

Patricia Lalueza Valero

# Materiales inorgánicos nanoestructurados basados en plata: aplicaciones bactericidas

Departamento  
Ingeniería Química y Tecnologías del Medio  
Ambiente

Director/es  
Santamaría Ramiro, Jesús  
Arruebo Gordo, Manuel

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



**Universidad**  
Zaragoza

Tesis Doctoral

# MATERIALES INORGÁNICOS NANOESTRUCTURADOS BASADOS EN PLATA: APLICACIONES BACTERICIDAS

Autor

Patricia Lalueza Valero

Director/es

Santamaría Ramiro, Jesús  
Arruebo Gordo, Manuel

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente

2013





UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA



**Universidad Zaragoza**

ÁREA DE INGENIERÍA QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y TECNOLOGÍAS DEL  
MEDIO AMBIENTE

**“Materiales inorgánicos nanoestructurados basados en plata.  
Aplicaciones bactericidas”**

Memoria para optar al grado de Doctor por  
la Universidad de Zaragoza presentada por:

Dña. Patricia Lalueza Valero

27 Septiembre 2013



## Universidad Zaragoza

Los Doctores D. Jesús Santamaría Ramiro, y D. Manuel Arruebo Gordo, ambos del departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente de la Universidad de Zaragoza,

CERTIFICAN

Que la presente memoria titulada:

**“Materiales inorgánicos nanoestructurados basados en plata. Aplicaciones bactericidas”**

se ha realizado bajo su dirección, en los laboratorios del Instituto de Investigación en Nanociencia de Aragón, por Dña. Patricia Lalueza Valero, autorizando su presentación.

Y para que así conste, firmamos este certificado en Zaragoza a 27 de Septiembre de 2013.

Fdo. Prof. Dr. Jesús Santamaría

Fdo. Dr. Manuel Arruebo

## ABREVIATURAS

**NH<sub>4</sub>-ZSM5.** ZSM5 en forma amónica

**H-ZSM5.** ZSM5 calcinada en su forma protónica

**Ag-ZSM5.** ZSM5 intercambiada con iones de plata

**PAA.** Ácido peroxiacético

**H-ZSM5-PAA.** ZSM5 en su forma con ácido peroxiacético adsorbido

**Ag-ZSM5-PAA.** ZSM5 intercambiada con iones de plata y con ácido peroxiacético adsorbido

**AgNPs.** Nanopartículas de plata

**AgNPS-ZSM5.** ZSM5 con nanopartículas de plata

**AgNPS-ZSM5-PAA.** ZSM5 con nanopartículas de plata y con ácido peroxiacético adsorbido

**APTES.** (3-Aminopropilo) trietoxisilano

**SBA15-APTES.** SBA15 funcionalizada con (3-Aminopropilo) trietoxisilano

**SBA15-APTES-PAA.** SBA15 funcionalizada con (3-Aminopropilo) trietoxisilano y con ácido peroxiacético adsorbido

**SBA15-APTES-Ag-A.** SBA15 funcionalizada con (3-Aminopropilo) trietoxisilano con elevada concentración de nanopartículas de plata

**SBA15-APTES-Ag-B.** SBA15 funcionalizada con (3-Aminopropilo) trietoxisilano con baja concentración de nanopartículas de plata

**SBA15-APTES-Ag-A-PAA.** SBA15 funcionalizada con (3-Aminopropilo) trietoxisilano con elevada concentración de nanopartículas de plata y con ácido peroxiacético adsorbido

**SBA15-APTES-Ag-B-PAA.** SBA15 funcionalizada con (3-Aminopropilo) trietoxisilano con baja concentración de nanopartículas de plata y con ácido peroxiacético adsorbido

**MagNPs.** Nanopartículas magnéticas

**MCM41-MagNPs.** MCM41 con nanopartículas magnéticas

**MCM41-MagNPs- AgNPs.** MCM41 con nanopartículas magnéticas y con nanopartículas de plata

**MCM41-MagNPs-PAA.** MCM41 con nanopartículas magnéticas y con ácido peroxiacético adsorbido

**MCM41-MagNPs- AgNPs-PAA.** MCM41 con nanopartículas magnéticas, con nanopartículas de plata y con ácido peroxiacético adsorbido

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Generalidades. Problemas asociados al desarrollo de enfermedades bacterianas. Biocidas</b>	<b>2</b>
1.1.1 Infecciones bacterianas y microorganismos. Tipos y distribución mundial	2
1.1.2 Enfermedades nosocomiales. Cepas y patogenicidad ( <i>biofilm</i> y resistencias)	7
1.1.3 Bactericidas y Bacteriostáticos. Antibióticos	10
1.1.4 Otros bactericidas y bacteriostáticos	12
<b>1.2 Materiales</b>	<b>19</b>
1.2.1 Biomateriales	19
1.2.2 Nanociencia, Nanotecnología y Nanobiociencia	20
1.2.3 Silicio y sus características para la nanobiociencia	22
1.2.4. Nanomateriales de sílice porosa: Zeolitas y Mesoporosos	23
<b>1.3 La plata como bactericida</b>	<b>28</b>
1.3.1 Evolución histórica de la utilización de la plata	28
1.3.2 Mecanismo de acción de la plata	29
1.3.3 Resistencia bacteriana a la plata	32
1.3.4 Legislación y enfermedades asociadas con la exposición a plata	34
1.3.5 Ventajas de la plata respecto a otros materiales	37
1.3.6 Plata en materiales nanoestructurados	38
1.3.7 Sinergia de la plata con otros compuestos	40
<b>1.4 Aplicaciones actuales de la plata</b>	<b>40</b>
1.4.1 Aplicación de la liberación de plata iónica	41
1.4.2 Aplicación de la liberación de plata metálica (AgNPs)	45
1.4.3 Aplicación de la liberación de plata iónica vía oxidación acelerada mediante combinación con otros productos o acciones	48
<b>1.5 Resumen y objetivo</b>	<b>49</b>
<b>2. EXPERIMENTAL</b>	<b>51</b>
<b>2.1. Modelo de bacterias. Cepas</b>	<b>52</b>
<b>2.2 Cultivos bacterianos: Características. Preparación de medios y tampones</b>	<b>53</b>
2.2.1 Tampón fosfato salino (PBS)	53
2.2.2 Medios de cultivo	53
<b>2.3 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) y de la concentración mínima bactericida (MBC)</b>	<b>55</b>
<b>2.4 Estudios de formación de <i>biofilm</i></b>	<b>56</b>
<b>2.5 Estudios bactericidas</b>	<b>56</b>
<b>2.6 Estudios bactericidas utilizando campo eléctrico para acelerar la oxidación de la plata metálica</b>	<b>58</b>
<b>2.7 Estudios de detección de especies reactivas de oxígeno (ROS) por peroxidación lipídica. Malonil dialdehído (MDA)</b>	<b>59</b>
<b>2.8 Preparación de muestras biológicas para el microscopio electrónico de barrido (SEM)</b>	<b>61</b>

<b>2.9 Preparación de muestras biológicas para el microscopio óptico invertido de fluorescencia</b>	<b>62</b>
<b>2.10 Síntesis hidrotermal de los nanohilos de plata</b>	<b>63</b>
<b>3. PLATA IÓNICA</b>	<b>65</b>
<b>3.1 Zeolitas</b>	<b>66</b>
3.1.1 Zeolitas: ZSM5 intercambiada con plata	66
3.1.2 Pastillas de ZSM5	66
3.1.3 Zeolitas comerciales con plata	67
3.1.4 Caracterización de las zeolitas con plata	67
3.1.5 Ensayos biológicos	80
<b>3.2 Óxido de plata</b>	<b>85</b>
3.2.1 Procedencia del óxido de plata	85
3.2.2 Caracterización	85
3.2.3 Ensayos biológicos	87
<b>Resumen del poder bactericida de los materiales con plata iónica usados</b>	<b>88</b>
<b>4. PLATA METÁLICA</b>	<b>91</b>
<b>4.1 SBA15 fibrosa</b>	<b>92</b>
4.1.1 Síntesis	92
4.1.2 Funcionalización con APTES	92
4.1.3 Pastillas de SBA 15	93
4.1.4 Síntesis de nanopartículas de plata <i>in situ</i>	93
4.1.5 Caracterización	94
4.1.6 Ensayos bactericidas	97
<b>4.2 MCM-41</b>	<b>102</b>
4.2.1 Síntesis	102
4.2.2 Pastillas de MCM 41	102
4.2.3 Síntesis de nanopartículas de plata <i>in situ</i> sobre la MCM 41 con nanopartículas magnéticas	103
4.2.4 Caracterización	103
4.2.5 Ensayos biológicos	105
<b>4.3 ZSM5</b>	<b>107</b>
4.3.1 Síntesis: Obtención de Ag-ZSM5	107
4.3.2 Síntesis de AgNPs <i>in situ</i>	107
4.3.3 Caracterización	108
4.3.4 Ensayos biológicos	109
<b>4.4 Nanopartículas de plata comerciales</b>	<b>110</b>
4.4.1 Procedencia	110
4.4.2 Caracterización	110
4.4.3 Ensayos bactericidas	112
<b>4.5 Nanohilos de plata</b>	<b>113</b>
4.5.1 Síntesis hidrotermal de los nanohilos de plata	114
4.5.2 Caracterización	115
4.5.3 Ensayos bactericidas	119



<b>5. COMBINACIÓN DE LOS NANOHILOS DE PLATA CON CAMPO ELÉCTRICO</b>	<b>123</b>
5.1 Introducción a la combinación con campo eléctrico	124
<b>5.2 Condiciones experimentales para realizar la aplicación de campo eléctrico. Caracterización</b>	<b>124</b>
5.2.1 Espectroscopía de Absorción Atómica	125
<b>5.3 Ensayos bactericidas</b>	<b>127</b>
5.3.1 Elección del voltaje	127
5.3.2 Nanohilos dispersos	128
5.3.3 Nanohilos y plata evaporada en espumas de carbón vítreo	130
5.3.4 Estudio a 9 V 30 minutos y 24 horas de incubación a 37°C	133
<b>6. COMBINACIÓN CON PERÓXIDOS</b>	<b>135</b>
6.1 Adsorción con ácido peroxiacético	136
<b>6.2 Caracterización</b>	<b>137</b>
6.2.1 Microscopía electrónica de transmisión	138
6.2.2 Análisis termogravimétrico	140
6.2.3 Adsorción de nitrógeno	144
6.2.4 Difracción de rayos X	145
6.2.5 Espectroscopía de absorción atómica	147
<b>6.3 Ensayos bactericidas</b>	<b>152</b>
6.3.1. Compuestos individuales	152
6.3.2. Zeolitas	153
<b>6.4 MCM 41 sintetizada en el laboratorio y MCM 41-MagNPs</b>	<b>161</b>
6.4.1. MCM 41 sintetizada en el laboratorio. Conservación en el tiempo del PAA	161
6.4.2. Ensayos bactericidas de la MCM 41-MagNPs con y sin AgNPs; con y sin PAA	162
<b>6.5 SBA 15-APTES Con AgNPs a elevada y baja concentración con PAA</b>	<b>164</b>
<b>6.6 Efecto del ácido peroxiacético</b>	<b>165</b>
6.6.1 Medición de las especies reactivas de oxígeno	165
6.6.2 Observación del <i>biofilm</i> bacteriano	166
<b>6.7 Comparación de los materiales</b>	<b>167</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>169</b>
<b>8. ANEXO</b>	<b>172</b>
<b>8.1 Equipos utilizados para el tratamiento de las muestras biológicas</b>	<b>173</b>
8.1.1 Campana de Flujo Laminar	173
8.1.2 Esterilización	174
<b>8.2 Caracterización físico-química de los materiales liberadores de plata</b>	<b>174</b>
8.2.1 Difracción de rayos X y de dispersión de Rayos X de ángulo bajo	174
8.2.2 Espectrofotometría ultravioleta-visible-infrarrojo cercano	176
8.2.3 Microscopio electrónico de barrido	176
8.2.4 Microscopio electrónico de transmisión	178
8.2.5 Análisis termogravimétrico	179
8.2.6 Espectroscopía de absorción atómica	181
8.2.7 Espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X	182

8.2.8 Adsorción de nitrógeno	182
8.2.9 Espectrofotometría de infrarrojo con transformada de Fourier	182
<b>8.3 Mecanismo de acción de los antibióticos cefuroxima, cefazolina y linezolid</b>	<b>183</b>
<b>9. PUBLICACIONES</b>	<b>185</b>
<b>9.1. Artículos</b>	<b>185</b>
9.1.1 Artículos relacionados con este trabajo	185
9.1.2 Artículos anteriores a este trabajo	185
<b>9.2 Contribuciones a congresos</b>	<b>186</b>
<b>9.3 Patentes</b>	<b>186</b>
<b>10. REFERENCIAS</b>	<b>187</b>

## Capítulo 1

### Introducción

#### **1.1 GENERALIDADES. PROBLEMAS ASOCIADOS AL DESARROLLO DE ENFERMEDADES BACTERIANAS. BIOCIDAS**

- 1.1.1 Infecciones bacterianas y microorganismos. Tipos y distribución mundial
- 1.1.2 Enfermedades nosocomiales. Cepas y patogenicidad (*biofilm* y resistencias)
- 1.1.3 Bactericidas y Bacteriostáticos. Antibióticos
- 1.1.4 Otros bactericidas y bacteriostáticos

#### **1.2 MATERIALES**

- 1.2.1 Biomateriales
- 1.2.2 Nanociencia, Nanotecnología y Nanobiociencia
- 1.2.3 Silicio y sus características para la nanobiociencia
- 1.2.4. Nanomateriales de sílice porosa: Zeolitas y Mesoporosos

#### **1.3 LA PLATA COMO BACTERICIDA**

- 1.3.1 Evolución histórica de la utilización de la plata
- 1.3.2 Mecanismo de acción de la plata
- 1.3.3 Resistencia bacteriana a la plata
- 1.3.4 Legislación y enfermedades asociadas con la exposición a plata
- 1.3.5 Ventajas de la plata respecto a otros materiales
- 1.3.6 Plata en materiales nanoestructurados
- 1.3.7 Sinergia de la plata con otros compuestos

#### **1.4 APLICACIONES ACTUALES DE LA PLATA**

- 1.4.1 Aplicación de la liberación de plata iónica
- 1.4.2 Aplicación de la liberación de plata metálica (AgNPs)
- 1.4.3 Aplicación de la liberación de plata iónica vía oxidación acelerada mediante combinación con otros productos o acciones

#### **1.5 RESUMEN Y OBJETIVOS**

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 GENERALIDADES. PROBLEMAS ASOCIADOS AL DESARROLLO DE ENFERMEDADES BACTERIANAS. BIOCIDAS

#### 1.1.1 Infecciones bacterianas y microorganismos. Tipos y distribución mundial

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la salud es un estado de completo bienestar físico, mental y bienestar social, y no solamente la ausencia de afecciones o enfermedades. Una enfermedad es una condición anormal que afecta el cuerpo de un organismo. A menudo, es interpretada como una condición médica asociada con síntomas y signos específicos [1]. Esto puede ser causado por factores externos, como las enfermedades infecciosas, o puede ser causado por disfunciones internas. La OMS, con la clasificación internacional de enfermedades (de su acrónimo en inglés *ICD*, *International Classification Diseases*), clasifica las enfermedades en los siguientes grupos [2]:

- Enfermedades infecciosas y parasitarias.
- Neoplasias.
- Enfermedades de la sangre y órganos hematopoyéticos y ciertos trastornos que afectan al mecanismo de la inmunidad.
- Enfermedades endocrinas, nutricionales y metabólicas.
- Trastornos mentales y del comportamiento.
- Enfermedades del sistema nervioso.
- Enfermedades del ojo y sus anejos.
- Enfermedades del oído y procesos mastoideos.
- Enfermedades del sistema circulatorio.
- Enfermedades del sistema respiratorio.
- Enfermedades del sistema digestivo.
- Enfermedades de la piel y del tejido subcutáneo.
- Enfermedades del sistema osteomuscular y del tejido conjuntivo.
- Enfermedades del sistema genitourinario.
- Enfermedades del embarazo, parto y el puerperio.
- Ciertas afecciones originadas en el período perinatal.
- Malformaciones congénitas, deformidades y anomalías cromosómicas.
- Síntomas y signos clínicos y de laboratorio anormales no clasificados en otro grupo.
- Lesiones, envenenamientos y otras consecuencias de causas externas.

Las enfermedades infecciosas son aquellas que están causadas por microorganismos patógenos, como bacterias, virus, parásitos u hongos y que pueden propagarse, directa o indirectamente, de una persona a otra. Las enfermedades zoonóticas son enfermedades infecciosas de los animales que pueden causar enfermedades cuando se transmiten a los seres humanos [3]. Las enfermedades infecciosas también se clasifican, pero su disposición depende del especialista que lo realice. Los clínicos las

clasifican según las manifestaciones y síntomas clínicos más importantes, y el órgano que ha sido afectado tal y como se muestra en la Tabla 1.1:

**Tabla 1.1.** Clasificación de las infecciones según los especialistas clínicos [4]

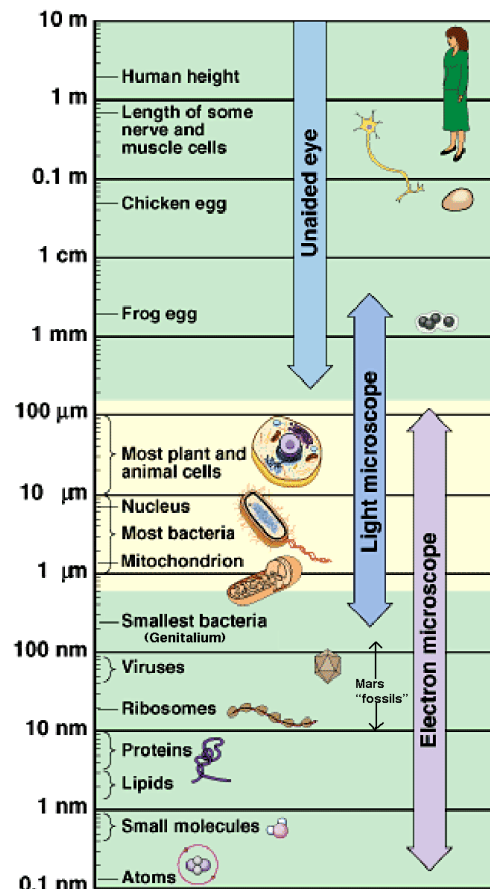
Clasificación	Infección
Infecciones diarreicas	Secretora
	Invasiva
Infecciones respiratorias	Tracto alto
	Tracto bajo
Infecciones del Sistema Nervioso Central	Meningitis (bactericida vs. aséptica)
	Encefalitis
	Abscesos
Infecciones del Sistema Cardiovascular	Vasculitis
	Endocarditis
	Miocarditis
Sepsis	Diseminada

Mientras que los microbiólogos las clasifican según las características del microorganismo que las producen, como aparece en la Tabla 1.2 [4].

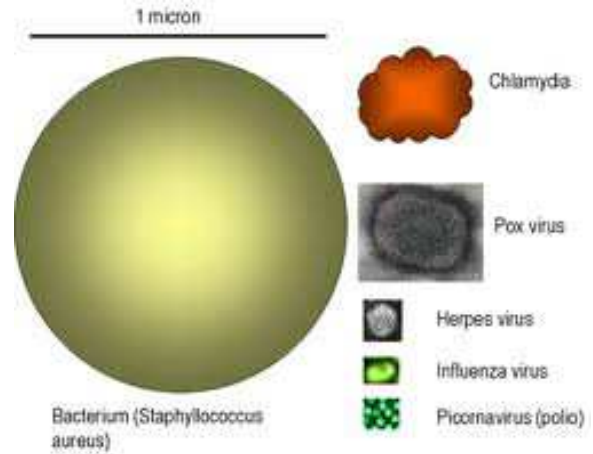
**Tabla 1.2.** Clasificación de las infecciones según los microbiólogos [4]

Clasificación	Organismos
Bacterias	Gram-positivo
	Gram-negativo
Virus	DNA
	RNA
	Con o sin envoltura
Hongos	Diseminadas
	Localizadas
Parásitos	Protozoos
	Helmintos
	Tremátodos
	Céstodos
Priones	Proteínas

Los microorganismos son los seres más primitivos y numerosos que existen en la Tierra, colonizan todos los ambientes: suelo, agua y aire, participan de forma vital en todos los ecosistemas y están en interacción continua con las plantas, los animales y el hombre [5]. Generalmente, se han definido como aquellos organismos que no se pueden ver a simple vista. Tal y como se muestra en la Figura 1.1.A y 1.1.B, los microorganismos van desde los 50 nm de los virus más pequeños, hasta las 100 micras de las células eucariotas.



