necesario caracterizar a la zeolita, conocer sus propiedades para ser empleada como un agente bactericida, con los resultados obtenidos, la zeolita presenta estructura, y composición química adecuada para aplicaciones farmacéuticas

También a través del estudio de composición química se demuestra las nanopartículas de plata intercambiadas en la zeolita.

En la tabla 5 y 6 se observa el efecto bactericida de los iones metálicos mismos que se han utilizado como agentes antimicrobianos, confirmando con ello que la plata es un ion metálico utilizado por su eficiente actividad bactericida misma que al ser combinada con la estructura y propiedades químicas que presenta la zeolita potencializa el intercambio iónico incrementando con ello su efecto bactericida.

Dentro de las cepas gram positivas (tabla 5) las cuatro utilizadas en este trabajo presentan un efecto bactericida teniendo una mayor inhibición en *Acinetobacter baumannii* con un halo de inhibición de 17 mm en la concentración 0.09 N, seguida de *Pseudomonas aureoginosa* con un halo de 15 mm, *Escherichia coli* con un halo de 12 mm y *Klebsiella pneumoniae* con un halo de 11 mm en la concentración 0.09 N. Por su parte las cepas Gram negativas (tabla 6) de igual manera las cuatro presentan efecto bactericida presentando una mayor inhibición en *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus saprophyticus* con un halo de 15 mm seguida de *Staphylococcus aureus* con un halo de 13 mm y *Enterococcus faecalis* con un halo de 12 mm en la concentración de 0.09 N.

Al comparar nuestros resultados con los ya realizados por Hrenovic y colab en 2013 que reportan este efecto de una zeolita con plata en cepas aisladas de *Acinetobacter baumannii*, de manera similar investigadores de Malasia reportan el efecto en cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Demirci y colab. En 2014 reportan un efecto antimicrobiano de zeolita con plata en bacterias Gram positivas y Gram negativa.

En diversos artículos como Kreimir Paveli, 2000 se menciona a la zeolita inocua para el organismo, y en los que las concentraciones de plata son muy por debajo de lo reportado como toxicidad, lo que permite a la zeolita con plata ser considerada un biofarmaco ya que es un compuesto que no presenta conservadores, además de que elimina a los microorganismos y no genera toxinas, ya que el cuerpo no tiene la necesidad de metabolizarlos y por lo tanto no sufre desgaste físico.

La aplicación de este compuesto cobra importancia para las bacterias con resistencia, tal es el caso del biofilm de *Staphylococcus epidermidis* en las infecciones de prótesis articular que hasta ahora ha sido compleja ya que no existen muchas opciones terapéuticas efectivas. Por lo tanto, desde hace una década, grupos de investigación se han dado a la tarea de entender el mecanismo de formación de la biopelícula, identificar qué moléculas son las que coordinan todo este proceso y cuáles son los principales componentes de la biopelícula; con el fin

de buscar opciones terapéuticas más efectivas (G, 2010). es por ello que en el área de biomateriales, se está intentando diseñar un implante articular inteligente, que sea capaz de biosensar las células bacterianas. Cuando el implante detecte a las bacterias en su superficie, liberará compuestos que inhiban la adhesión bacteriana y así obtener enfoques novedosos para el tratamiento. (Patel, 2012)

Debido a las características físicas y químicas que posee la zeolita puede ser utilizada como un material que permite potenciar la actividad antimicrobiana de los iones de plata para con ello erradicar a las bacterias formadoras de biopelículas creando también resistencia a los antibióticos.

17 CONCLUSIONES

Este trabajo permite hacer incapie en la importancia de encontrar nuevos materiales nanoestructurados, que apoyen en el combate a la resistencia microbiana, el hacer uso de compuestos que sean de bajo costo e inocuos al organismo. además de los siguientes aspectos como son:

- La caracterización fisicoquímica de la zeolita clinoptilolita (ZC) realizada en el Departamento de Investigación en Zeolitas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (ICUAP).
- Se demostró la presencia de Zeolita Clinoptilolita natural mediante Difracción de Rayos X y Espectroscopia de Rayos X de Energía Dispersiva.
- Se caracterizó la Zeolita Clinoptilolita intercambiada con plata mediante Adsorción de Nitrogeno
- Se evaluó el efecto bactericida de la Zeolita Clinoptilolita con plata (ZC-Ag), en cepas bacterianas ATTC.
- Se realizó la aplicación del método difusión en pozo para evaluar el efecto bactericida de ZC-Ag. Considerando una buena técnica para este estudio.
- Las concentraciones de plata empleadas en este estudio son inocuas para el organismo.
- La zeolita intercambiada con plata se presenta como un compuesto alternativo con efecto bactericida

18 Anexos

Tabla 1. Bioensayos en bacterias Gram positivas por la técnica de difusión en pozo en presencia de zeolita-plata.



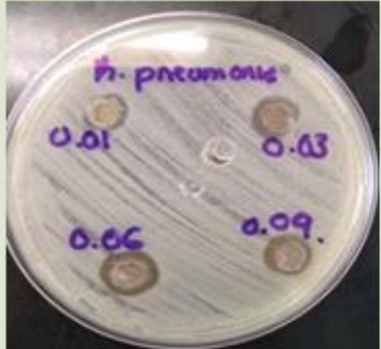

CEPA	ATCC	
<i>Escherichia coli</i>	25922	
<i>Pseudomonas aureoginosa</i>	27853	
<i>Klepsiella pneumonie</i>	700603	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Sin ATCC	

Tabla 2. . Bioensayos en bacterias Gram Negativas por la técnica de difusión en pozo en presencia de zeolita-plata.

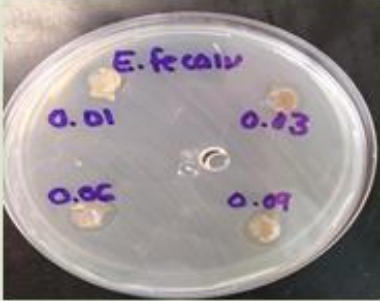
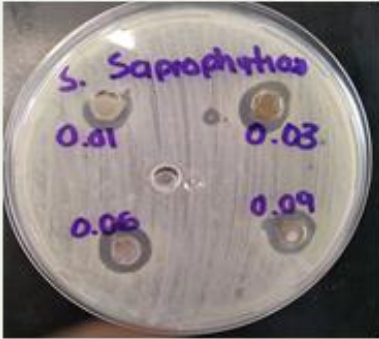



CEPA	ATCC	
<i>Enterococcus faecalis</i>	29211	
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	salvaje	
<i>Staphylococcus aureus</i>	29331	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	