**Figura 1.1.A.** Escala con representación de átomos, moléculas, biomoléculas y organismos. (Copyright® Pearson Education, Inc. Publishing as Benjamín Cummings) [6]



**Figura 1.1.B.** Comparación del tamaño de diferentes bacterias y virus (Microbiology and Immunology. University of South Carolina School of Medicine) [7]

Dentro del grupo de los microorganismos se pueden hacer varias divisiones, como por ejemplo, la clasificación taxonómica, similar a la de la Tabla 1.2:

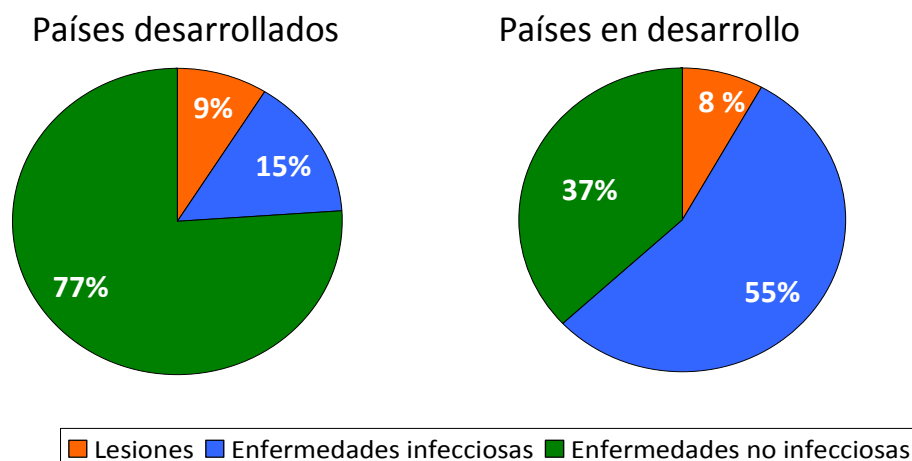
- organismos procariontas (bacterias)
- organismos eucariotas (hongos y protistas)
- virus
- priones

Se tiende a asociar la palabra microorganismo y microbio con enfermedades, pero se tiene que tener en cuenta que no todos causan daños, por eso otra clasificación importante sería:

- microorganismos no patógenos
- microorganismos patógenos.

Los microbios no patógenos no producen ningún perjuicio en el individuo que habitan, incluso en algunos casos se producen beneficios, dando lugar a una asociación denominada simbiosis. Muchos microorganismos tienen la capacidad de sintetizar una gran variedad de compuestos bioactivos que pueden ser utilizados como defensas por los hospedadores [8], o metabolizar sustancias que los metazoos o metafitas no pueden. En plantas, por ejemplo, la interacción entre las raíces de las leguminosas y las bacterias gram-negativas del suelo del género *Rhizobium*, dan lugar a unos órganos diferenciados llamados nódulos, donde las bacterias habitan beneficiándose de los nutrientes generados por las leguminosas, mientras que la planta, que no tiene enzimas para fijar el nitrógeno atmosférico, utiliza este nitrógeno fijado por la bacteria [9]. También en el caso de los vertebrados, sus tractos digestivos contienen una amplia variedad de microorganismos. Por ejemplo, la bacteria *Bacteroidetes thetaiotamicron* induce la vascularización del intestino grueso, mientras que ella se beneficia de los restos alimenticios que por allí circulan [8]. De hecho, el número de microorganismos en el tracto gastrointestinal humano es de aproximadamente  $10^{14}$  individuos, realizando funciones tan importantes como la síntesis de vitamina K o aportan resistencia a otros microorganismos patógenos [10]. Asimismo, en la piel también encontramos microbios formando parte de la flora normal como estafilococos coagulasa-negativos, varias especies bacterianas Gram-negativas, y *Candida albicans*, etc. [11]. Sin embargo, los microorganismos más estudiados son los denominados patógenos, ya que son los que afectan a la salud, y son capaces de producir una colonización, infección y producir una situación de enfermedad.

Las enfermedades infecciosas son la mayor causa de muerte en el mundo de los niños y adultos jóvenes [12]. Representan más de 13 millones de muertes al año, son causantes de una de cada dos muertes en los países en vías de desarrollo. Cada hora mueren 1500 personas por enfermedad infecciosa más de la mitad niños menores de cinco años y el resto adultos en edad laboral. La mayoría de las muertes por enfermedades infecciosas se producen en los países en vías de desarrollo [13], tal y como se muestra en la Figura 1.2.



**Figura 1.2.** Porcentaje de fallecimiento por tipo de enfermedades y tipo de países. (Fuente: OMS)



Comúnmente se utilizan tres términos para clasificar los impactos de las enfermedades infecciosas epidémicas:

- Endémica. Está presente en todo momento en un lugar determinado pero con una baja frecuencia.
- Epidemia. Es un brote repentino e intenso de una enfermedad en un lugar determinado.
- Pandemia. Es una epidemia que se extiende y afecta a toda una región, continente o mundo. Los temores de una pandemia han aumentado en los últimos años debido a la globalización de la economía, y al aumento del número de viajes internacionales y su alcance [4].

Para estudiar la prevalencia y afección de las enfermedades infecciosas normalmente se utilizan tres términos estadísticos:

- Morbilidad. Tasa de enfermos. Es la proporción de enfermos durante un periodo determinado de tiempo según el número de habitantes del país en el mismo período de tiempo. Se expresa con la siguiente relación:

$$\text{Morbilidad} = (\text{número de personas enfermas/población}) \times 10.000$$

- Mortalidad. Tasa de mortalidad. Es el número de fallecidos por una determinada enfermedad según el número de habitantes.

$$\text{Mortalidad} = (\text{número de personas fallecidas/población}) \times 100.000$$

- Letalidad. Tasa de letalidad. Se utiliza para estimar la gravedad de la infección y la eficacia del tratamiento. Es el porcentaje de fallecidos debida a una determinada enfermedad infecciosa [14].

$$\text{Letalidad} = (\text{número de personas fallecidas/número de personas enfermas}) \times 100$$

Las once principales enfermedades infecciosas que más muertes han producido según la OMS a nivel mundial, se muestran en la siguiente Tabla 1.3:

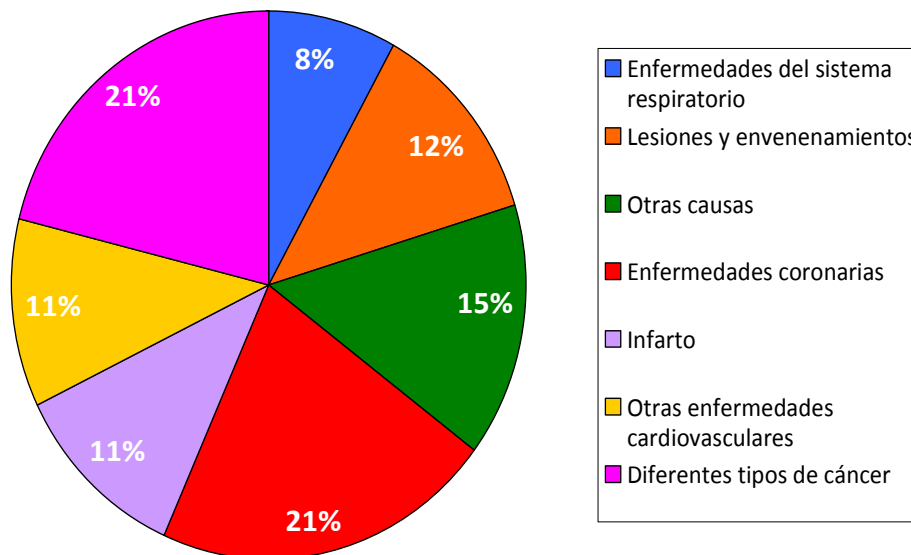
**Tabla 1.3.** Enfermedades infecciosas que producen más fallecimientos (Fuente: OMS)

Causa de muerte	Muertes aproximadas en el año 2002	Porcentaje respecto a las muertes que representa.
Infecciones respiratorias tracto bajo	3.900.000	6.9%
SIDA	2.800.000	4.9%
Enfermedades diarreicas	1.800.000	3.2%
Tuberculosis	1.600.000	2.7%
Malaria	1.300.000	2.2%
Sarampión	600.000	1.1%
Tos ferina	290.000	0.5%
Tétanos	210.000	0.4%

Continuación página siguiente

Causa de muerte	Muertes aproximadas en el año 2002	Porcentaje respecto a las muertes que representa.
Meningitis	170.000	0.3%
Sífilis	160.000	0.3%
Hepatitis B	100.000	0.2%

Sin embargo, en los países desarrollados, concretamente en Europa las tasas de infección han disminuido o se han mantenido estables a lo largo de los últimos 15 años, y debido a esto la mayoría de las muertes en los países de la Unión Europea son causadas por enfermedades no infecciosas como el cáncer (21%) y enfermedades cardiovasculares (43%) [15], tal y como se muestra en la Figura 1.3. Esto se debe principalmente a la inversión en salud y al acceso a antibióticos.



**Figura 1.3.** Principales causas de muerte en Europa 2011. (Fuente: OMS)

Pero, por otro lado no se puede subestimar la presencia de enfermedades infecciosas. Cada año, las enfermedades infecciosas causan decenas de miles de muertos en los países de la Unión Europea, así como millones de días de pérdida de trabajo. Por otro lado los microorganismos tienen gran versatilidad para adaptarse y cambiar, por lo que pueden emerger nuevas enfermedades, como ya se comprobó con el SIDA en la década de los ochenta, la variante de la enfermedad Creutzfeldt-Jakob en los noventa y el SARS en el 2003 [15].

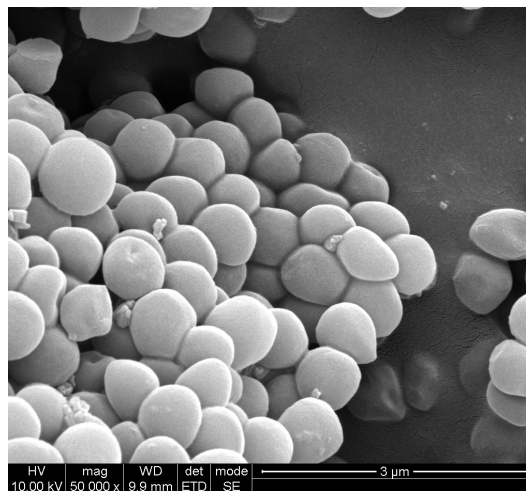
### 1.1.2 Enfermedades nosocomiales. Cepas y patogenicidad (*biofilm* y resistencias)

El principal peligro infeccioso en Europa, se produce a partir de los microorganismos que se han vuelto resistentes a los antibióticos y que crecen rápidamente en los hospitales [15], dando lugar a las enfermedades nosocomiales, que según la OMS son aquellas infecciones contraídas por los pacientes ingresados en un recinto hospitalario

y que estos, no habían manifestado, ni estaban en periodo de incubación antes del ingreso [16]. Las infecciones nosocomiales contribuyen de manera significativa a la morbilidad y mortalidad, y producen un aumento del gasto hospitalario [17, 18]. Desde la década de los setenta se producen 80.000 muertes al año y es la onceava causa de muerte en los hospitales de Estados Unidos [19, 20].

Un gran número de microorganismos patógenos pueden causar infecciones nosocomiales. Estos patógenos varían en diferentes poblaciones de pacientes, diversos centros de atención de salud, distintas instalaciones y diferentes países. Hoy en día, casi todas las infecciones nosocomiales son causadas por microorganismos comunes en la población general. La población general es inmune o padece una enfermedad menos grave que la causada a los pacientes hospitalizados (generalmente bacterias del género *Staphylococcus*, *Estafilococos* coagulasa negativos, *Enterococos* y *Enterobacteriaceae*). [21]. En la mayoría de los estudios los microorganismos nosocomiales más representativos son *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* [22, 23].

Dentro de la especies nosocomiales una de las más destacadas es la bacteria *Staphylococcus aureus*. Una bacteria, es un organismo unicelular procariota, es decir, que su material genético está disperso en el citoplasma. Este organismo es Gram-positivo, es decir, con pared celular gruesa, y tiene forma de coco. Es un patógeno oportunista ubicuo que comúnmente coloniza la nasofaringe anterior de los seres humanos [24], formando parte de la flora natural.



**Figura 1.4.** Fotografía de *S.aureus* en microscopio electrónico de barrido

Dentro de esta especie bacteriana se encuentran gran variedad de cepas. Una cepa, es un subtipo de una especie bacteriana que difiere de otras bacterias de la misma especie por alguna diferencia menor pero identificable. Las cepas descienden de un solo organismo o cultivo puro aislado [25]. Las cepas más relevantes de la forma médica en *S.aureus* son aquellas que tienen que ver con la resistencia a antibióticos y con la formación de *biofilm*:

- Cuando se introdujeron las penicilinas en 1940, todas las cepas de *S.aureus* fueron sensibles. En 1944 aparecieron los primeros informes de resistencia a estos

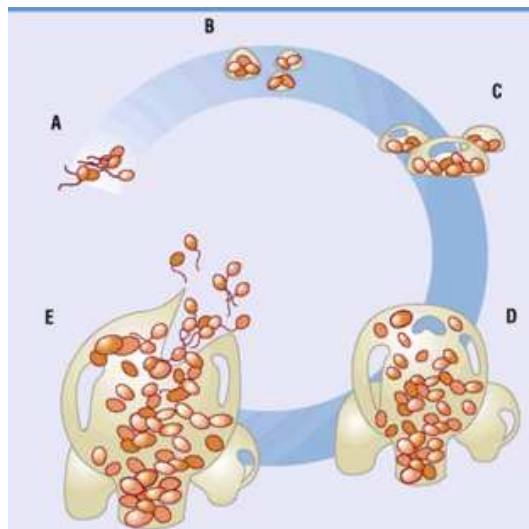
antibióticos, hasta hoy en día, que casi todas las cepas de esta bacteria son resistentes a las penicilinas naturales y aminopenicilinas [26, 27]. La resistencia a estos fármacos se produce por la adquisición de genes que codifican enzimas ( $\beta$ -lactamasas) que inactivan estos fármacos. Al principio los resistentes aparecieron a nivel hospitalario extendiéndose después al resto de la comunidad [26]. Se sintetizó la meticilina y otras penicilinas para tratar infecciones causadas por *S.aureus* resistentes a la penicilina, sin embargo, comenzaron a aparecer las primeras cepas de *S.aureus* resistentes a la meticilinas (MRSA *methicillin-resistant S.aureus*), siendo la primera en 1968 en Estados Unidos [28] y a propagarse llegando a ser uno de los principales patógenos nosocomiales [29]. Hoy en día, en Estados Unidos, se producen aproximadamente 94.000 infecciones cada año por MRSA y se asocia con aproximadamente 19.000 muertes [30].

- Hay otras cepas que además tienen la capacidad de formar *biofilm*, que esencialmente es una capa de exopolisacárido que segrega la bacteria y que se convierte en una barrera para el sistema inmunitario y para los antibióticos [31]. El crecimiento en *biofilms* representa la forma habitual de crecimiento de las bacterias en la naturaleza (superficie de piedras en ríos y pantanos) [32]. La formación de *biofilm* ya aparece en el registro fósil (aproximadamente 3,25 mil millones de años), siendo común en muchos organismos *Archeae* y *Bacteria*, por lo tanto, es una característica antigua e integral en el ciclo de la vida de los procariontes. Este *biofilm* protege a las células en su crecimiento y permite que estas sobrevivan en ambientes hostiles, así como dispersarse y colonizar nuevos nichos ecológicos [33]. Debido a esto muchas bacterias patógenas utilizan esta característica de formación de *biofilm*, a menudo en prótesis, colonizando y dañando el tejido de alrededor [34, 35], los fármacos no pueden actuar ya que la difusión de estos a través del *biofilm* es muy baja. La combinación de estos dos fenómenos, formación de *biofilm* y resistencia a la meticilina, dan lugar a graves problemas de salud, principalmente en las intervenciones quirúrgicas de ortopedia.

Según la FDA (*USA Food and Drug Administration*), un implante es un dispositivo que se coloca en una cavidad formada de manera natural o quirúrgicamente del cuerpo humano y está destinado a permanecer allí durante un tiempo indefinido, con el fin de proteger la salud reemplazando una estructura biológica que falta, suplantando a una estructura biológica dañada, o mejorando una estructura biológica existente, mientras que una prótesis es una extensión artificial que reemplaza una parte del cuerpo que falta por diversas razones [36]. Así pues, la colonización y formación de *biofilm* de los implantes y prótesis causan graves infecciones en huesos, articulaciones y tejido circundante denominada osteomielitis, difícil de erradicar. En muchos casos, se requiere la retirada del implante, con el consiguiente riesgo para la salud del individuo y el aumento en el gasto económico [37]. De hecho, se estima que del 1% al 2% de los implantes en rodilla y cadera se infectan [38]. En general, los tratamientos con fármacos fracasan debido a que la erradicación de la infección es incompleta y por lo tanto, la infección se cronifica [37]. La formación del *biofilm*, en las superficies de implantes, es la principal causa de este fracaso porque las bacterias inmersas en el *biofilm* tienen muy baja sensibilidad a los antibióticos administrados [39]. Por otro lado, algunas de las bacterias bentónicas se desprenden del *biofilm* y sirven como un nuevo nido de infección. Así, los *biofilms* se pueden formar de nuevo, de una manera

rápida en la superficie de los implantes y son difíciles de erradicar por completo [40]. La formación de *biofilm* se realiza siguiendo los cinco pasos a que a continuación se describen, tal y como se muestra en la Figura 1.5:

- Las bacterias se unen reversiblemente a un soporte sólido.
- La unión de las bacterias al soporte se vuelve irreversible, y se agregan para formar la matriz.
- Fase de maduración: las células se van combinando en capas y comienza el *quorum sensing*. El *quorum sensing* es la comunicación entre las bacterias de una población produciendo moléculas, denominadas autoinductores, que funcionan como moléculas de señalización química. La concentración de estas señales aumentan en función del número de células en una colonia. Con la utilización de esta señalización química, las bacterias se adaptan a la situación y las condiciones de crecimiento, y al igual que un organismo multicelular sincronizan su comportamiento. Y así, las bacterias empiezan a formar el *biofilm* produciendo la matriz polimérica extracelular [41].
- Las agrupaciones llegan a un espesor máximo.
- Se produce la fuga de las bacterias para dispersar el *biofilm* [42].



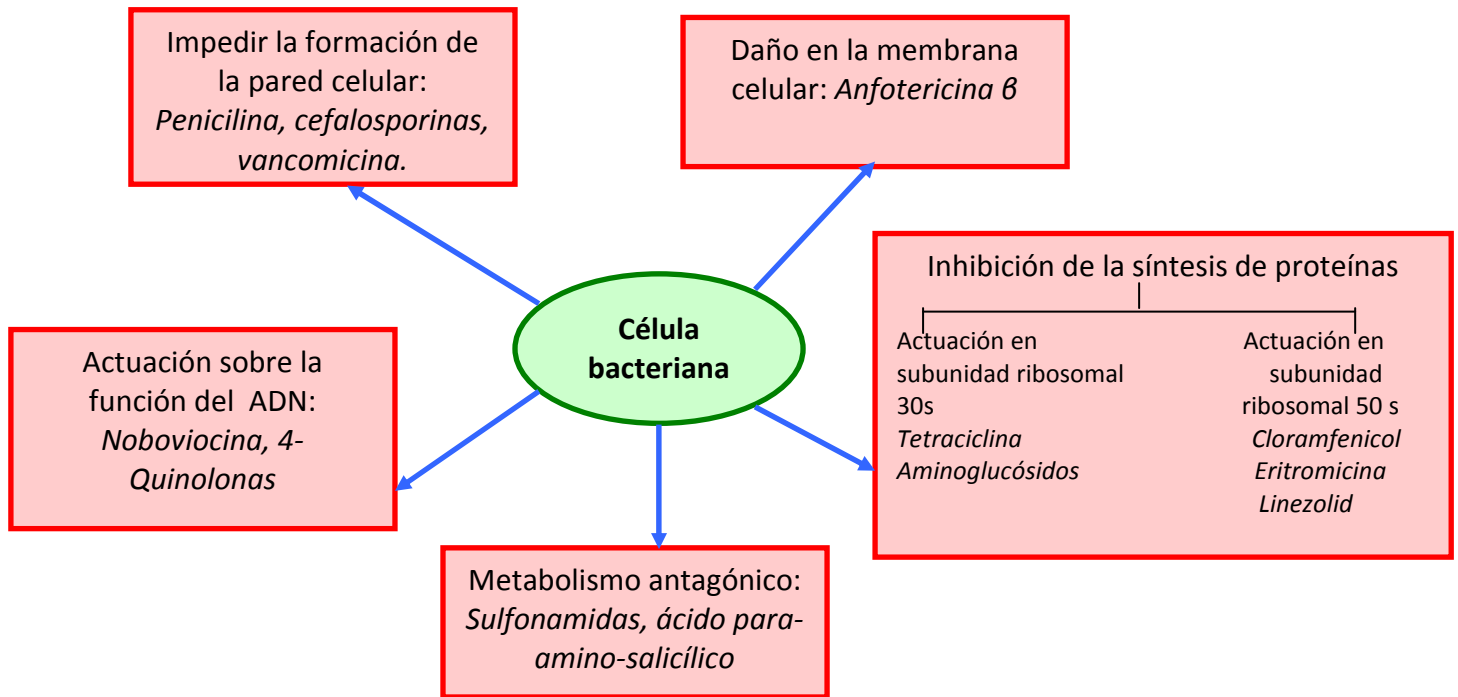
**Figura 1.5.** Cinco pasos en la formación del *biofilm* [42]

### 1.1.3 Bactericidas y Bacteriostáticos. Antibióticos

Para la eliminación de las infecciones bacterianas se han utilizado dos estrategias clásicas o la combinación de ambas. Se han administrado agentes bacteriostáticos que es aquel que no ocasiona la muerte a una bacteria, pero si impide su reproducción, es decir, la bacteria no se divide ya que este agente puede interferir en la producción de proteínas, en la replicación del DNA o en otros aspectos del metabolismo bacteriano. Los agentes bactericidas, si que provocan la muerte de la bacteria [43]. Sin embargo, estas categorías no son absolutas, ya que el efecto letal de una molécula varía según el método y la especie ensayada. Puede ser que algunos agentes sean bactericidas contra un grupo de organismos y bacteriostático contra otro. El antibiótico vancomicina, por

ejemplo, es bactericida contra *S.aureus* y los Neumococos, pero bacteriostático frente a los Enterococos [44].

Dentro de estos dos grupos de compuestos, están los antibióticos, muy utilizados en medicina humana. Un antibiótico es una sustancia química producida por un ser vivo o sintética que mata o impide el crecimiento de ciertas clases de microorganismos sensibles, generalmente bacterias. Los antibióticos según su mecanismo de acción se pueden clasificar como se muestra en la Figura 1.6.



**Figura 1.6.** Mecanismo de acción de los antibióticos [45]

Por otro lado, como se ha comentado anteriormente la formación de *biofilm* es una característica bacteriana [33], por lo que se puede formar en superficies donde se manipulen sustancias que se han de utilizar posteriormente para el consumo humano. Las superficies de materiales de acero inoxidable, vidrio, caucho y polipropileno por ejemplo, pueden ser colonizadas y contaminadas por bacterias patógenas. Bajo ciertas condiciones, se adhieren iniciando el crecimiento celular que conduce a la formación de *biofilm* [46]. El principal problema, es que muchas bacterias, algunas patógenas, son capaces de adherirse a las superficies de, por ejemplo, la cocina donde se manipulan alimentos, como tablas de corte y encimeras, formando *biofilm*. De esta manera se pone en peligro la seguridad alimentaria. Estas bacterias son difíciles de eliminar por limpieza normal y tienen mayor tolerancia a los antibióticos [40, 43]. De hecho, la manipulación inadecuada de alimentos en las cocinas de los hogares, y las prácticas antihigiénicas son un factor importante en los casos esporádicos de enfermedades transmitidas por alimentos. Se estima que hasta un 87% de los brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos que se han producido en el Reino Unido, Europa, Australia, Nueva Zelanda, Estados Unidos y Canadá se originó en los alimentos preparados o consumidos en el hogar [47]. Para impedir su formación o producir su

eliminación se utilizan otros tipos de agentes químicos diferentes a los antibióticos. Los antibióticos son selectivos a bacterias, ya que actúan sobre estructuras o moléculas propias y exclusivas de estos organismos [45] tal y como se ha mostrado en la Figura 1.6, pero no actúan sobre células eucariotas a diferencia de otros agentes químicos que eliminan tanto eucariotas como procariotas, ya que su mecanismo de acción lo realizan sobre estructuras comunes a todas las células. Dentro de este grupo encontramos, por ejemplo, los detergentes que producen la disrupción de la membrana plasmática [48] presente en todas las células.

#### 1.1.4 Otros bactericidas y bacteriostáticos

Para la eliminación de *biofilms* o bacterias planctónicas en superficies, recipientes, maquinaria, sistemas de distribución de aguas, alimentos o disoluciones, no se usan antibióticos, sino que se usan otros productos.

Para ello se han de distinguir dos conceptos. Por un lado la esterilización, que es la destrucción de todas las formas de vida microbianas, mediante cualquier método físico (presión de vapor, calor seco) o químico (óxido de etileno gas, plasma, productos químicos líquidos) [49]. Los procesos de esterilización se dan principalmente en el mundo sanitario y en la industria alimentaria. Por otro lado, está la desinfección, que es el proceso por el que se eliminan muchos o todos los microorganismos patógenos (a excepción de las esporas) de los seres y objetos. La eficacia de la desinfección, está determinada por un gran número de factores como son, la limpieza anterior del objeto, su carga orgánica, el nivel de contaminación microbiana, el tiempo de exposición al desinfectante y la temperatura o pH del proceso de desinfección. De la misma manera que en la esterilización, se utilizan procesos físicos (pasteurización) o químicos [49]. Los procesos de desinfección se producen más a menudo que los de esterilización, ya que a menudo, se desinfectan superficies y utensilios de baños y cocinas de hogares, hostelería, comercio...

Existen un gran número de agentes químicos esterilizantes y desinfectantes. Los más destacados serían:

- **CLORO (Cl<sub>2</sub>)**

Se considera un desinfectante de alto nivel [49], para la potabilización del agua de boca y de piscinas públicas. Es de tres a seis veces más potente contra *E.coli* que los compuestos formados por otros halógenos [50].

El cloro actúa rompiendo los enlaces químicos de las biomoléculas presentes en las bacterias y virus. De esta manera, el cloro se intercambia con el hidrógeno de las enzimas y proteínas, y así, la biomolécula pierde su función y estructura y por tanto el microorganismo muere.

Su principal problema es que el cloro gas es casi imposible de almacenar y además de ser tóxico en su estado gaseoso, reacciona con la materia orgánica dando lugar a subproductos halogenados de desinfección (*DBPs*, *halogenated disinfection byproducts*) que son también tóxicos para los humanos [51]. Los trihalometanos (*Trihalomethanes (THMs)*) y los ácidos haloacéticos (*haloacetic acids (HAAs)*) son los



compuestos que más DBPs producen y su uso ha sido limitado por la EPA (*USA Environmental Protection Agency*) desde el 2006 [52]. Además, el efecto del cloro es inmediato, no hay efecto residual utilizable a largo plazo.

En respuesta a estas normas, se han buscado e investigado otros desinfectantes clorados alternativos como son las cloramina y el dióxido de cloro, ya que su uso da lugar a una menor concentración de DBPs [51].

#### ▪ HIPOCLORITO SÓDICO (NaClO)

El cloro reacciona con el hidróxido de sodio para dar lugar al hipoclorito de sodio (NaClO), comúnmente conocido como lejía y que es muy buen desinfectante. Tiene un amplio espectro de actividad antimicrobiana y es de acción rápida y barata. Tiene el mismo inconveniente que el cloro al tener baja estabilidad [49].

Cuando se disuelve en agua se forma  $\text{Na}^+$  y  $\text{ClO}^-$ , este último es un fuerte oxidante y reacciona con los grupos SH y  $\text{NH}_2$ , modificando enzimas y proteínas bacterianas, además de producir peroxidación lipídica [53]. Es utilizado como desinfectante en plantas potabilizadoras, torres de refrigeración y piscinas. También se ha empleado para blanquear papel o fibras textiles. En los hospitales se utiliza poco debido a su corrosividad [49]. De hecho, a pH bajos es extremadamente corrosivo, por eso las limpiezas y desinfecciones, para evitar el daño en las superficies, se realizan a pH elevados, en intervalos de 10-11 [54]. Las lejías comerciales para uso doméstico tienen una concentración de hipoclorito sódico igual o inferior al 5% en peso.

#### ▪ CLORAMINAS

Las cloraminas son derivados del amoníaco en los que se sustituyen uno, dos o los tres átomos de hidrógenos, por cloro [55].

Estos compuestos como el hipoclorito sódico son muy oxidantes debido a su elevado potencial de óxido-reducción [56].

Son desinfectantes secundarios que se usan para mantener un efecto residual del cloro a lo largo de todo el sistema de distribución (piscinas, torres de refrigeración...) [57], ya que retienen el cloro por más tiempo y por tanto tienen un efecto bactericida más prolongado [49].

Las cloraminas sólo forman trazas de *HAA*s y *THM*s [51], por lo que sería un desinfectante más eficaz que el cloro. Sin embargo, se forman otros productos tóxicos halogenados en dosis significativas, pero siempre en menor concentración que con el cloro [58].

#### ▪ DIÓXIDO DE CLORO ( $\text{ClO}_2$ )

Este compuesto, como indica la fórmula, es un óxido de cloro, también usado en la desinfección de instalaciones que tienen que ver con el agua.

Su modo de acción también es por su alto poder oxidante. De hecho, este poder es mayor que el del cloro, ya que a diferencia de este, no reacciona con las moléculas de agua, de esta manera se facilita el contacto con los microorganismos [59].

Tiene la ventaja de que se necesitan dosis más bajas y menor tiempo de reacción para producir el mismo efecto de desinfección que el cloro.

- **OZONO (O<sub>3</sub>)**

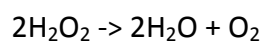
El ozono es un potente oxidante y desinfectante que se descompone rápidamente en el agua [51]. Este potencial hace que actúe oxidando enzimas, proteínas y lípidos produciendo una desestabilización de la estructura bacteriana.

La principal desventaja, es que debido a su inestabilidad, este compuesto no produce un efecto residual y persistente en los sistemas de distribución donde se aplica [60]. Por lo tanto el tratamiento que se realiza en sistemas relacionados con el agua, ha de estar combinado con cloro o cloraminas. Sin embargo, se ha observado que una ozonización previa al tratamiento con compuestos clorados produce una disminución de la *THMs* y *HAAs* en las aguas naturales [61-65].

- **PERÓXIDO DE HIDRÓGENO (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

El peróxido de hidrógeno está formado por una molécula de agua con un átomo de oxígeno adicional gracias a un enlace peroxídico. Esta reacción ocurre de forma natural y en los seres vivos. En las plantas, está implicado en muchas reacciones de señalización celular, crecimiento y desarrollo y respuesta defensiva [66]. En los humanos, los monocitos y otros macrófagos son capaces de producir esta molécula [67], por lo tanto, su producción esta relacionada con acciones defensivas. Desde 1923, se sabe que algunas bacterias son capaces de producir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [68] como parte de su metabolismo.

Sin embargo, al ser un peróxido, es un agente oxidante potente que destruye las biomoléculas. Para resolver este problema, los humanos tenemos la enzima catalasa que descompone esta molécula e impide el daño celular por medio de la siguiente reacción:



Por otro lado, hay bacterias que también poseen esta enzima como *E.coli* [69] y se denominan catalasa positiva, mientras que, por ejemplo, en el metabolismo de muchas cepas de *S.aureus* no existe esta enzima, por lo tanto se denominan catalasa negativa [70].

Este compuesto es utilizado en concentraciones de entre 6 % en peso y 25 % en peso para desinfectar [71] ya que es cuando tiene mejor acción antimicrobiana. Así, el peróxido de hidrógeno se ha convertido en uno de los compuestos químicos más utilizados en los procesos de desinfección en la industria alimentaria [72] y a nivel hospitalario. También se aprovecha su acción como desinfectante tópico y bucal. Además es barato y fácil de producir.

Sin embargo ha de aplicarse a altas concentraciones y por si solo no puede eliminar bacterias, sino que necesita de la acción de otro agente químico (por ejemplo ácido peracético) para producir una respuesta sinérgica [71].

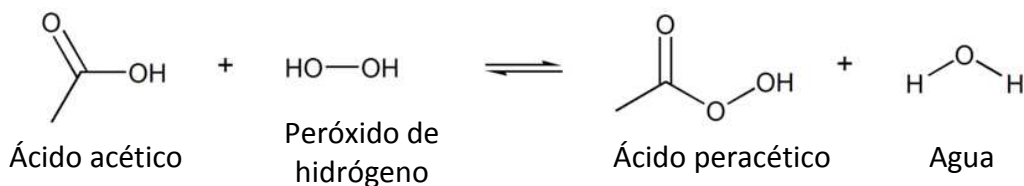
▪ **ÁCIDO PERACÉTICO O PEROXIACÉTICO (PAA)**

El ácido peracético (PAA) es un líquido incoloro y un de los agentes más oxidantes (por lo tanto actuara oxidando las biomoléculas) tal y como se muestra en la Tabla 1.4:

**Tabla 1.4.** Capacidad de oxidación de diferentes compuestos. (Fuente: OMRI, Organic Materials Review Institute[73])

Compuesto	Potencial de oxidación. ElectronVoltio (eV)
O <sub>3</sub>	2,07
PAA	1,81
ClO <sub>2</sub>	1,57
NaClO	1,36

Es utilizado como desinfectante en el tratamiento de aguas residuales, intercambiadores iónicos, torres de refrigeración, procesamiento de alimentos, equipos médicos y en la esterilización en frío de productos farmacéuticos [74, 75]. Es un agente antimicrobiano más potente, incluso a bajas concentraciones, que el peróxido de hidrógeno, siendo más rápido y eficaz con un gran espectro de microorganismos. Además, hasta en temperaturas bajas, es también esporicida [76]. Se vende en disolución con ácido acético y peróxido de hidrógeno para así mantener el equilibrio y estabilidad de los compuestos químicos:



Este compuesto tiene varias características ventajosas. El tratamiento de PAA se hace fácilmente (sin necesidad de una alta inversión de capital), tiene un amplio espectro de actividad incluso con presencia de materia orgánica, no genera subproductos tóxicos, la dependencia de pH es baja y el tiempo de contacto con el microorganismo es corto[74].

Sus principales desventajas, además de que es corrosivo y reactivo, es que en el efluente se produce un aumento de la concentración de ácido acético que puede favorecer el crecimiento de algún otro microorganismo. La fabricación es cara debido a que la producción mundial es limitada. Si aumentara la demanda, aumentaría la producción y disminuirían los precios, y así, podría competir con el cloro [74]. En la Tabla 1.5, se resumen las ventajas y desventajas:

**Tabla 1.5.** Ventajas y desventajas del PAA

Ventajas	Desventajas
No se inactiva en presencia de materia orgánica	Permite esterilizar únicamente material sumergible
Opera a baja Temperatura	Imposibilidad de mantener la condición de estéril en el tiempo

Continuación página siguiente

Ventajas	Desventajas
Opera rápidamente: 30 minutos	No se puede empaquetar el material
Opción válida para utilización inmediata y procesado in situ: Endoscopios, instrumental dental	Corrosivo
No tóxico para medio ambiente	Caro
No deja residuos	

La EPA ha publicado unas directrices de exposición aguda (AEGL, *Acute Exposure Guidelines*) para el ácido peracético. Las AEGLs representan los límites de exposición para el público en general en unos tiempos determinados. Se distinguen tres niveles, AEGL-1, AEGL-2 y AEGL-3, que se distinguen según la severidad de los efectos tóxicos:

- AEGL-1. Concentración en aire de una sustancia por encima de la cual se experimenta alguna molestia pero de efectos suaves, transitorios y reversibles.
- AEGL-2. Concentración en aire de una sustancia por encima de la cual pueden experimentarse molestias graves e irreversibles, con efectos a largo plazo y perjudiciales para la salud.
- AEGL-3. Concentración en aire de una sustancia por encima de la cual pueden producirse efectos muy graves para la salud, incluyendo la muerte.

**Tabla 1.6.** Límites AEGL para el PAA en 8 horas. (Fuente: EPA [77])

Clasificación / Tiempo de exposición	8 horas
AEGL-1	0,52 mg/m <sup>3</sup> (0,17 ppm)
AEGL-2	1,6 mg/m <sup>3</sup> (0,5ppm)
AEGL-3	4,1 mg/m <sup>3</sup>

Por otro lado, la letalidad crónica del PAA se ha demostrado en ratones, que presentaban un limitado aumento en carcinogénesis cuando se les suministraban altas concentraciones de PAA en el agua [78], pero su nivel de genotoxicidad es mucho más bajo que el de otros compuestos [79]. Los efectos no letales son limitados, principalmente se resalta su capacidad irritante en membranas y mucosas en concentraciones bajas [80].

Dentro la legislación española se encuentra el **RD 1620/2007** por el **“Se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas”**, y el **RD 414/1996** por el que **“Se regula los productos sanitarios”** en los que se especifica la normativa de aguas residuales y productos de desinfección en el mundo sanitario y hospitalario.

#### ▪ METALES

Existen varios metales que se han demostrado capacidad antimicrobiana. Muchos de estos metales pesados son micronutrientes esenciales ya que forman parte de las enzimas y cofactores (Fe, Zn, Mn, Co, Cu, Ni, V, Mo), pero a elevadas concentraciones resultan tóxicos [81], ya que pueden inhibir la actividad celular cambiando la conformación enzimática y haciendo perder la integridad de la

membrana [82], o uniéndose al ADN y generando especies reactivas de oxígeno (ROS) [81].

Por otro lado, también se han encontrado resistencias a estos metales [82, 83] que son resultado de una adaptación bacteriana para el mantenimiento de la homeostasis de estos metales en las células y evitar así su acción tóxica [83]. En poblaciones de *E.coli* expuesta a elevadas concentraciones de metales pesados se ha demostrado una sobreproducción de la enzima superóxido dismutasa (SOD) para eliminar los radicales de oxígeno generados [84]. También se ha demostrado, que algunas especies bacterianas, secuestran los cationes de carga positiva en la pared bacteriana [81]. En *P.aeruginosa*, existe una proteína transmembrana, la ChrA, que saca del citoplasma al periplasma los iones cromato [85]. Muchas de estas resistencias están causadas por plásmidos interiorizados en las bacterias. En *Achromobacter xylosoxidans*, el plásmido pA81, tiene genes que codifican una ATPasa tipo-P para una difusión facilitada de los cationes hacia el exterior [86]. En algunas cepas de *S.aureus*, las que tenían el plásmido pBORa53, se ha visto que poseían resistencia al cadmio, ya que este plásmido poseía los genes *cadD-cadX*, involucrados en proteínas de eliminación de este metal [87] y algunas Enterobacteráceas poseen el plásmido *pMG101* responsable de la resistencia a la plata [88].

Los metales también pueden llegar a ser tóxicos para los humanos y los ecosistemas, por ello, la EPA establece valores límites máximos en suelos. De la misma manera, la FDA establece unos valores máximos para algunos metales en alimentación.

Dentro de los metales más tóxicos para las bacterias se encuentran los siguientes que se muestran en la Tabla 1.7:

**Tabla 1.7.** Toxicidad de iones de metales pesados en *E.coli* evaluados por MIC (Concentración mínima inhibitoria)

NOTA: a) La disolución ha de estar ácida para mantener el ión [83]

MIC (mM)	Iones de los metales pesados
0,01	Hg <sup>2+</sup>
0,02	Ag <sup>+</sup> , Au <sup>3+</sup>
0,2	CrO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , Pd <sup>2+</sup>
0,5	Pt <sup>4+</sup> , Cd <sup>2+</sup>
1	Co <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> .Cu <sup>2+</sup> . Zn <sup>2+</sup>
2	Tl <sup>+</sup> . UO <sub>2</sub> <sup>2-</sup> (La <sup>3+</sup> , Y <sup>3+</sup> , Sc <sup>3+</sup> ) <sup>a</sup> , (Ru <sup>3+</sup> , Al <sup>3+</sup> ) <sup>a</sup>
5	Pb <sup>2+</sup> . (Ir <sup>3+</sup> , Os <sup>3+</sup> , Sb <sup>3+</sup> , Sn <sup>2+</sup> , In <sup>3+</sup> , Rh <sup>2+</sup> , Ga <sup>3+</sup> , Cr <sup>3+</sup> , V <sup>3+</sup> , Ti <sup>3+</sup> , Be <sup>2+</sup> ) <sup>a</sup>
10	(Cr <sup>2+</sup> ) <sup>a</sup>
20	Mn <sup>2+</sup>

A continuación se detallan los mecanismos de acción y características de los metales más utilizados y más tóxicos:

## 1. Aluminio

El aluminio, como otros metales, se considera más tóxico en su forma iónica soluble. A pH neutro se liberan pocos  $Al^{3+}$ , ya que para su liberación, se necesita un pH ácido [89]. Por eso, la acidificación de los suelos es un gran problema ambiental, ya que el aluminio es uno de los metales más abundantes en la corteza terrestre [90] y al liberar  $Al^{3+}$  produce una acción tóxica sobre los organismos del ecosistema.

Respecto al modo de acción en bacterias, hay evidencias de que por ejemplo, en el género *Rhizobium* el aluminio se une al ADN [91] lo cual implica un efecto mutagénico al producirse una mala replicación y transcripción. Por otro lado inmoviliza los fosfatos [92] necesarios en biomoléculas tan importantes como el ATP y los ácidos nucleicos.