Tabla 3. Control positivo y negativo

CEPA	ATCC	
<i>Staphylococcus aureus</i>	29331	

19 Referencias

- [1] Mirta Roses Periago: Directora (2018). La resistencia a los antimicrobianos: un factor de riesgo para las enfermedades infecciosas. La resistencia a los antimicrobianos: un factor de riesgo para las enfermedades infecciosas, Oficina Sanitaria Panamericana, Washington D.C., Estados Unidos de América.
- [2] Okeke IN, Laxminarayan R, Bhutta ZA, Duse AG, Jenkins P, O'Brien TF, et al. Antimicrobial resistance in developing countries. Part I: recent trends and current status. *Lancet Infect Dis.* 2005;5(8):481-93)
- [3] World Health Day 2011: Policy briefs [Internet]. Disponible en: <http://www.who.int/worldhealth-day/2011/presskit/WHDIIntrotoBriefs.pdf> Acceso el 6 de enero de 2012.
- [4] Dugassa, jiregna & shukuri, nesrie & shukuri,. (2017). review on antibiotic resistance and its mechanism of development review on antibiotic resistance and its mechanism of development.
- [5] Leyva, a. g. (2007). síntesis y caracterización de nano-estructuras de óxidos de metales de transición, tesis doctoral, universidad nacional de general san martín, república argentina www.tandar.cnea.gov.ar/doctorado/tesis/leyva.pdf.
- [6] Berra, i., irusta, l., fernández, m. j. y de miguel, y. r(2009). comparison of synthetic procedures for the preparation of sol-gel derived henoxo-silica hybrid materials. *j.of sol-gel sci.tech.*, vol. 49, num 1, 19-28.
- [7] Pavelić, k. y hadžija, m. (2003). "aplicaciones médicas de las zeolitas", en *handbook of zeolites science and technology*, eds sm auerbach, a. kathleen, ka carrado y pk dutta (nueva york, ny: crc press), 1143–1173.
- [8] Mohau moshoeshoe, m. s.-t. (2017). a review of the chemistry, structure, properties and applications of zeolite. *american journal of materials science*, 197.
- [9] Sandra kraljević pavelić, j. s. (2018). critical review on zeolite clinoptilolite safety and medical applicaitons in vivo. *frontiers in pharmacology*, 2.
- [10] Jasna hrenovic, j. m.-b. (2012). antibacterial activity of modified natural clinoptilolite against clinical isolates. *elsevier*, 148-152.
- [11] evangelos p. favvas, c. g. (2016). clinoptilolite, a natural zeolite mineral. structural characterization and performance evaluation on its dehydration properties of hydrocarbon-based fuels. *elsevier*, 385.
- [12] Selami demirci, z. u. (2014). antimicrobial properties of zeolite-x and zeolite-a ion-exchanged with silver, copper, and zinc against a broad range of microorganisms. *appl biochem biotechnol*, 1652-1662
- [13] Siti aishah mohd hanim, n. a. (2015). antibacterial activity of amine-functionalized zeolite nay against staphylococcus aureus atcc6538 and escherichia coli atcc11229. *trans tech publications*, 402-406
- [14] Salud, o. m. (2018). *resistencia a los antibióticos*. ginebra.
- [15] C. lee ventola, m. (2015). the antibiotic resistance crisis. *national center for biotechnology resistance*, 277.
- [16] (salud, la oms publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos, 2017). ginebra
- [17] Use of silver in the prevention and treatment of infections: silver review; surgical infections; caroline graham; (2013).
- [18] Sondi, i. y salopek-sondi, b. 2004. silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *e. coli* a model for gram-negative bacteria. *journal of colloid and interface science*, 275: 177-182.
- [19] Rai, m.k., yadav, a. y gade a. 2009. silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *biothecnology advance*, 27: 76-83.
- [20] Ruparelia, j.p., chartterjee, a.k., duttaguota, s.p. y murkherji, s. 2008. strain specificity in antimicrobial activity of silver and cooper nanoparticles. *acta biomaterialia*, 4:707-716.
- [21] Dallas, p., sharma, v.k y zboril, r. 2011. advances in colloid and interface science, 166:119-135.
- [22] Dugassa, j. y shukuri, n. (2017). revisión sobre la resistencia a los antibióticos y su mecanismo de desarrollo. *journal of health, medicine and nursing*, 1 (3), 1 – 17.
- [23] Samuel ponce de león-rosales, rené arredondo-hernández y yolanda lópez-vidal. 2015. la resistencia a los antibióticos: un grave problema global. *gaceta médica de méxico* 161:181-19.
- [24] Coombs, douglas & alberto, alberti & armbruster, thomas & artioli, gilberto & colella, carmine & galli, ermanno & grice, joel & liebau, friedrich & mandarino, joseph & minato, hideo & nikel, e.h. & passaglia, eliane & peacor, donald & quartieri, simona & rinaldi, romano & ross, malcolm & sheppard, r. & tillmanns, ekkehart & vezzalini, giovanni. (1998). recommended nomenclature for zeolite minerals: report of the subcommittee on zeolite of the international mineralogical association, commission on new minerals and mineral names. *mineralogical magazine*. 62. 533-571..
- [25] K. paveli · m. had ija · j. paveli · m. kati · m. kralj · m.h. bosnar · s. kapitanovi · m. poljak-bla i · r. stojkovi · m. jurin · b. suboti ru er bo kovi · (2000). natural zeolite clinoptilolite: new adjuvant in anticancer therapy. *journal of molecular medicine*.1-26.
- [26] Hrenović, jasna & milenkovic, jelena & goic-barišić, ivana & rajic, nevenka. (2013). antibacterial activity of modified natural clinoptilolite against clinical isolates of acinetobacter baumannii. *microporous and mesoporous materials*. 169. 148–152.
- [27] Monge, miguel. (2014). nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas. *researchgate*. 3
- [28] Roberto vazquez Muñoz, alejandro huerta saquero. (2014). nanomateriales con actividad microbicida: una alternativa al uso de antibióticos. *mundonano*. 42.
- [29] Roca, fernando paredes y juan José. (2004). acción de los antibióticos. perspectiva de la medicación antimicrobiana ámbito farmacéutico. *farmacología*. 118.
- [30] Vidal, jorge e. (2003). bacterias patógenas y el ser humano. la importancia de la virulencia bacteriana. *researchgate*. 9.
- [31] Solórzano, jorge washington pachay. (2018). las infecciones bacterianas y su resistencia a los antibióticos. caso de estudio: hospital oncológico “dr. julio villacreses colmont solca”, portoviejo. *universidad y sociedad*. 220.
- [32] Tor, richard j. fair and yitzhak. (2014). antibiotics and bacterial resistance in the 21st. century. *libertas academica*. 25.
- [33] Francesca prestinaci, patrizio pezzotti, annalisa pantosti. (2015). antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *national center for biotechnology information*. 310.