Se ha utilizado como fungicida y bactericida en el mundo agroalimentario para el tratamiento de los frutos, como por ejemplo el *Fosetil – aluminio* [93] o *Shandong Shengpeng Pesticides Co.*, empresa China que se dedica a la fabricación de fosfuro de aluminio como pesticida [94].

## 2. Cobre

Se ha demostrado, que el cobre, en algunos tipos de bacterias, produce una fuerte depresión en el metabolismo de la leucina y la inhibición de la actividad ectoenzimática [95], ya que el ión cobre altera la estructura tridimensional de las enzimas bacterianas y estas pierden su funcionalidad [96]. Además altera los residuos de aminoácidos con grupos SH y carboxilo [97] y genera radicales libres que alteran las biomoléculas [98].

Por ello, se ha utilizado ampliamente el cobre como bactericida. De esta manera, es la base de la asociación *Antimicrobial Copper* [99] que ha desarrollado aleaciones, recubrimientos de superficies, composites... capaces de liberar iones cobre para aplicarlas en hospitales, medios de transporte, escuelas... y otros lugares con mayor probabilidad de contagio. También se han desarrollado prendas de vestir y telas con la presencia de cobre con fin bactericida [100].

## 3. Mercurio

El mercurio es el metal pesado más tóxico [101] tiene una gran afinidad para unirse a complejos orgánicos y genera sedimentos marinos (muchos formados por restos planctónicos y bacterianos) altamente tóxicos, además se bioacumula a través de la cadena alimentaria [102], siendo las bacterias el primer eslabón. Actúa de una manera similar a otros metales pesados, ya que se une a los grupos sulfhidrilo de las proteínas de membrana y de las enzimas [103].

El mercurio ha sido utilizado durante años para el empaste de los dientes, pero debido a su elevada toxicidad, se ha dejado de utilizar [104]. Por otro lado, uno de los productos antibacterianos más conocidos y comúnmente empleado, pero ya en desuso, que contienen mercurio, es la *Mercromina*<sup>®</sup>, cuyo principio activo es la merbromina o mercurocromo que es el que tiene propiedades bactericidas [105]. Desde la década de los ochenta ha sido sustituido por el yodo que es menos tóxico para los humanos, y tiene un mayor espectro microbiano de actuación [48].

#### 4. Cadmio

El cadmio es otro metal pesado que actúa uniéndose a los grupos tiol y desnaturalizando las proteínas. Además interacciona con el metabolismo del calcio, provocando daño en la membrana [83]. En algunas bacterias, el cadmio entra a través del sistema de entrada y captación del manganeso ya que son ambos son cationes bivalentes y por tanto el cadmio puede competir por el transportador de manganeso [106].

El cadmio aparece en algunos fungicidas y bactericidas utilizados en la agricultura, principalmente, en los indicados para frutales para evitar plagas. Un ejemplo sería el *Coprodul®WG* [107], que tiene en su composición cobre y cadmio en baja concentración.

#### 5. Cromo

El cromo produce su acción bactericida como cromato (oxoanión divalente) y en forma de  $\text{Cr}^{3+}$ , siendo el cromato mucho más tóxico [108]. El cromo se une a polipéptidos pequeños de masa molecular baja, en una proporción de 4 Cr/péptido [109]. Las bacterias captan cromato por los sistemas de entrada del sulfato [83].

Las sales de cromo se utilizan como bactericidas y como tintes en la industria curtidora de piel [110]. Además, como muchos metales, forman parte de fungicidas y bactericidas utilizados en horticultura.

#### 6. Plata

La plata es uno de los metales más tóxicos para las bacterias [83, 111]. Dado que constituye el objeto de estudio en esta tesis, sus propiedades y mecanismos de acción se explicarán en capítulos posteriores.

### 1.2 MATERIALES

#### 1.2.1 Biomateriales

Williams definió biomaterial como *"... una sustancia que ha sido diseñado para tener una forma que, por ella sola o como parte de un sistema, se utiliza para dirigir, controlando las interacciones con los componentes de los sistemas vivos, el uso de cualquier terapéutico o procedimiento de diagnóstico..."* [112]. Y así, los biomateriales deben cumplir con las condiciones de partida de ser biocompatibles (biológicamente aceptables) y asegurar una determinada vida media. A su vez, tienen que aportar las prestaciones específicas que requiera la aplicación a que vayan destinados [113].

Existen varios tipos de biomateriales, metales, polímeros, cerámicos, composites y [112]. Cada grupo tiene sus ventajas y desventajas.



**Tabla 1.8.** Ventajas y desventajas de los biomateriales

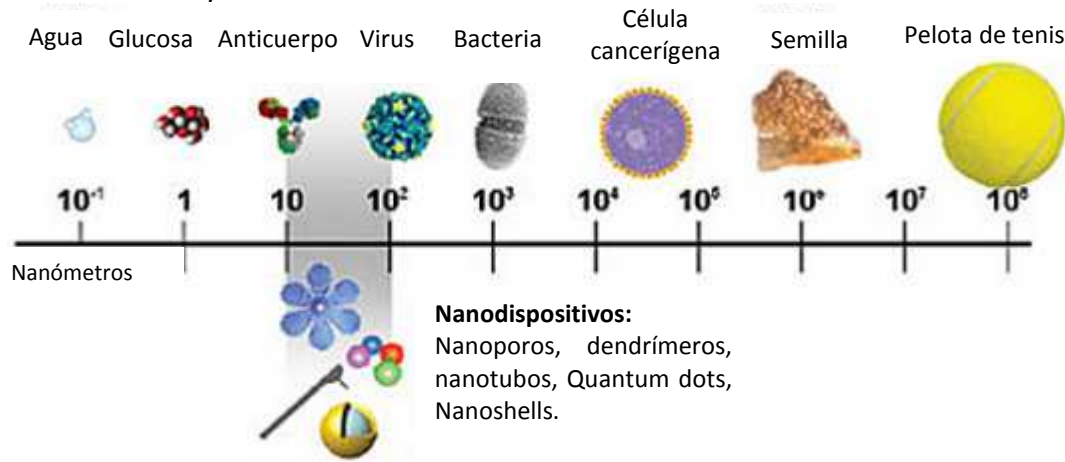
Material	Ventaja	Desventaja	Ejemplos
Metales	Resistencia, esterilización fácil, propiedades bactericidas, durabilidad [114]	Corrosión, toxicidad de los iones metálicos liberados.	Oro, plata, platino y aleaciones de titanio.
Polímeros	Biodegradable, capacidad de modificación, fácil de sintetizar	Difícil de esterilizar, rotura, contaminación de la superficie, lixiviación	Polímeros basado en colágeno, quitosan, elastina, seda [115]
Composites	Resistencia, rigidez, estabilidad dimensional, baja densidad, resistencia a la corrosión.	Dificultad del diseño, alto coste, baja resistencia al calor, mal comportamiento ante los rayos UV [116].	Matriz orgánica de bisfenol glicidil metacrilato o uretano de metacrilato y relleno inorgánico de cuarzo, silicatos, en odontología. Nanocomposites con nanopartículas como relleno inorgánico.
Cerámicos	Elevada biocompatibilidad, osteoconductor, por procesos químicos y celulares con muy baja toxicidad, inertes químicamente [117]	Frágiles, baja resistencia mecánica.	Cerámicas bifásicas de fosfato de calcio [117], materiales basados en silicio (i.e., zeolitas)

La principal desventaja de los biomateriales es la producción de una respuesta inflamatoria que refleja el primer paso en la reparación de tejidos en caso de una lesión. Por eso los diseños modernos van encaminados a evitar la cronificación de la inflamación y las reacciones de rechazo a un cuerpo extraño [118].

### 1.2.2 Nanociencia, Nanotecnología y Nanobiociencia

Se considera en general que el concepto de “nanotecnología” fue introducido por R. Feynman en su conferencia “*There’s plenty of room at the bottom*” en 1959 [119]. Desde entonces ha habido una revolución en el desarrollo de la física, química y biología manipulando la materia a nivel molecular y atómico [120]. Así pues, la nanotecnología se define como el estudio, diseño, creación, síntesis y manipulación de

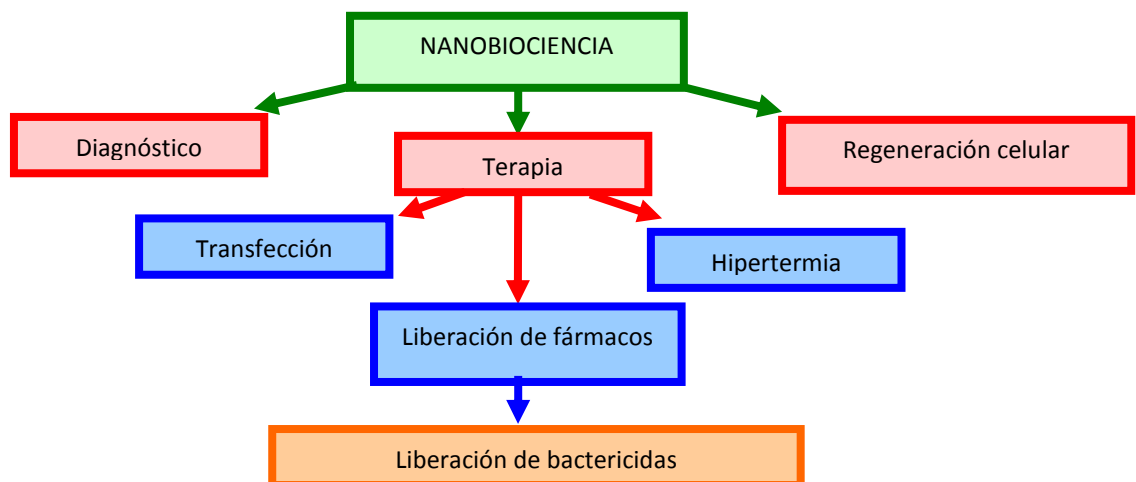
materiales, equipos y sistemas funcionales para la fabricación de dispositivos, de tal forma que alguna de sus dimensiones características sea inferior a 100 nm. De esta manera se crean e investigan materiales con nuevas propiedades y funciones [121] que resultan de la reducción dimensional por debajo de un valor determinado (100 nm o menos), umbral arbitrario, ya que pueden darse propiedades de nanoescala en dimensiones mayores.



**Figura 1.7.** Escala nanométrica representando biomoléculas, organismos y objetos. (Adaptado de la fuente: Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos (National Cancer Institute))

La Nanociencia se define como la ciencia que permite la medición, manipulación y caracterización de materiales y sistemas a escala nanométrica. De esta manera se puede llegar a comprender mejor la estructura y funcionamiento a nivel macroscópico [120]. La nanociencia es un campo multidisciplinar en el que se encuentran la química, física, biología, ingeniería y la ciencia de materiales.

Dentro de la Nanobiociencia se investiga la posibilidad de ordenar, manipular y estudiar los componentes y procesos biológicos a nivel nanométrico [122]. La relación entre biología y nanotecnología está creciendo, ya que se observa un rápido aumento en la nanofabricación de dispositivos en dos o tres dimensiones con aplicaciones biológicas o utilizando biomoléculas [122]. De hecho la nanobiociencia, ya se puede dividir en diversos campos que se muestran en la Figura 1.8:



**Figura 1.8.** Campos de la Nanobiociencia

El Consorcio de Bioingeniería de los Institutos Nacionales de la Salud Norteamericanos fijó como campos prioritarios en Nanociencia en 2002 [123]:

- Ingeniería de tejidos.
- Técnicas de imagen.
- Investigación en marcadores celulares.
- Bioprocesadores implantables.
- Materiales biocompatibles.
- Agentes para liberación de fármacos.
- Tecnología de sensores.

Para poder llevar a cabo estos proyectos y desarrollar investigaciones en nanotecnología, en 2004, se asignaron en Estados Unidos más de 849 millones de dólares [124]. La Comisión Europea, asignó 1300 millones de euros para investigación en nanotecnología en el periodo 2003-2006 [125]. Estos datos nos dan información de la importancia económica de la investigación y desarrollo en nanotecnología y nanobiomedicina.

Hay muchos ejemplos en los que se manifiesta el uso de la Nanociencia con aplicaciones biológicas: con la nanotopografía se está estudiando la transducción celular [126], la utilización de bionanosensores para la detección de virus [127] o la síntesis de nanopartículas como vectores de transfección génica [128].

Los materiales nanoestructurados que pueden clasificarse según sus dimensiones fuera del rango nanométrico como 0-D (por ejemplo fullerenos, nanopartículas o clústeres) en los que todas las dimensiones son nanométricas, 1-D (por ejemplo nanofibras, nanohilos, nanotubos) donde una dimensión puede ser mayor de 100 nm, 2-D (por ejemplo materiales como el grafeno y películas delgadas) [129]. Estos materiales se aplican en nanomedicina y representan una gran oportunidad de mejora de las técnicas de diagnóstico y terapia existentes. Algunos ejemplos, serían la liberación de fármacos [130, 131] con uso bactericida [75, 132] utilizando la estructura interna de los poros que facilitan la biodisponibilidad y la liberación controlada en el tiempo.

La introducción de materiales nanoestructurados en el campo de la medicina supone una gran ventaja para la innovación en este campo y la mejora de terapias. En concreto, el uso de materiales basados en silicio con nanoporos y mesoporos supone una gran ventaja para, sobre todo, almacenar y facilitar la liberación de fármacos. Por ello, en el siguiente apartado se explica las características y ventajas de estos materiales.

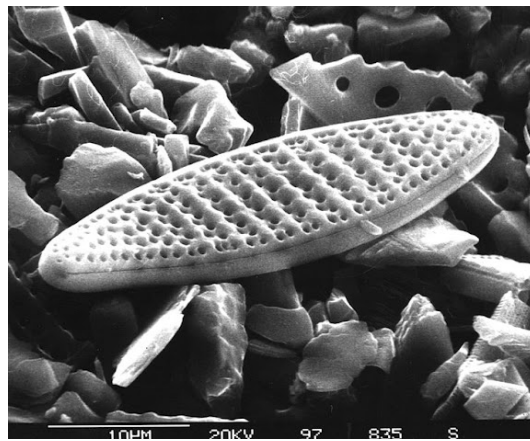
### **1.2.3 Silicio y sus características para la nanobiociencia**

El silicio es el segundo elemento químico más abundante en la corteza terrestre (27,7% en peso) después del oxígeno (47,7%). El silicio se encuentra en la naturaleza normalmente en forma de sílice (dióxido de silicio  $\text{SiO}_2$ ), dando lugar a minerales como el cuarzo. También se puede hallar como silicatos ( $[(\text{SiO}_3)^2]_n$ ) y aluminosilicatos. Todas

estas formas son prácticamente insolubles. El ácido silícico ( $\text{Si(OH)}_4$ ) [133] es el compuesto de silicio más soluble.

Este elemento es muy abundante desde un punto de vista geológico, pero en los organismos está en una proporción escasa. Algunas de sus funciones en los seres vivos serían las siguientes:

- Es esencial para el crecimiento de las plantas como los cereales [133].
- En humanos es un oligoelemento (0,02%) esencial y participa en la síntesis de tejidos conectivos, huesos y cartílago. También es esencial en otros vertebrados, ya que Carlisle en 1972 demostró un crecimiento significativamente retrasado en pollos que fueron alimentados con dietas con ausencia de silicio [134].
- Las diatomeas, algas pardas eucariotas, aprovechan y concentran el ácido silícico y forman exoesqueletos de formas diversas. Cuando la diatomea muere, su exoesqueleto silíceo permanece en el fondo oceánico, formando rocas sedimentarias (tierra de diatomeas). También pueden ser arrastrados hasta las costas formando playas cuya arena es la sílice procedente de estas diatomeas.



**Figura 1.9.** Exoesqueleto en diatomeas. (Fuente: Alfred Wegener Institute, Alemania)

Por otro lado, el silicio es un elemento químico que es biocompatible y, por lo tanto, puede ser un buen componente para ser usado en biomedicina [135]. Las principales características de este elemento son las siguientes:

- Biocompatibilidad: Relativamente inerte cuando se une a tejidos. Es utilizado para fabricación y recubrimiento de implantes.
- Biodegradabilidad: Cuando el silicio nanoestructurado se degrada la toxicidad es baja para el organismo vivo.
- Estabilidad cristalina: Forma estructuras resistentes.
- Micromecanizabilidad: Se puede utilizar en procesos de microfabricación de microsensores.
- Luminiscencia: Las partículas nanoestructuradas de silicio emiten fluorescencia.
- Semiconductividad: Aplicable en microelectrónica.

#### **1.2.4. Nanomateriales de sílice porosa: Zeolitas y Mesoporos**

De acuerdo con la definición de la IUPAC, los materiales porosos se dividen en tres clases de acuerdo con el tamaño de sus poros [136]:

- Microporosos. Tamaño de poro inferior a 2 nm. Dentro de este grupo estarían las zeolitas (Ejemplo: ZSM-5).
- Mesoporosos. Tamaño de poro entre 2 nm y 50 nm. Serían estructuras como la MCM-41 y la SBA-15.
- Macroporosos. Tamaño de poro superior a 50 nm.

Estos materiales tienen una relación superficie volumen muy elevada, con una alta área superficial debido a su gran porosidad y bajo tamaño de poro. A menudo, la estructura de estos poros es uniforme y ordenada. Las propiedades y la elevada área superficial, se han utilizado para diferentes aplicaciones en campos muy diversos como cromatografía, catálisis, separación, detección, almacenamiento de sustancias, bioingeniería, medicina, microelectrónica...[137]. En general, se caracterizan por su baja toxicidad, inercia y estabilidad [138]. Los principales usos que se han dado a estos materiales son los siguientes:

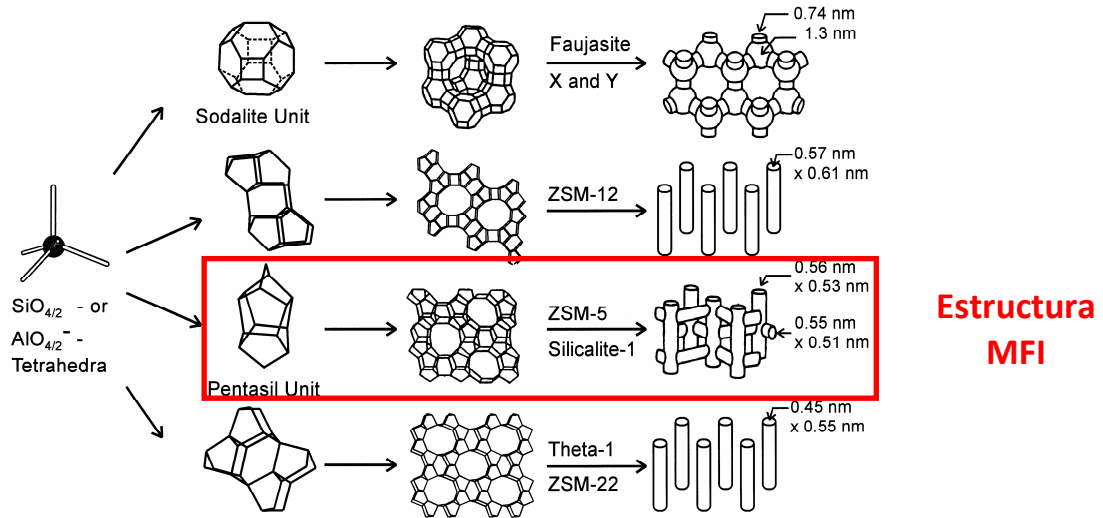
- Separación en el campo medioambiental. Las restricciones sobre las emisiones de contaminantes son cada vez más importantes, por ello las industrias han de separar y retener las sustancias contaminantes como SO<sub>2</sub> [139], NO<sub>x</sub> [140] y VOCs [141]. Para ello han utilizado la adsorción en la superficie de los materiales nanoporosos [138].
- Almacenamiento. Debido a la existencia de poros son buenos materiales para almacenar moléculas en el interior de estos, como por ejemplo, con fines bactericidas [142] o para liberar fármacos [130].
- Catálisis. Los materiales nanoporosos ofrecen gran superficie para distribuir el catalizador y así, aumentar el área de contacto con los reactivos. [138].
- Sensores. Las nanopartículas y los materiales nanoporosos poseen una elevada superficie específica, y por tanto, puede usarse para obtener una alta sensibilidad a pequeños cambios en el entorno de humedad, temperatura y concentración de alguna sustancia [138, 143, 144]. La capacidad de tamizado molecular de las zeolitas las hace ideales para discriminar entre distintas moléculas de acuerdo con sus dimensiones.
- Aplicaciones biológicas. Estos materiales son de gran utilidad en nanobiotecnología, ya que se puede utilizar su superficie y poros para el almacenamiento, transporte y liberación de fármacos [75, 130] o de plásmidos utilizados en transfección [145].

#### ▪ MATERIALES MICROPOROSOS (ZEOLITAS)

Entre la familia de los materiales con microporos, los miembros más conocidos son las zeolitas, que tienen una distribución estrecha y uniforme de sus microporos, debido a un sistema de poros definido cristalográficamente [146]. La introducción de las zeolitas sintéticas en 1950, produjo un cambio de paradigma en el mundo de materiales porosos y de la catálisis [137]. Hoy un día existen más de 200 estructuras diferentes de zeolitas [147, 148].

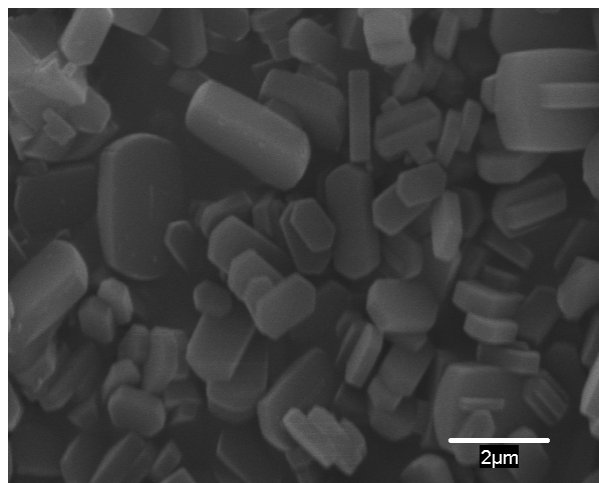
Estos materiales son una clase única de aluminosilicatos cristalinos ya que poseen un área superficial muy elevada, debido al bajo tamaño de los poros (entre 0,25 y 1 nm) [137], ofreciendo infinidad de posibilidades para adaptar estos materiales a un gran número de reacciones químicas catalíticas y de almacenamiento de moléculas en estos

poros. Asimismo, tienen cationes intercambiables que les permite la introducción de otros cationes con diferentes propiedades como las catalíticas. En la Figura 1.10, se muestran diferentes estructuras de zeolitas clasificadas según la estructura y tamaño de su poro [149].



**Figura 1.10.** Estructuras de cuatro zeolitas seleccionadas (de arriba a abajo: faujasita o zeolitas X, Y; zeolita ZSM-12; zeolita ZSM-5 o silicalita-1; zeolita Theta-1 o ZSM-22) y sus sistemas de microporos y dimensiones [149]

Otro de los aspectos importantes es el tamaño y forma de cristal que forma la zeolita. Las zeolitas sintetizadas convencionalmente tienen un tamaño de cristal de orden de decenas o cientos de micras, como es el caso de la silicalita-1 (estructura tipo MFI) de la Figura 1.11. Sin embargo, se está trabajando en la reducción del tamaño de partícula a escala nanométrica, cambiando las propiedades tradicionales de los materiales utilizados principalmente en catálisis y separación. De este modo, al reducir el tamaño de cristal aumenta y adquiere mayor importancia la superficie externa [150].



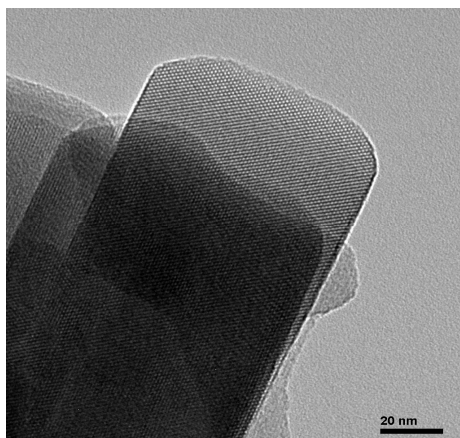
**Figura 1.11.** Cristales de ZSM-5. Diferentes tamaños



La estructura MFI característica de los isomorfos silicalita-1 y ZSM-5, es una de las zeolitas más estudiadas por su fácil preparación y su estabilidad térmica y química. Tal y como se observa en la Figura 1.10 presenta un sistema tridimensional con dos tipos de canales, unos canales rectos (0,53 nm x 0,56 nm) y otros canales sinusoides (0,51 nm x 0,55 nm) [147].

Las zeolitas se sintetizan utilizando un agente estructurante que dirige la polimerización del precursor silíceo de una manera ordenada para formar los poros y que es finalmente eliminado generalmente mediante calcinación o mediante extracción [151]. La ZSM-5 (Figura 1.12) es una de las zeolitas más utilizadas. Su fórmula química es  $\text{Na}_n \text{Al}_n \text{Si}_{96-n} \text{O}_{192} \cdot 16\text{H}_2\text{O}$  ( $0 < n < 27$ ) y fue patentada por *Mobil Oil Company* en 1975. Tiene una baja proporción de aluminio, es decir, una elevada relación Si/Al [111].

Asimismo, dependiendo del catión de compensación, la ZSM-5, al igual que muchas otras zeolitas, puede presentarse en diversas formas: protónica (H-ZSM5), amónica ( $\text{NH}_4$ -ZSM5) sódica (Na-ZSM5)... que poseen una gran versatilidad, ya que puede intercambiarse con metales como cobre [152] o plata [111] y ser utilizada como agente bactericida [111, 153] o como catalizador [154].



**Figura 1.12.** Cristales de ZSM-5. Forma del cristal y detalle de los poros

Sin embargo, las zeolitas presentan limitaciones debidas principalmente al tamaño de poro. Las zeolitas no pueden participar en aquellas reacciones o sistemas en los que se necesita moléculas de gran tamaño molecular, ya que aunque pueden adsorberse en su superficie, no pueden almacenarse en el interior de los microporos [146]. Para ello, se está investigando en el desarrollo de zeolitas con estructuras porosas jerárquicas proporcionando un sistema de mesoporos adicional a los microporos, [155, 156].

Por otra parte existen los denominados zeotipos o materiales semejantes a las zeolitas. Tienen estructuras muy similares a las zeolitas pero con otros elementos distintos al silicio, aluminio y oxígeno. Por ejemplo, se han realizado sustituciones isoelectrónicas de dos átomos de silicio, por uno de aluminio y otro de fósforo, la cual ha llevado al descubrimiento de una amplia gama de fosfatos de aluminio [157, 158]. Se han sintetizado de igual manera tetraedros con la fila siguiente de la tabla periódica al silicio y aluminio, es decir, con galio y germanio [159, 160]. Los zeotipos más característicos son los AIPOs (fosfatos de aluminio) o SAPOs (silicoaluminofosfatos de aluminio). Así, en los microporosos de  $\text{AlPO}_4$  (AIPOs), la estructura de su red consiste en una secuencia estrictamente alternante Al-O-P ( $\text{Al}^{3+}$  y  $\text{P}^{5+}$  unidos por 4 átomos de O,

con dos cargas negativas pertenecientes a dos tetraedros), dando lugar a una red neutra, como en el caso de las zeolitas. Dependiendo de la combinación de cationes metálicos en la red, son, en principio, posibles estructuras con cargas positivas o negativas. Por otra parte, sobre las redes de los materiales zeolíticos se pueden depositar metales o complejos metálicos [161]. Del mismo modo que las zeolitas, los zeotipos son útiles en un gran número de aplicaciones, como catalizadores y soporte de estos, para realización de intercambio iónico y para la adsorción [162].

▪ **MATERIALES MESOPOROSOS**

Debido a los inconvenientes anteriormente citados de las zeolitas para el procesado de moléculas grandes, se investigó sobre el aumento de tamaño de poro hasta que en 1992 la compañía *Mobil Oil Corporation* descubrió un material silíceo con nuevas características [146]. Este fue el MCM-41 que mostró una matriz ordenada y poros hexagonales unidimensionales con mayor tamaño de poro que las zeolitas pero también con una distribución estrecha [163]. A partir de este descubrimiento, fueron apareciendo otros sólidos mesoporosos y se adquirió experiencia sobre diferentes aspectos de su síntesis, modificación superficial, aplicación en otros materiales y catálisis [146, 164].

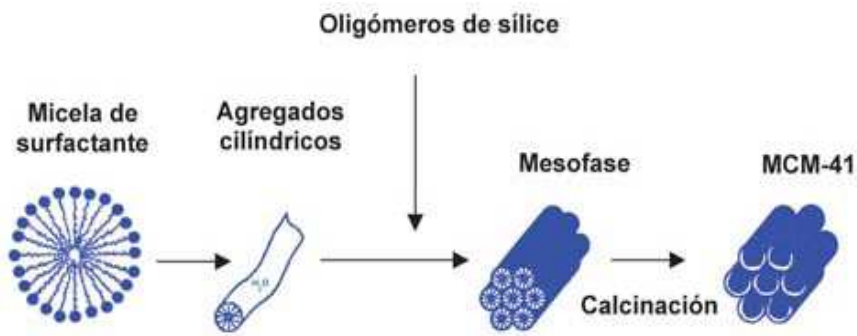
Las propiedades fundamentales que definen cualquier material mesoporoso son la estructura de poro y su tamaño, tal y como se muestra en la Tabla 1.9.

**Tabla 1.9.** Características estructurales de algunos materiales mesoporosos [164]

Sólido mesoporoso	Diámetro de poro (nm)	Estructura
MCM-41	2-5	Canales hexagonales 1-D
MCM-48	2-5	Cúbica 3-D
SBA-15	5-10	Canales hexagonales 1-D
SBA-16	Mínimo 1-6; Máximo 4-9	Ordenamiento de los poros centrado en el cuerpo.
SBA-1	2-4	Cúbica 3-D
SBA-3	2-4	Hexagonal 2-D
MSU	2-5	Hexagonal 2-D
HMS	2-5	Hexagonal

Para la síntesis de los nanomateriales mesoporosos, se necesita la participación de un surfactante en disolución acuosa, que actúa como agente director de la estructura que dirige la polimerización de las especies silíceas que provienen del precursor, normalmente ácido ortosilícico, tal y como se muestra en la Figura 1.13 [165, 166]. Dependiendo de las condiciones de síntesis, la fuente de sílice o el tipo de surfactante, aparecen diferentes tipos de materiales mesoporosos, como se muestra en la Tabla 1.9 [146].





**Figura 1.13.** Síntesis y formación de MCM-41 [166]

Atendiendo a la forma de los poros, en primer lugar, se encuentran las estructuras que contienen poros unidireccionales, como MCM-41 o SBA-15 (Tabla 1.9). Ambas poseen un empaquetamiento hexagonal de poros longitudinales, cuya sección transversal se asemeja más a un hexágono. No obstante, difieren en que SBA-15 puede contener además un sistema secundario de microporos (poros cuyo diámetro es menor que 2 nm) que conectan entre si los canales grandes, y cuya presencia depende en gran medida de la temperatura de síntesis del material [166].



**Figura 1.14.** Esquema ilustrativo del sistema poroso en SBA-15 [166]

Y en segundo lugar, destacan las estructuras que poseen sistemas de poros tridireccionales, formados por la intersección de poros longitudinales a lo largo de las tres direcciones del espacio, como sería la MCM-48 (Tabla 1.9).

### 1.3 LA PLATA COMO BACTERICIDA

#### 1.3.1 Evolución histórica de la utilización de la plata

Los efectos bactericidas de la plata se conocen desde la antigüedad. Ya en la Antigua Grecia y Roma se usaban monedas de plata para preservar el agua libre de microbios en recipientes [167, 168], y así, aparece escrito por el filósofo griego Herodoto. También, se menciona el uso de la plata en el Antiguo Egipto, y es conocido el uso que se hacía de palillos de plata para comer en el Imperio Chino [169].

Durante la Edad Media, también se aprovecharon las propiedades bactericidas de este material, ya que se continuó utilizando para la desinfección de los suministros de agua y para proteger los alimentos que se almacenaban durante mucho tiempo. La clase social adinerada, comía con cubiertos de plata para evitar a los gérmenes, y fue a raíz de entonces, y antes de que llegaran los antimicrobianos modernos, cuando empezó a fabricarse los utensilios para comer y beber de plata para evitar contaminaciones bacterianas [169].

En el Siglo XVIII, el nitrato de plata ya se emplea para el tratamiento de las infecciones microbianas diferentes, tales como las enfermedades venéreas, fístulas de las glándulas salivales, huesos y abscesos perianales [170, 171]. Además, a partir de 1800, se empezó a aplicar el nitrato de plata líquido o en apósitos para evitar infecciones, como la fiebre tifoidea e infecciones posparto, y facilitar la epitelización de las heridas, y fue reconocido como una buena herramienta para el tratamiento de quemaduras [170, 172].

Durante el Siglo XIX, los marineros descubrieron que la colocación de monedas de plata en los barriles de agua, vino y productos perecederos que llevaban en sus barcos ayudaban a mantener estos productos libres de contaminación. Esto, lo aprendieron de los primeros colonos de Estados Unidos que añadían dólares de plata a los recipientes de leche fresca para su conservación [168, 169].

En la Primera Guerra Mundial, se utilizaron hojas de plata para tratar las infecciones de las heridas que habían sufrido las tropas durante el combate. De hecho, el uso de la plata se extendió tanto y su eficacia fue tan evidente, que en 1920 la FDA en Estados Unidos aprobó las disoluciones de plata como agente antibacteriano seguro, incluso en alimentos. Así de esta manera, la plata coloidal (partículas de plata en agua) fue usada de manera generalizada en hospitales [169].

Sin embargo, durante la Segunda Guerra Mundial apareció la penicilina para eliminar las infecciones de las heridas de los soldados y debido a esto, los tratamientos basados en plata, poco a poco, fueron sustituidos por los antibióticos [173, 174]. Sin embargo, debido a la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos y aun mayor control del uso de estos [175], la plata, de nuevo, ha vuelto a cobrar importancia como agente antimicrobiano de amplio espectro.

### 1.3.2 Mecanismo de acción de la plata

Se han estudiado los diferentes mecanismos de acción de la plata sobre las biomoléculas y el metabolismo bacteriano, y se ha observado que la acción depende del estado químico en que se encuentre la plata. Sin embargo, muchos de los mecanismos moleculares de la plata, están aún por investigar [176] y no está, ni muchos menos, exento de controversia su modo reacción. A continuación se resume algunos de los resultados publicados con plata con distintos materiales que contienen plata:

- **PLATA METÁLICA ( $Ag^0$ )**
- La plata metálica interacciona con los grupos tiol de las enzimas que participan en la cadena respiratoria de las bacterias. Además, se une a la pared y membrana celular [170]. Las bacterias realizan la respiración celular gracias a unas proteínas y enzimas

transmembranas, por lo que estos efectos hacen que el proceso de respiración quede inhibido.

- Se ha investigado en algunas bacteria como *E.coli*, que este metal inhibe el sistema de absorción y liberación de fosfatos, manitol, succinato, prolina, glutamina, todas ellas moléculas esenciales en muchas bacterias [177-181].
- Dentro de la plata metálica, adquiere una gran relevancia el estudio de las AgNPs.
  - Las nanopartículas tienen una relación área superficial por unidad de volumen más elevada que otras formas de plata (por ejemplo micropartículas de plata), lo que proporciona un mejor contacto con los microorganismos y aumenta su capacidad de liberar iones plata al medio circundante.
  - Estas AgNPs se unen a la membrana y pared celular de los microorganismos o penetran en el interior de estas, cuya toxicidad se explica en el siguiente apartado.
  - Estos compuestos interactúan con el azufre de las proteínas y el fósforo del ADN. Además son capaces de liberar iones plata, y así aumentan su efecto bactericida.
  - Cuando las AgNPs entran en la bacteria, la bacteria agrupa la plata en unos compuestos de bajo peso molecular para evitar que se liberen iones plata y ataquen al ADN [182-184].

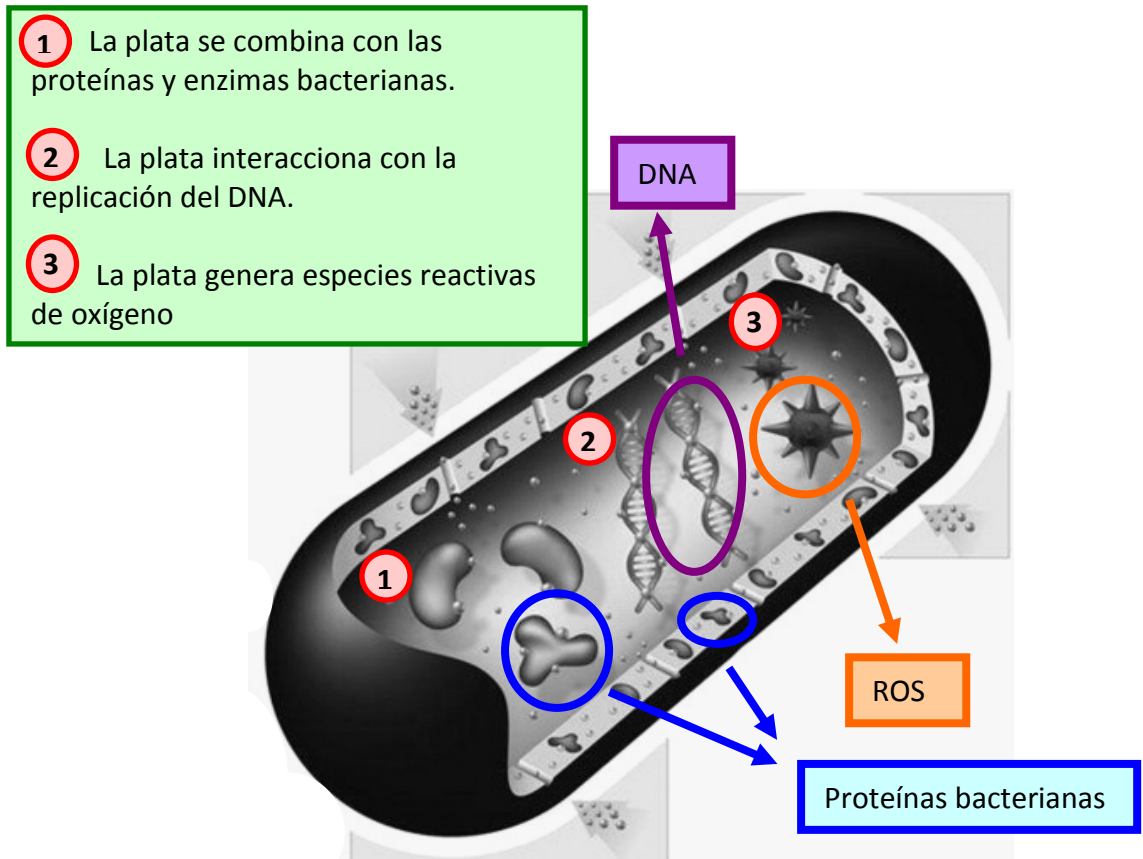
#### ▪ PLATA IÓNICA ( $\text{Ag}^+$ ) Y NITRATO DE PLATA ( $\text{AgNO}_3$ )

- Cuando los iones plata entran en el citoplasma de las bacterias, se unen a los fosfatos que forman parte de la estructura del ADN y este se condensa [182]. El ADN se encuentra en forma condensada cuando no está realizando ninguna función, y esta en conformación laxa cuando se replica y cuando se transcribe a ARN mensajero, que dará lugar a proteínas. Por lo tanto, la unión de la plata, provoca la inhibición de la multiplicación bacteriana, la inhibición de la síntesis de proteínas y finalmente la muerte celular.
- Como otros iones de metales pesados, la plata iónica se une a los grupos tiol de las proteínas y enzimas, produciendo así su inactivación [185].

#### ▪ ZEOLITAS CON PLATA

- El efecto bactericida es debido a los iones plata que están en la zeolita como cationes de compensación y se intercambian con otros cationes existentes en el medio y no a la plata metálica [111, 186]. Así que, sus mecanismos de acción son muy similares a los explicados con la plata iónica.
- Además, se ha demostrado, que la plata en esta forma química genera ROS que inhiben la respiración celular [176].

En resumen, la plata actúa a tres niveles esenciales en el metabolismo bacteriano, tal y como se indica en la Figura 1.15, y la plata en todos sus estados químicos contribuyen a la toxicidad bacteriana:



**Figura 1.15.** Mecanismos de actuación de la plata en el metabolismo bacteriano [187]

#### ■ TOXICIDAD EN BACTERIAS DE LOS COMPUESTOS CON PLATA

Se ha demostrado que el efecto bactericida de la plata depende de su biodisponibilidad [153]:

- Se ha observado que el  $\text{AgNO}_3$  es el compuesto que mayor poder bactericida tiene [153], y, este compuesto actúa a todos los niveles celulares, destacando la inhibición funcional del ADN [182]. Esto se debe a que el  $\text{AgNO}_3$  en disolución acuosa se disocia completamente en  $\text{Ag}^+$  y  $\text{NO}_3^-$  y así el ión  $\text{Ag}^+$  tiene una gran biodisponibilidad para actuar sobre las bacterias ya que, tanto la plata como otros iones de metales pesados, utilizan los canales y transportadores de membrana de otros iones necesarios para la supervivencia celular, como el  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  o  $\text{Na}^+$ [83].
- Las zeolitas y otras matrices inorgánicas tiene la plata intercambiada en forma de ión, por lo tanto, se convierten en un buen reservorio para  $\text{Ag}^+$ , del cual se puede disponer cuando se intercambia este ión por otro monovalente. Esto hace, que sean buenos materiales para aplicaciones bactericidas, ya que además de tener iones plata, su disponibilidad no es tan inmediata como en el  $\text{AgNO}_3$  puesto que liberación exige un proceso de intercambio y esto hace que su acción sea mantenida en el tiempo. Esta disponibilidad y difusión esta controlada por diferentes procesos [186, 188, 189]:
  - ▲ Concentración de la plata en el material.
  - ▲ Concentración en el medio de cultivo de otros iones que pueden intercambiarse con  $\text{Ag}^+$ .