- [34] Alós, Juan-Ignacio. (2015). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. Elsevier. 693.
- [35] Pedro Bosch, Isaac Schifter. (1997). La zeolita una piedra que hierve. México, D.F.: Fondo de Cultura Económica.
- [36] Mohau Moshoeshe, Misael Silas Nadiye-Tabbiruka, Verónica Obuseng. (2017). A review of the chemistry, structure, properties and applications of zeolite. *American Journal of Materials Science*. 4-197.
- [37] Rumeysa Tekin, Nurcan Bac. (2016). Antimicrobial behavior of ion-exchanged zeolite X containing fragrance. Elsevier. 55-60
- [38] Nath N and Chilkoti A. 2004. Label free colorimetric biosensing using nanoparticles. *Journal of Fluorescence*. 14:377
- [39] Casals Corella, C. 1988. Las zeolitas: mineral del siglo XX, usos y aplicaciones. C. Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio. (CNPALAB). Org. Ministerio de Ciencias, Tecnología y Medio Ambiente. Ediciones Publicigraf. Holguín, Cuba.
- [40] Frederix F, Friedt J-M, Choi K-H, Laureyn W, Campitelli A, Mondelaers D, Maes G and Borghs G. 2003. Biosensing based on light absorption of nanoscaled gold and silver particles. *Analytical Chemistry*. 75:6894.
- [41] Chernousova S, Epple M. (2013) Silver as antibacterial agent: ion, nanoparticle, and metal. *Angew Chem Int Ed*; 52: 1636-53.
- [42] Elda María del Rocío Coutiño Rodríguez Rapp, Rebeca García Román, Luis Alfredo Herbert Doctor (2010) Plata coloidal y salud *Universalud*; 6 (12):56.
- [43] Thurman RB GC, Bitton G (1989) The molecular mechanism of copper and silver ion disinfection of bacteria and viruses. *Crit Rev Environ Control*; 18:295-315.
- [44] Marin-Llera J, O, Arroyo-Huelguera Y, Coutiño-Rodríguez EMR (2012) Efecto de la plata coloidal en la lipoperoxidación de 52 Coutiño R, Ávila Lagunes I, Arroyo Helguera O linfocitos humanos. *Universalud (antes Altepel Kli)*; 8(16):26-31.
- [45] Hoyme, U. B. 1993. Clinical significance of Crede's prophylaxis in Germany at present. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 1:32-36.
- [46] Feng, Q. L., Wu, J., Chen, G. Q., Cui, F. Z., Kim, T. N., and Kim, J. O. 2000. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Biomed Mater Res*. 52:662-668.
- [47] C. Wang, K. Chang, T. Chung, H. Wu, J. Chem. Eng. Data. 49, 527(2004).
- [48] Francolini I, Donelli G. Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2010; 59 (3): 227-238.
- [48] Vergidis P, Patel R. Novel approaches to the diagnosis, prevention, and treatment of medical device-associated infections. *Infect Dis Clin North Am*. 2012; 26 (1): 173-186