- ▲ Dimensión de las partículas utilizadas.
- ▲ Temperatura del medio.
- ▲ Crecimiento bacteriano. El aumento de la población bacteriana hace que aumente la viscosidad del medio y por tanto disminuye la difusibilidad de la plata desde las matrices.
- ▲ La formación de *biofilm* bacteriano influye en la liberación e intercambio de  $\text{Ag}^+$ .
- ▲ Quelación de  $\text{Ag}^+$  por compuestos presente en el caldo de cultivo.
- ▲ Secuestro por el peptidoglucano de la pared celular de las bacterias.
- Las propiedades bactericidas de las AgNPs dependen de la forma y tamaño de estas [183, 190].
  - ▲ Se ha reportado que las que tienen forma triangular son las que mayor poder antimicrobiano tienen, seguidas de las que tiene forma esférica, y por último las alargadas [191].
  - ▲ Ha sido observado que las AgNPs más pequeñas son las que tienen mayor poder bactericida, concretamente, las que tienen un tamaño inferior a 10 nm [183, 192], y cuando estas se agregan, pierden parte de su actividad [193].

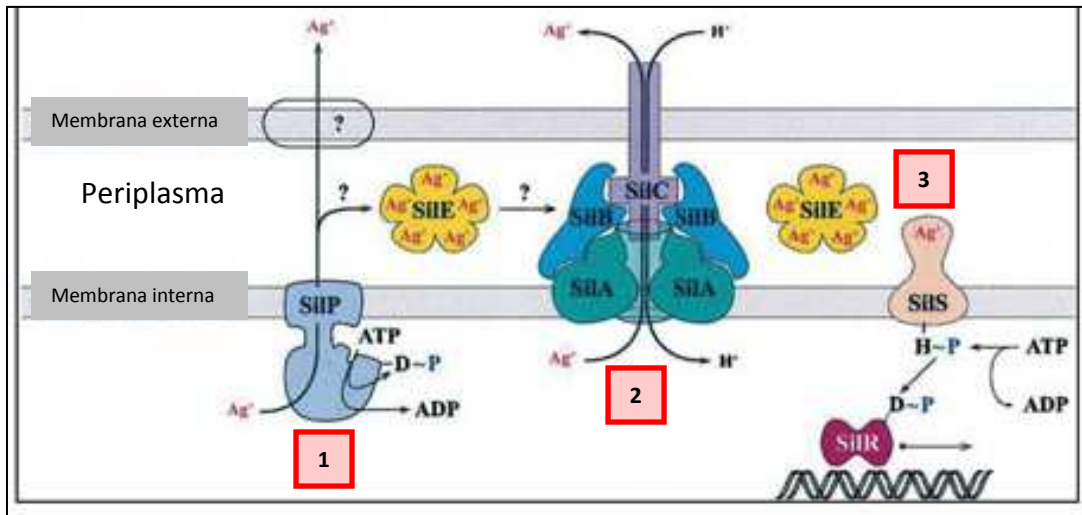
Ambas ideas pueden explicarse por la mayor relación superficie/volumen de unas presentaciones sobre otras.

También se ha comprobado que para que se dé el efecto bactericida de las AgNPs se necesita además de la plata metálica que las forma, la presencia de  $\text{Ag}^+$  que se produce de la siguiente manera [183]:

- ▲ Estos  $\text{Ag}^+$  se generan mediante la oxidación y disolución de la plata metálica que ocurre en el medio de cultivo [194, 195]. De esta manera, se obtienen AgNPs de plata metálica con  $\text{Ag}^+$  quimiabsorbida en su superficie.
- En otros materiales, como en el óxido de plata la solubilidad es baja, pero esta característica se aprovecha para liberar lentamente  $\text{Ag}^+$ , como  $\text{Ag}(\text{OH})_2^-$  [196].

### 1.3.3 Resistencia bacteriana a la plata

Desde 1975 se conoce la resistencia de las bacterias a la plata tanto a nivel hospitalario como en el medio natural [197]. Se demostró que las bases genéticas de esta resistencia estaban codificadas en un plásmido, lo cual fue comprobado también por otros investigadores [198, 199]. Más adelante se descubrió que este plásmido era el *pMG101* determinando las bases fisiológicas, bioquímicas y genéticas de la resistencia a la plata [88, 200]. En este plásmido existen unos genes que codifican dos bombas para la salida de la plata del citoplasma bacteriano, una es ATPasa y la otra quimiosmótica. Por otro lado, codifica dos proteínas periplásmicas que se unen a la plata y la secuestran [200]. Estas biomoléculas se muestran en la Figura 1.16.



**Figura 1.16.** Mecanismos de actuación de la resistencia bacteriana. **1)** ATPasa que expulsa la plata al exterior. **2)** Proteína que actúa por quimiósmosis. **3)** Proteínas secuestradoras de plata [197].

La presencia de este plásmido hace que la concentración de plata necesaria para eliminar, por ejemplo *E.coli*, se multiplique por seis, incluso algunas veces más [201].

Los estudios de resistencia se han llevado a cabo, principalmente, a nivel hospitalario, ya que es donde más posibilidad hay de que las bacterias resistentes causen enfermedades nosocomiales, y por tanto afecten a la población [202-204]. Por esto, y por el uso de compuestos basados en plata para el tratamiento de heridas y quemaduras, se ha investigado la prevalencia de estas resistencias, la transferencia del plásmido y por tanto, la posible transfección cruzada entre diferentes especies bacterianas, ya que las heridas y, sobre todos, los *biofilms* son el entorno ideal para compartir estas resistencias [202]. Sin embargo, se ha observado que la resistencia a plata queda limitada al género *Enterobacteriaceae*. El plásmido causante de la resistencia a plata queda limitado a este grupo, siendo difícil su transferencia [202, 203, 205]. De hecho, se han analizado *Staphylococcus* y otras Gram-positiva aisladas en heridas y expuestas a compuesto de plata y no se ha encontrado ningún tipo de resistencia a la plata [203]. Sin embargo, la plata no es un compuesto tan usado como los antibióticos, cuya concentración residual y concentraciones no bactericidas han proporcionado la aparición de resistencias. Por ello, está por estudiar, si las posibles subconcentraciones de plata podrían provocar estar resistencia [206]. No obstante se considera que la probabilidad de transferencia de genes de resistencia de la plata es baja, inestable y difícil de mantener [197, 207-209].

Últimamente, se está investigado sobre la relación de los genes responsables del metabolismo anaeróbico y aeróbico y la resistencia a la plata. Se ha observado, que aquellos implicados en la anaerobiosis están involucrados en la resistencia a las AgNPs en *E.coli* [210], pero es una cuestión cuya elucidación requiere estudios adicionales.

### 1.3.4 Legislación y enfermedades asociadas con la exposición a plata

#### ■ ARGIRIA

Según la FDA la argiria es la coloración grisácea o azulada permanente e irreversible de la piel, la conjuntiva, uñas y otros tejidos. Esta enfermedad no es peligrosa para la salud física, sin embargo, debido al aspecto puede acarrear consecuencias sociales y psicológicas negativas.

Esta enfermedad es debida a la utilización continua y en exceso de la plata en fármacos y suplementos dietéticos, incluyendo la plata coloidal. Se puede desarrollar:

- rápidamente con el uso de productos que contienen grandes cantidades de plata.
- gradualmente en el tiempo con el uso de productos que contienen pequeñas cantidades de plata.

Puede interferir con la absorción de algunos fármacos, como las quinolonas, antibióticos de tetraciclina, la tiroxina y penacilamina [36].

#### ■ VALORES

La EPA ha establecido una dosis de referencia crónica oral (RfD) [211], es decir, la dosis máxima diaria de ingesta de plata:

- 5 µg de plata por kilogramo de peso corporal por día (5 mg/kg/día). Por ejemplo para una persona de 70 kg sería de alrededor de 350 mg de plata por día.
- La ingestión de plata en cantidades superiores a la dosis de referencia, puede poner a un consumidor en riesgo de desarrollar argiria.

Por otro lado, se han hecho diferentes estudios de exposición a plata, y se han establecido diferentes valores según la forma de plata, organización y evolución en el tiempo, tal y como se muestra en la Tabla 1.10:

**Tabla 1.10.** Límites máximos de exposición a plata en aire. Abreviaturas: **OSHA** (Occupational Safety and Health Administration), **NIOSHA** (National Institute for Occupational Safety and Health), **MSHA** (Mine Safety and Health Administration), **ACGIH** (American Conference of Governmental Industrial Hygienists), **PEL** (Permissible Exposure Limit), **REL** (Recommended Exposure Limit), **TLV** (Threshold Limit Value), **TWA** (8 h time-weighted average) [212, 213]

ORGANISMO/AÑO	NOMBRE DEL VALOR	CONCENTRACIÓN (mg/m <sup>3</sup> )	FORMA DE LA PLATA
OSHA 1989, NIOSHA 2003, MSHA	PEL	0,01	Soluble y metálica
NIOSHA 1992	REL	0,01	Soluble y cenizas metálicas
ACGIH 1966	TLV	0,01	Soluble y metálica
ACGIH 1991	TLV	0,1	Metálica
		0,01	Soluble

Continuación página siguiente



ORGANISMO/AÑO	NOMBRE DEL VALOR	CONCENTRACIÓN (mg/m <sup>3</sup> )	FORMA DE LA PLATA
Comisión Europea 1994	TWA 8 horas	0,1	Cenizas metálicas
NIOSHA 2003: Australia, Bélgica, Finlandia, Francia, Suecia	PEL	0,1	Metálica
		0,01	Soluble
NIOSHA 2003: Austria, Dinamarca, Alemania, Japón, Países Bajos, Noruega, Suiza	PEL	0,01	Metálica y soluble
Directivas 1996/94/CE y 1991/322/CEE. España	PEL	0,01	Soluble

Como se puede observar en la Tabla 1.10, en algunos casos, se establecieron diferentes valores según la forma química en que está la plata. Esto se debe, ha que existen datos que demuestran que las sales de plata (solubles) tienen una mayor propensión para causar argiria que las cenizas de plata metálica [212].

Por otro lado la OMS, también controla la presencia de plata en alimentos y en agua [214]:

- NOAEL (*Non Observed Adverse Effects Level*. Dosis más elevada de una sustancia en la que no se han encontrado efectos adversos en los humanos) por ingesta oral es 10 g de plata en toda la vida.
- Cuando la plata se utiliza como sal para mantener la calidad del agua potable, el nivel máximo es de 0,1 mg/l (que nos da la NOAEL de 10 g en 70 años).

En España, el **R.D. 1054/2002** que regula “**El proceso de evaluación para el registro, autorización y comercialización de biocidas**”, permite el uso de peróxido de hidrógeno y sales de plata para la desinfección de superficies sin favorecer los procesos de corrosión en las instalaciones.

Así, también en el **R.D 1111/1999**, por el que “**Se modifica la Reglamentación Técnico-Sanitaria de aditivos alimentarios aprobada por R.D 3177/1983 y modificada por R.D 1339/1988**” y en el **R.D 2001/1995**, por el que “**Se aprueba la lista positiva de aditivos colorantes autorizados para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización**”, se incluye la plata como colorante alimenticio permitido.

La plata puede formar parte de otros materiales, debido a esto, la EFSA (*European Food Safety Authority*) en 2011, estudió la inocuidad de la Zeolita A intercambiada con 2-5 % en peso de plata. Esta zeolita, iba a destinada al control de microorganismos en artículos para almacenar alimentos expuestos a temperatura ambiente durante un largo tiempo y fueron fabricados con poliolefinas, politereftalato de etileno (PET) y policarbonato (PC) con un máximo de 3% en peso de la zeolita (Empresa: AgION Technologies Ing. EE.UU) [215]:

- Se concluyó que no hay toxicidad sino se liberan más de 0,05 mg Ag/kg de alimento.
- Se tuvo en cuenta que la liberación de aluminio de la zeolita no fuera mayor de 1 mg/kg de masa corporal/semana.



Por otro lado, para la aplicación de las AgNPs, además de remitirse a la normativa sobre plata, es necesario basarse en la normativa de nanopartículas y nanotecnología, que es un sector nuevo y emergente, incluso en cuanto a legislación. Durante 2010 la Comisión Europea mediante el Centro Común de Investigación (JRC, *Joint Research Center*), empezó la regulación de las nanopartículas, mediante el primer paso de definir estas en un tamaño entre 1 y 100 nm.

En 2008 apareció la **Recomendación 2008/345/CE** de la Comisión Europea, “**sobre un código de conducta para una investigación responsable en el campo de la nanociencia y las nanotecnología**”. En esta se definió el término *nano-objeto*, para designar los productos resultantes de la investigación sobre nanociencia y nanotecnología. Se incluye las nanopartículas y su agregación a escalas nanométricas, los nanosistemas, los nanomateriales, los materiales nanoestructurados y los nanoproductos.

Para seguir legislando y normalizando el campo de la nanotecnología, en el año 2010, aparece la primera norma, denominada “**Nanotecnologías. Terminología y definiciones para nano-objeto**” [216]. Se trata del primer documento normativo publicado por ISO sobre terminología y definiciones en el campo de las nanotecnologías, del total de 8 que componen la serie ISO 80004, actualmente en proceso de elaboración:

- Parte 1: Términos centrales
- Parte 2: Nano-objetos: Nanopartículas, nanofibra y nanoplaca
- Parte 3: Nano-objetos de carbono
- Parte 4: Materiales nanoestructurados
- Parte 5: Interfase bio/nano
- Parte 6: Medidas e instrumentación en nanoescala
- Parte 7: Aplicaciones en medicina, salud y cuidado personal
- Parte 8: Procesos de nanofabricación

También se ha publicado la **ISO/TR 12885:2008**, referida a la “**Salud y seguridad ocupacional en las prácticas con nanotecnologías**”, desarrollado dentro de la **ISO/TC 229 “Nanotecnologías**”, que se basa en la información actual acerca de las nanotecnologías, incluida la caracterización, los efectos en la salud, las evaluaciones de la exposición, y las prácticas de control.

Asimismo, la EPA bajo el grupo de control de sustancia tóxica (TSCA, *Toxic Substances Control Act*) vigilia y controla que la fabricación y utilización de materiales nanométricos no afecten a la salud y al medio ambiente. TSCA enfoca su trabajo en cuatro puntos [80]:

- Notificación de la prefabricación
- Normas sobre nuevos usos
- Reglas de recopilación de información
- Reglas sobre la realización de pruebas

Por otro lado, la EPA y la FIFRA (*Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act*) proporcionan un marco eficaz para la regulación de los productos plaguicidas que contienen nanomateriales. Principalmente, estas organizaciones recopilan información sobre aquellos pesticidas que tienen nanomateriales, para evaluarlos y registrarlos.

Los nanomateriales, debido a sus propiedades, aportan grandes ventajas aunque es necesario estudiar sus riesgos ya que pueden llegar a atravesar membranas y barreras tan selectivas, como la barrera hematoencefálica.

En resumen, mientras que en la normativa respecto a la plata y otros metales se han determinado unos valores claros y definidos cuando estos se presentan de forma convencional, en nanopartículas y nanomateriales, se está empezando a legislar debido a lo novedoso y reciente de su uso, y en la mayoría de los casos, se está en proceso de recogida de datos, registro y observación de posibles efectos adversos. Se trata de un área en rápida evolución ya que por ejemplo, la concentración de plata encontrada en las costas europeas es muy baja (pg/L), y ha disminuido por el auge de la fotografía digital respecto a la analógica que utilizaba la plata para revelar las fotografías, pero sin embargo, está aumentando la concentración de plata en forma de AgNPs por el aumento del uso de la plata en esta forma [217].

### 1.3.5 Ventajas de la plata respecto a otros materiales

Como se ha señalado, la resistencia bacteriana a los antibióticos se está convirtiendo en un reto importante, principalmente en el ámbito médico y hospitalario. Esto, se ha debido a un uso generalizado de antibióticos que ha aumentado el número de organismos aislados resistentes a antibióticos [218]. Como consecuencia, y para contener a los microbios resistentes, se han adoptado varias recomendaciones para limitar y controlar el uso de antibióticos [219]. Por otro lado, el conocimiento de la plata como microbiano desde la antigüedad ha asegurado su uso como agente antimicrobiano [168], a pesar de lo cual, las resistencias bacterianas encontradas son limitadas como ya se ha comentado. Por ello, la plata tiene una serie de ventajas respecto a los antibióticos:

- Tiene un gran espectro de actuación tanto contra gram-positivas y gram-negativas, con un mínimo desarrollo de resistencias [220] en un grupo controlado [202].
- Los efectos secundarios son muy limitados [221].
- Previene infecciones en piel, heridas e internas por el uso de catéteres cuando están recubiertos de plata [222].
- Compatibilidad con la piel.

En contrapartida, si que existen antibióticos de amplio espectro que actúan contra un gran número de bacterias como sería la tetraciclina y el cloranfenicol, que actúan inhibiendo la síntesis bacteriana [223]. Sin embargo, la mayoría de los antibióticos, actúan sobre unos grupos determinados de bacterias, siendo necesario identificar el tipo de organismo antes de seleccionar el antibiótico. Por ejemplo, la vancomicina que actúan sólo sobre los Gram positivos, inhibiendo la síntesis de la pared celular [224].

Tal y como se ha comentado anteriormente, si que existen resistencias a la plata, pero son mínimas y en un grupo muy reducido [202]. Sin embargo existen numerosas cepas bacterianas que se han hecho resistentes a un gran número de antibióticos. De hecho, existe un gran número de bacterias aisladas de cultivos de sangre que presentan indicadores de resistencia a múltiples antibióticos [225] como son: *S.aureus* resistente a la meticilina (MRSA), *S.aureus* resistente a la vancomicina (VRSA), *Enterococcus* resistentes a la vancomicina (VRE), *Streptococcus pneumoniae* resistente a la penicilina (PRSP), *Enterobacteriaceae* resistentes a cefalosporinas de tercera generación [226].

Los antibióticos pueden producir un gran número de efectos secundarios. Uno de los más característicos es la diarrea [227] debido a la destrucción de la flora bacteriana intestinal. El cloranfenicol es uno de los antibióticos más utilizados en oftalmología y está aumentando su uso en los países en desarrollo. Actúa a nivel ribosomal y de síntesis de proteínas bacterianas. Debido al origen endosimbiótico de las mitocondrias, siendo el orgánulo energético de la célula, también se convierten en diana de este antibiótico, produciendo graves efectos secundarios como la miopatía [228]. Sin embargo la plata usada a nivel hospitalario, como por ejemplo en recubrimientos de prótesis, no ha producido efectos secundarios tóxicos ni en la sangre, ni en el hígado, ni el riñón [229], aunque en algunos casos producía inflamación [230]. Asimismo, son muy poco comunes los efectos secundarios ocasionados por la sulfodiazina de plata, que aún no están completamente explicados [231]. Aunque los apósitos utilizados para quemaduras en algunos casos si que han producido inflamación [232], los efectos son mucho menores que los causados por antibióticos.

En resumen, la plata se ha convertido en una buena alternativa a los antibióticos, principalmente en tratamiento de quemaduras, heridas y en prótesis. Sin embargo, debido a su todavía poco extendida aplicación, no son tan conocidos sus efectos como en los antibióticos.

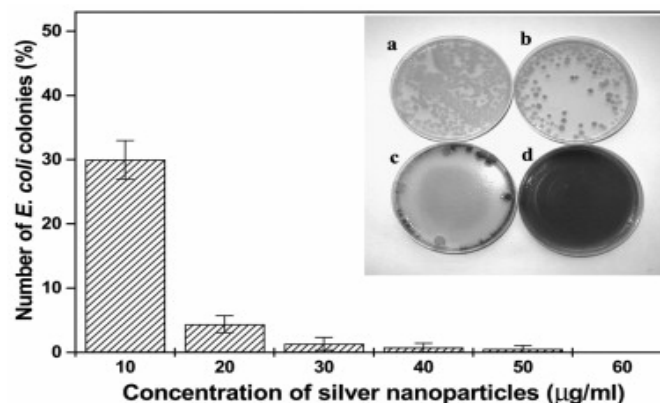
### 1.3.6 Plata en materiales nanoestructurados

Debido a las propiedades bactericidas de la plata, se han empezado a utilizar en nanobiotecnología, en compuestos basados en este metal [233], como se muestra a continuación.

#### ■ AgNPs

Las nanopartículas de plata son muy útiles en ámbitos como la fotografía, la catálisis, el marcaje biológico, la fotónica, la optoelectrónica, la detección SERS, y con gran importancia en microbiología [234].

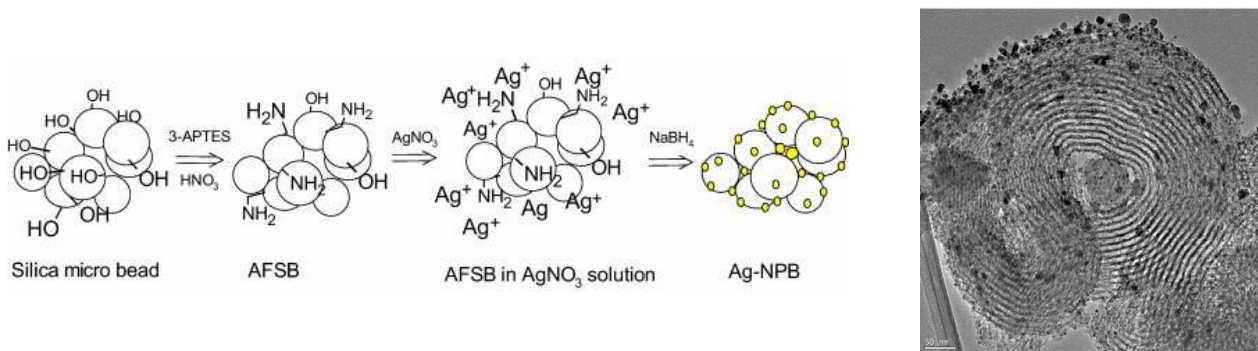
Se ha observado la propiedad bactericida de las AgNPs en numerosos estudios. Tal y como se muestra en la Figura 1.17, se observó una disminución de la carga bacteriana *in vitro* de *E.coli* en función de la concentración de AgNPs [235], en *S.aureus* rompiendo la pared celular [236], e incluso inhibiendo la formación de *biofilm* en *P.aeruginosa* y *S.epidermidis* [237].



**Figura 1.17.** Disminución del número de colonias de *E.coli* en presencia de AgNPs [235]

▪ **AgNPs VEHICULIZADAS**

También, se ha observado este efecto bactericida cuando las AgNPs van asociadas a algún tipo de material transportador. Se ha demostrado que AgNPs sintetizadas *in situ* mediante la reducción del AgNO<sub>3</sub> con borohidruro de sodio en hidrosilicatos como la Montmorillonita, y aplicado este material en frutas y verduras, alarga la vida útil de estos alimentos reduciendo su carga microbiana [238]. Asimismo, las AgNPs soportadas en zeolitas demostraron ser eficaces contra *E.coli* y *Salmonella typhi* en medios de cultivo, incluso a tiempos muy cortos de 5 minutos con un 4 % en peso de contenido en plata en la montmorillonita [239]. También se han sintetizado *in situ* AgNPs en micropartículas de sílice de 180 μm a 500 μm [240] y en materiales mesoporosos silíceos como la SBA-15 [142] para la eliminación de bacterias.



**Figura 1.18.** Síntesis *in situ* de AgNPs en microesferas de sílice [240]. AgNPs sobre SBA-15 [142]

En este mismo ámbito, también se ha estudiado la presencia de AgNPs en nanocomposites. Así por ejemplo, los nanocomposites con nanopartículas de plata sintetizadas *in situ* reduciendo la plata iónica con maltosa, muestran un significativo poder bactericida y fungicida contra diferentes especies de microorganismos típicamente caracterizados en enfermedades nosocomiales, por lo que se considera un buen material para las aplicaciones médicas de desinfección [241]. Además para evitar el problema médico asociado a la colonización y contaminación microbiana de los dispositivos médicos (prótesis, catéteres...) se ha investigado la disposición de AgNPs en láminas de quitosan/polivinilpirrolidona (PVP) mediante *dip coating*, obteniendo resultados muy satisfactorios eliminando el 100% de la carga bacteriana rápidamente y manteniendo esta propiedad bacteriana en el tiempo [242].

▪ **PLATA IÓNICA INTERCAMBIADA EN MATERIALES NANOESTRUCTURADOS**

Se ha aprovechado las propiedades de intercambio iónico que proporcionan las zeolitas, para incorporar el ión plata y por tanto dar una nueva característica como antimicrobianos a estos materiales. Los estudios realizados con zeolita A intercambiada con baja cantidad de plata (0,4 % en peso) [243] y con otras zeolitas [189], demuestran una elevada eliminación de bacterias, hongos y levaduras. Incluso, se han incorporado zeolitas intercambiadas con plata en apósitos y tejidos comerciales

[244], gomas y poliuretano [245] y se ha observado una efecto bactericida en varias enfermedades nosocomiales [244].

En resumen, se puede observar el gran potencial de la plata como bactericida en todas sus formas, y su alto potencial de uso en el ámbito hospitalario como profilaxis o como bactericida.

### 1.3.7 Sinergia de la plata con otros compuestos

La sinergia se define como la acción de dos o más causas o compuestos cuyo efecto conjunto es superior a la suma de los efectos individuales [246]. Con este propósito se han realizado combinaciones de varios antibióticos [247-250] para potenciar y acelerar la eliminación de microorganismos, incluso la combinación de antibióticos con diferentes productos naturales, como extractos de hojas de té, de plantas del género *Thymus*, otros compuestos típicos de plantas [250, 251] y extractos de granada [252].

Existen también estudios sobre efectos sinérgicos entre plata y antibióticos. Así, por ejemplo, en varias especies del grupo Enterobacteráceas, se ha estudiado la sinergia entre AgNPs y AgNO<sub>3</sub> con péptidos antimicrobianos cuya función es permeabilizar la membrana [253], también entre AgNPs y antibióticos como eritromicina, metilicina, cloranfenicol y ciprofloxacina contra varias especies bacterianas como *S.aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Salmonella enterica* y *Enterococcus faecalis* [254], y entre AgNPs y antibióticos β-lactámicos en *E.coli* [255].

Asimismo se ha investigado la sinergia entre la plata y otros metales pesados. De esta manera, con la plata y el cobre se observó efecto sinérgico contra *Legionella pneumophila* y se postuló su posible uso en zonas hospitalarias para desinfectar el sistema de distribución de agua [256]. También se ha visto un aumento del poder bactericida de nanopartículas de zinc cuando estas están rodeadas con plata contra varias especies de Gram-negativa [257].

Sin embargo, no existen muchas investigaciones sobre la sinergia entre plata y compuestos típicamente usados en desinfección de superficies, aguas y sistema de distribución (cloro, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, PAA...) y es difícil encontrar estudios sobre estos compuestos usados conjuntamente. No obstante, se ha observado sinergia entre plata y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [258] en *E.coli* K-12 con una reducción de hasta tres unidades logarítmicas en el número de unidades formadoras de colonia por mililitro [259] y entre plata, cobre y cloro para eliminar amebas en agua [260].

Por ello, en esta memoria se presenta un estudio de la sinergia entre la plata y el ácido peroxiacético almacenado en los poros de materiales nanoestructurados, con excelentes resultados en eliminación de población bacteriana, eliminación del *biofilm* e impedimento en la formación de este *biofilm* como se mostrará en el apartado 6 [75, 142].

## 1.4 APLICACIONES ACTUALES DE LA PLATA

Debido a sus numerosas aplicaciones se prevé que el mercado asociado a la industria de la nanotecnología aumente de manera significativa llegando hasta los 3 billones de dólares en 2015 [261]. Entre todos los productos, destacan las nanopartículas, y

principalmente, las AgNPs. Se estima que del total de las nanopartículas en productos de consumo, las AgNPs tienen el más alto grado de comercialización [262]. El poder bactericida de amplio espectro de la plata y al gran desarrollo en nanotecnología, han permitido la aparición de nuevos y mejores productos desinfectantes.

#### 1.4.1 Aplicación de la liberación de plata iónica

El uso del nitrato de plata y por tanto de la plata iónica, es conocido desde hace tiempo. Por ello hay una gran variedad de productos con poder bactericida utilizados en diversos ámbitos que aprovechan las propiedades de este ión.

##### ■ PRODUCTOS A NIVEL MÉDICO Y HOSPITALARIO

Los iones plata se han utilizado en gran variedad de utensilios y material hospitalario para evitar infecciones y colonizaciones que podrían desembocar en enfermedades nosocomiales y además evitar infecciones en heridas y quemaduras.

- *Elastoplast® Silver Healing™* son unos apósitos que poseen una almohadilla de plata que libera iones durante el proceso de curación de las heridas para prevenir infecciones. Elimina, según sus fabricantes, más de 150 gérmenes nocivos y reduce riesgos de inflamación e infección a la vez que favorece la cicatrización [263]. Asimismo los apósitos de *Curad®* [264] y de *Actisorb® silver (Johnson & Johnson New Brunswick, N.J.)* siguen la misma estrategia. *Atrauman® Ag (Unitex-Hartmann)* es un apósito estéril de malla impregnado con una pomada hidrófila compuesta fundamentalmente por triglicéridos. Contiene iones de plata, que se liberan a concentraciones adecuadas, limitando su efecto a la superficie de la herida. Al entrar en contacto con la herida, se inicia el efecto antiséptico y los gérmenes son destruidos, a través del mecanismo conocido como “*Touch and kill*” [265].



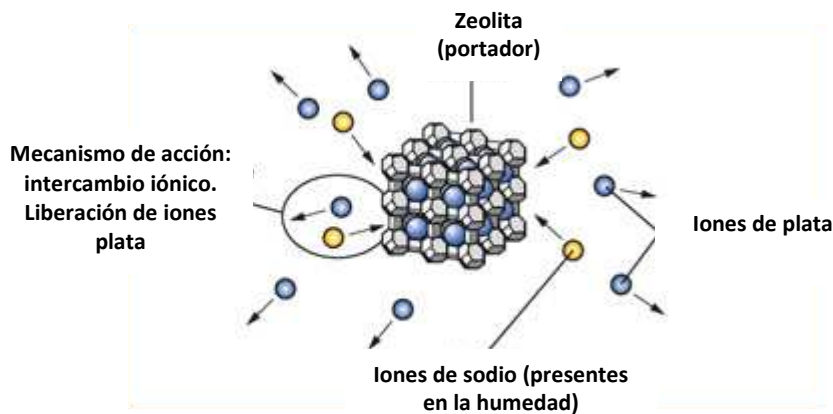
**Figura 1.19.** Apósitos *Elastoplast® Silver Healing™* [263]

- *AGC Flat Glass Europe* ha desarrollado un cristal con propiedades antimicrobianas. Los iones de plata incorporados en el vidrio son responsables de la actividad antimicrobiana. La empresa demostró que el 99,9 % de las bacterias que entran en contacto con la superficie del vidrio son eliminadas. El vidrio fue elaborado para



ayudar a prevenir la propagación de agentes patógenos en el medio hospitalario [266].

- *AgION*<sup>®</sup> es una empresa que se basa en el uso de zeolitas con plata como intercambiadores iónicos. Estas zeolitas se distribuyen formando una capa sobre fibras, polímeros u otros recubrimientos. En condiciones de humedad, cuando se desarrolla el crecimiento bacteriano, tiene lugar el intercambio iónico, los iones positivos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ...) presentes en el ambiente, se intercambian con los cationes de plata contenidos en la zeolita, liberando esta la plata (Figura 1.20). Esta empresa desarrolla su tecnología en varios campos: salud (instrumentos médicos, recubrimientos de superficies...), industria alimentaria e industria textil [267].



**Figura 1.20.** Funcionamiento del intercambio iónico de la zeolita *AgION*<sup>®</sup> [267]

- La sulfadiazina de plata ha sido utilizada como principio activo en *Flammazine*<sup>®</sup> *Silvadene*<sup>®</sup>; y junto a otros compuestos como la clorhexidina en *Silverex*<sup>®</sup> *Motiff Laboratories Pvt. Ltd. Kare Health specialties, Verna, Goa* y nitrato de cerio en *Flammacerium*<sup>®</sup>, *Solvay, Brussels, Belgium*. Se presenta en forma de pomada para aplicar sobre la piel. Su formulación se produce a partir del nitrato de plata y la sulfadiazina de sodio mediante la sustitución de un átomo un átomo de sodio por uno de plata en la sulfadizaina. Este compuesto es el compuesto con azufre y plata más eficaz [268].

Otros ejemplos de investigaciones que se siguen realizando para mejorar la acción y la eficacia de estos productos son los siguientes:

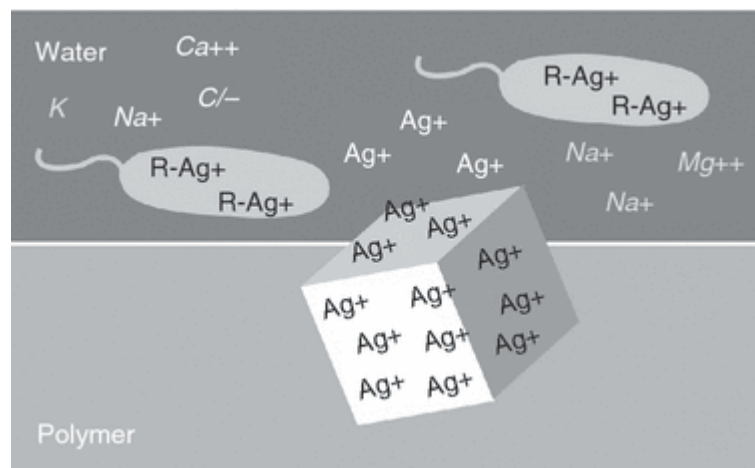
- La zeolita A intercambiada con plata, ha demostrado ser un buen agente bactericida contra *S. mutans*, *S. mitis*, *C. albicans*, *S. aureus* y *P. aeruginosa in vitro* [189], la zeolita ZSM-5 contra *S. aureus* [111] y la faujista intercambiada con plata contra las bacterias *E. coli* y *B. subtilis* y las levaduras *S. cerevisiae* y *C. albicans* [269].
- Se han producido vidrios bioactivos con la presencia de iones plata en su superficie con posibles usos en industria y salud [270], utilizando nitrato de plata en la síntesis y fabricación de vidrio. El poder fungicida contra *C. albicans* depende de la concentración de nitrato de plata en el medio de intercambio iónico pero no del tamaño de la partícula de vidrio utilizada en la síntesis [271].
- Los nanocomposites intercambiados con plata, también han sido ampliamente utilizados como bactericidas. Por ejemplo, con películas de nanocomposites basados en hidroxiapatita y titanio con iones plata sobre superficies de titanio se ha

constatado una reducción del 98 % en *S. aureus* y más del 99 % en *E. coli* después de 24 horas de incubación [272].

### ■ PRODUCTOS ALIMENTICIOS

La liberación de iones plata directa desde el nitrato de plata o a partir de diversas matrices, también ha sido aprovechada por la industria alimentaria y en operaciones de procesado, almacenamiento y mantenimiento de los alimentos.

- Se ha investigado el uso de *AlphaSan*<sup>®</sup> (*Milliken, Gent, Belgium*) para recubrir la parte interna de frigoríficos fabricados por *Bosch & Siemens Hausgeräte GmbH (Glengen, Germany)*. Es una resina cerámica basada en fosfato que se ha intercambiado iónicamente con plata. De este modo, se obtiene una liberación controlada de los iones plata que produce un efecto antimicrobiano contra los géneros *Staphylococcus*, *Lactobacillus* y *Pseudomonas*, con una reducción de hasta 5,9 unidades logarítmicas [273].



**Figura 1.21.** Intercambio iónico de la plata del polímero con la superficie [273]

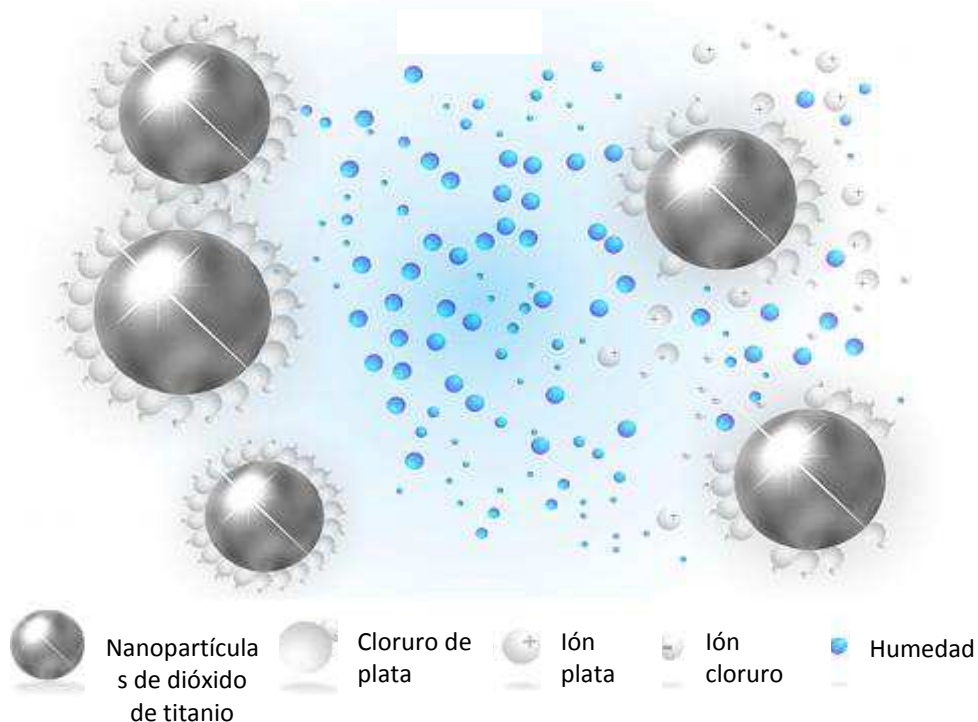
- *Ice-O-Matic*<sup>®</sup> es una empresa que fabrica contenedores y máquinas de fabricación de hielo. Para evitar la contaminación de estas por hongos y bacterias, las superficies de los contenedores y máquinas se han recubierto con iones de plata con la tecnología de *AgION*<sup>®</sup> [274].
- *Sherwin-Williams*<sup>®</sup> una empresa de pinturas [116] incorpora plata en un tipo de superficie denominada *FasTop S*<sup>®</sup>, que se utiliza en plantas de tratamiento de alimentos y cocinas [116]. Esta combinación ha incorporado los iones plata a través de la tecnología *AgION*<sup>®</sup> para tratar superficies y dotarles de propiedades bactericidas [116].
- La empresa *Samsung*<sup>®</sup> ha desarrollado lavadoras que liberan iones de plata que se incorporan a los tejidos y crean una capa de protección microbiana. También ha creado frigoríficos con superficies recubiertas con AgNPs que cuando entran en contacto con microorganismos liberan iones plata, favoreciendo la conservación de los alimentos [275]. Han extendido estos desarrollos a otros instrumentos como teclados de ordenadores, superficies, etc.



- Se ha patentado la utilización de sepiolita intercambiada con plata para la esterilización de alimentos a altas temperaturas (140°C) y tiempos cortos (1 s) [276]. Otros materiales estudiados son los composites basados en plata, con los que se ha observado una liberación de iones plata continua y prolongada, demostrando que aquellos composites con mayor cantidad de peso (4% y 8% en peso) aumenta la liberación de iones plata a partir del sexto día en compartimentos de almacenamiento de líquidos [277].
- Se ha mostrado el efecto bactericida en tablas de cortar alimentos conteniendo zeolita intercambiada con plata en condiciones de humedad contra *S.aureus*, pero los compuestos orgánicos neutralizaron la acción de la plata [278].
- **OTROS USOS**

La plata como desinfectante se ha aprovechado en numerosas industrias:

- *Kohler*® es una empresa dedicada a la fabricación de inodoros, y ha producido asientos de WC mezclando en su síntesis iones de plata para eliminar gérmenes, principalmente aquellas bacterias, hongos y mohos causantes del mal olor [279].
- *Odin wear*® fabrica ropa que libera iones plata para el control del olor, y para proteger la piel de posibles gérmenes. Para ello utiliza la tecnología de *Silverplus*® empresa que fabrica tintes y recubrimientos con iones plata. La tecnología *Silverplus*® se basa en nanopartículas de dióxido de titanio recubiertas de cloruro de plata que en contacto con la humedad liberan iones plata [280]. De hecho, uno de los campos novedosos de investigación está relacionado con fibras que liberan iones plata a partir de AgNPs que recubren sus superficies, encontrando un buen poder antimicrobiano con *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* [281].



**Figura 1.22.** Mecanismo de acción de la tecnología *Silverplus*® (Fuente: *Silverplus*®)

- *National Furniture*<sup>®</sup> es una empresa que fabrica muebles utilizando la tecnología de *AgION*<sup>®</sup>. En sus líneas de muebles las superficies son capaces de liberar iones plata para inhibir el crecimiento de moho, hongos y bacterias que pueden causar malos olores y manchas [282]. También se ha evaluado con éxito la capacidad bactericida de una suspensión coloidal de plata, sobre microorganismos encontrados en los muebles de museos y archivos que son los responsables del deterioro de las piezas encontradas en estos lugares [283].



**Figura 1.23.** Mecanismo de liberación de iones plata en muebles [282]

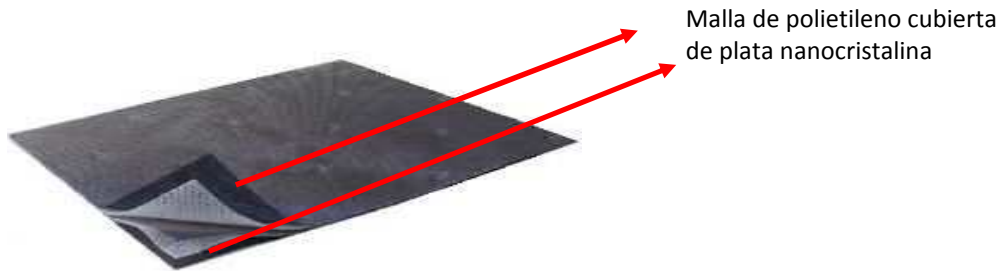
#### 1.4.2 Aplicación de la liberación de plata metálica (AgNPs)

Debido al auge de la nanociencia el uso de las AgNPs con uso bactericida, se está convirtiendo en un importante campo de investigación con el desarrollo de una gran variedad de productos.

##### ▪ PRODUCTOS A NIVEL MÉDICO Y HOSPITALARIO

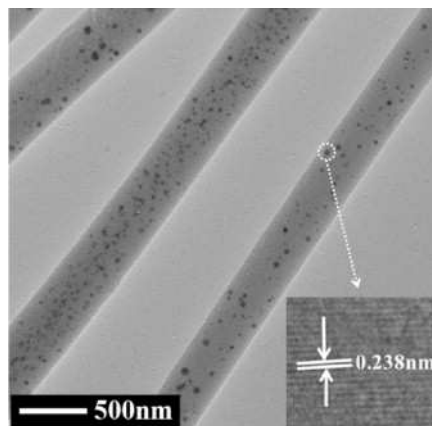
En medicina nos encontramos varios tipos de vendas y apósitos que incorporan AgNPs, principalmente, usados a nivel tópico para prevenir o curar infecciones en heridas y quemaduras.

- La FDA aprobó el uso de tubos endotraqueales de respiración con una fina capa antimicrobiana de plata después de que varios estudios demostraran que podían reducir el riesgo de neumonía en pacientes con ventiladores mecánicos [36].
- *Acticoat*<sup>™</sup> 7 con *SILCRYST*<sup>™</sup> (*Smith and Nephew Healthcare, UK*) [284] son apósitos que contienen plata nanocristalina recubiertas por mallas de polietileno (Figura 1.24) para favorecer la curación y la eliminación de bacterias. Esta empresa también ofrece otros tipos de apósitos húmedos que favorecen a su vez la epitelización.



**Figura 1.24.** Apósito Acticoat™ 7 con SILCRYST™ [284]

- La empresa *NanoComposix* (San Diego, California, EE.UU) desarrolla nanopartículas de plata para incorporarlas en apósitos y utensilios clínicos [285]. *Silverlon*®, es una empresa que suministra un gran número de utensilios médicos como catéteres, apósitos y guantes recubiertos con plata [286].
- Se han desarrollado nuevos geles y pomadas de uso tópico con AgNPs, que han demostrado eficacia contra varias especies nosocomiales de bacterias y hongos [287].
- Se investiga el uso de AgNPs incorporadas en quitosan para recubrir telas de poliéster en tratamiento de heridas para, además de favorecer la epitelización de heridas evitar su infección [288]. También se han añadido AgNPs a polietilenglicol [289], a nanofibras de sílice [290] o a fibras de algodón [291], todos ellos como posibles y novedosos agentes en apósitos.



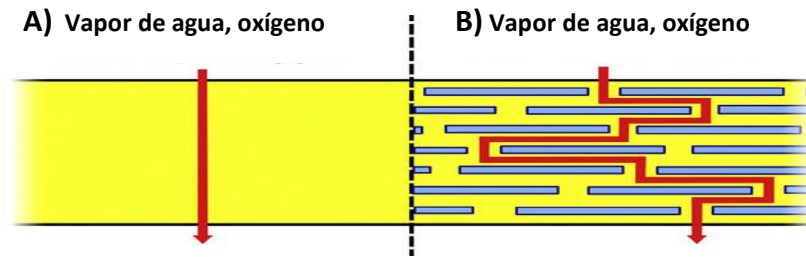
**Figura 1.25.** AgNPs sobre nanofibras de sílice [290]

#### ▪ PRODUCTOS ALIMENTICIOS

La utilización de AgNPs ha sido aplicada a un gran número de materiales, productos y nuevas investigaciones para la conservación y mantenimiento de los alimentos, durante su tratamiento, almacenaje y manipulación.

- Existen resultados satisfactorios, con una reducción de tres unidades logarítmicas de *E.coli*, en el almacenamiento y manipulación de rodajas de melón utilizando materiales de celulosa con AgNPs sintetizadas *in situ* [292]. También se ha observado una buena acción antimicrobiana en hidrogeles sintetizados con alcohol

polivinílico y goma de acacia con AgNPs sintetizadas *in situ* [293], en películas basadas en quitosan y almidón con AgNPs, que además de mostrar un buen poder bactericida frente a *E. coli*, *S. aureus* y *Bacillus cereus*, reducen la difusión de oxígeno a los alimentos (Figura 1.26) que recubren, ralentizando su deterioro [294], y en matrices de nanocomposites basados en celulosa con AgNPs que previenen que se estropeen los alimentos, principalmente zumos y cortes de fruta, pero también carne [295]. Todos estos productos se han diseñado con el fin de mejorar las condiciones higiénicas durante la manipulación y almacenamiento de alimentos.



**Figura 1.26.** Comparación de la difusión de oxígeno y agua **A)** en ausencia de polímero y **B)** en presencia de polímero [296]

- *FresherLonger™ Miracle Food Storage Containers* es una marca de recipientes de almacenamiento de alimentos que están fabricados con AgNPs inmersas en polipropileno que impiden el crecimiento y desarrollo de los microorganismos. Se compararon los recipientes *FresherLonger* y los convencionales en cuanto al desarrollo de bacterias durante 24 horas. En los recipientes *FresherLonger* el crecimiento bacteriano se redujo en más del 98% [297]. *BlueMoonGoods™* es otra empresa que aprovecha las propiedades de las AgNPs en recipientes de almacenamiento de comida que reduce la carga bacteriana en un 99,99% [298].

#### ▪ OTROS USOS

Debido al gran potencial antimicrobiano de las AgNPs, no solo se han usado a nivel médico e industria alimenticia. Existen otros ámbitos industriales que han aprovechado las características biocidas de estas AgNPs.

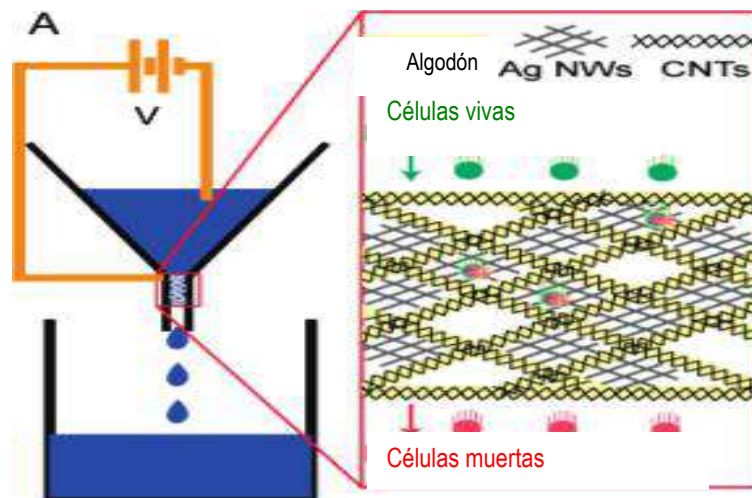
- Se ha demostrado la eficacia de compuesto cerámicos porosos con AgNPs en su superficie y dispersados en disolución coloidal para el tratamiento y potabilización de agua, mostrando una disminución de cinco unidades logarítmicas en *E.coli* [299]. Asimismo, la combinación de ultrasonidos y AgNPs produce una disminución de bacterias en coliformes en agua [300].
- *NanoHorizons, Inc. SmartSilver™* fabrica AgNPs y otros aditivos basados en plata, que se añaden a uretano, nylon y algodón. Estos aditivos, que se añaden a las fibras durante su fabricación, aportan características de antiolor y bactericidas [301, 302]. Se ha demostrado que la ropa con AgNPs en sus fibras reduce al menos 95% la presencia de *E. coli* y *S. aureus* [303, 304].
- Existen filtros domésticos para agua fabricados con carbono y que llevan incluidas AgNPs para evitar la contaminación y ensuciamiento de estos filtros y del agua [305], como es el caso de las jarras *Brita®* y sus filtros que incorporan plata [213].

En resumen, en estos ejemplos se puede observar el potencial de las AgNPs, tanto en productos ya existentes como en presentes y futuras investigaciones.

### 1.4.3 Aplicación de la liberación de plata iónica vía oxidación acelerada mediante combinación con otros productos o acciones

Una vez estudiados los productos basados en plata iónica y metálica, es necesario mejorar e investigar aquellos utensilios fabricados con plata o con algún factor que favorezca la oxidación de la plata. La mayoría de estas combinaciones de productos o acciones con plata están todavía en fase de estudio pero con buenas perspectivas y en auge.

- Se ha observado una reducción superior al 98% en *E.coli* combinando nanohilos de plata, nanotubos de carbono y algodón, favoreciendo eléctricamente la oxidación de los nanohilos de plata para obtener un flujo de iones plata, consiguiendo una purificación ultra-rápida de aguas contaminadas [306]. También se diseñaron catéteres que tenían enrollados helicoidalmente cables de plata que tras aplicar un cambio eléctrico liberaban iones plata para inhibir el crecimiento de bacterias y hongos y así, evitar la migración y colonización de estos por *S. epidermidis* [307]. Asimismo, se fabricaron superficies de plata-paladio donde se aplicó corriente eléctrica para estudiar y demostrar el efecto bactericida sobre bacterias planctónicas o de *biofilm* de la especie *E.coli* [308]. Este mismo sistema se llevó a cabo, pero esta vez, en disolución y en presencia de surfactantes para un posible futuro uso en aplicaciones farmacéuticas y cosméticas, y se demostró que los iones de plata liberados eléctricamente producían una disminución de cuatro unidades logarítmicas en el número de unidades formadoras de colonia por mililitro en Gram-positivas, Gram-negativas y hongos [309, 310]. De hecho, *Samsung*® ha empezado a aprovechar estos métodos y a desarrollar esta tecnología con gran eficacia eliminando un 99,9% de las bacterias que causan el mal olor. Las lavadoras que poseen este sistema incorporan una onza (31 gramos) de plata metálica, que mediante corriente eléctrica genera iones plata que se inyectan durante el lavado y el aclarado [275].



**Figura 1.27.** Esquema de la combinación de algodón (cotton), nanohilos de plata (Ag NWs) y Nanotubos de carbono (CNTs) [306]

- Otra manera de potenciar los efectos de la plata, es combinarla con luz UV, cuyo efecto es mayor que utilizando luz UV sola, aumentando la reducción del virus MS-2 en una unidad logarítmica [311]. Esta acción está basada en la desactivación fotocatalítica de microorganismos empleando un semiconductor y luz UV. Cuando un fotón de energía suficiente (3.2 eV) incide sobre la superficie del semiconductor puede generar un hueco del electrón (EHN) dando lugar a reacciones de oxidación-reducción. De los diferentes radicales generados cabe destacar el radical hidroxilo de alto poder oxidante. El semiconductor más usado es el  $\text{TiO}_2$ , que es un catalizador químicamente muy estable, barato, no tóxico y abundante. La modificación del semiconductor (dopaje con metales como la plata, tratamiento térmico) puede aumentar la eficiencia fotocatalítica de éste. Se han realizado estudios que demuestran una inactivación del 99,9% de bacterias utilizando membranas de nanofibras con AgNPs y  $\text{TiO}_2$  tanto con radiación solar como sin ella con futuras aplicaciones en la industria de purificación de agua [312], utilizando películas de composites con AgNPs y  $\text{TiO}_2$  para la inactivación de *P.aeruginosa* del 100% en 10 minutos [313] y también, materiales mesoporosos como es la anatasa ( $\text{TiO}_2$ ) modificada con AgNPs e irradiadas con luz UV contra *E.coli* con buenos resultados [314, 315]. Todo ello se produce porque, además de el efecto de la fotocatalisis del  $\text{TiO}_2$  que da lugar a especies reactivas de oxígeno, se generan diferentes compuestos de plata altamente bactericidas (plata iónica y óxido de plata) [313]. Debido a este efectivo sistema se han creado empresas como *Nanogist*<sup>®</sup> que suministran productos como detergentes y geles basados en esta tecnología [316] o *Henan Huier Nano Technology Co., Ltd.* que suministra aditivos nanoparticulados, entre ellos de  $\text{TiO}_2$  y plata, para aceites, catalizadores, tratamiento de residuos... [317].

Aunque es ampliamente conocido el efecto bactericida de la plata, aún esta por investigar y mejorar, la forma molecular de aplicar la plata (iónica o metálica), los tamaños y formas de AgNPs, las condiciones de aplicación, su modo de contacto, y sobre todo, la combinación con otros materiales y fenómenos para mejorar y acelerar el efecto antimicrobiano de la plata. En resumen, se ha constatado como necesaria la presencia de iones plata en el medio para producir el efecto bactericida, ya sean liberados desde, moléculas directamente, diferentes matrices o formados por la oxidación de AgNPs. De igual manera también se ha podido observar que la presencia de una adecuada concentración de iones plata o AgNPs en el medio es suficiente para la eliminación de los microbios, sin ser tan importante el contacto directo material-microorganismos.

## 1.5 RESUMEN Y OBJETIVOS

En este trabajo se plantea profundizar en los efectos bactericidas, utilizando la bacteria *S.aureus* como modelo, producidos por materiales nanoestructurados que han incorporado diferentes compuestos antimicrobianos. Por un lado, se analizó la liberación de plata procedente de la ZSM-5 previamente intercambiada con nitrato de plata, así como su poder bactericida. Por otro lado, se sintetizaron AgNPs *in situ*, tanto en la ZSM-5 como en materiales mesoporosos (SBA-15 y MCM-41). Se evaluó el poder

bactericida de estos materiales con AgNPs, y con la combinación de AgNPs con ácido peroxiacético, otro compuesto bactericida, que se encontraba absorbido en los poros de los materiales nanoestructurados. Finalmente se estudió el poder bactericida de nanohilos de plata por si solos y combinados con potencial eléctrico.

Los principales aspectos que se estudiaron fueron:

- La concentración de los iones plata liberados.
- El tiempo de acción de los diferentes materiales para la reducción de la concentración bacteriana.
- El tamaño y adsorción de las AgNPs sintetizadas *in situ*.
- El efecto sinérgico de la plata con el ácido peroxiacético y el potencial eléctrico.
- El mantenimiento del poder bactericida y el almacenamiento de los diferentes materiales evaluados.



## Capítulo 2

### Experimental

- 2.1. MODELO DE BACTERIA. CEPAS
- 2.2 CULTIVOS BACTERIANOS: CARACTERÍSTICAS PREPARACIÓN DE MEDIOS Y TAMPONES
  - 2.2.1 Tampón fosfato salino (PBS)
  - 2.2.2 Medios de cultivo
- 2.3 DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (MIC) Y CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (MBC)
- 2.4 ESTUDIOS DE FORMACIÓN DE *BIOFILM*
- 2.5 ESTUDIOS BACTERICIDAS
- 2.6 ESTUDIOS BACTERICIDAS UTILIZANDO CAMPO ELÉCTRICO PARA ACELERAR LA OXIDACIÓN DE LA PLATA METÁLICA
- 2.7 ESTUDIOS DE DETECCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS) POR PEROXIDACIÓN LIPÍDICA. MALONIL DIALDEHIDO (MDA)
- 2.8 PREPARACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA EL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO (SEM)
- 2.9 PREPARACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA EL MICROSCOPIO ÓPTICO INVERTIDO DE FLUORESCENCIA
- 2.10 SÍNTESIS HIDROTHERMAL DE LOS NANOHILOS DE PLATA



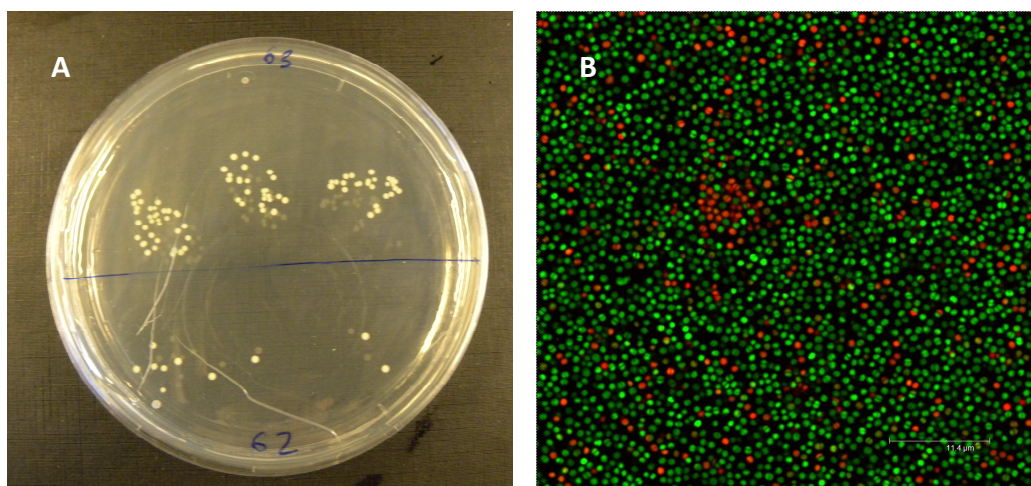
## 2. EXPERIMENTAL

En este capítulo se describen los procesos que se han usado para la síntesis de los diferentes materiales, los modelos biológicos utilizados y los equipos empleados para su caracterización.

### 2.1. MODELO DE BACTERIA. CEPAS

La bacteria que se ha utilizado como modelo en todos los experimentos ha sido el coco Gram positivo *Staphylococcus aureus* cepa 9213 [37]. Esta cepa se caracteriza por ser muy adherente y formadora de *biofilms*.

El *S.aureus* una bacteria facultativa anaerobia que crece mejor bajo condiciones aerobias. Pertenece a la familia *Micrococcaceae*. Es Gram-positiva y puede aparecer sola, en pareja, en cadena corta o en forma de racimo.



**Figura 2.1.** A) Colonias de *S. aureus*. B) *S.aureus* observado mediante microscopia confocal. En rojo bacterias muertas, en verde bacterias vivas. Se utilizó el kit LIVE/DEAD®, BacLight™ L7012, Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, Invitrogen Detection Technologies), que basa su acción en dos componentes: el SYTO®9 y el yoduro de propidio. El primero emite fluorescencia verde y el segundo fluorescencia roja. El componente SYTO®9 marca a todas las bacterias con fluorescencia verde, tanto a las metabólicamente activas como a las inactivas con las membranas dañadas. Cuando se combina con el yoduro de propidio, este solo penetra en las bacterias que han sufrido daño en la membrana, reduciendo la acción del fluorocromo SYTO®9 y por tanto, estas bacterias pasan a emitir en longitudes de onda correspondiente al rojo. De esta manera, solamente las bacterias que están dañadas, son visualizadas en rojo, mientras que las bacterias activas en verde

Se caracteriza por no poseer ni cilios ni flagelos, por lo que es inmóvil y no forma esporas. Es catalasa y coagulasa positiva. Las colonias miden de 1 a 3 mm y tienen un color amarillo dorado debido a la presencia de carotenoides [318].

Un 40 % de la población humana es portadora de esta bacteria, sin que cause ninguna enfermedad. Es un microorganismo con un gran número de cepas, como la cepa *S. aureus* 9213 que es capaz de agregarse y formar *biofilm* [319]. También se ha demostrado que dicha cepa es resistente a antibióticos cuando forma el citado *biofilm*. Es la causa de una amplia variedad de enfermedades infecciosas en seres humanos, convirtiéndose en un grave problema de salud en la sociedad. Uno de los principales daños que ocasiona esta cepa, es la osteomielitis. Este *biofilm* presente en la prótesis, llega a conquistar el hueso y el tejido de alrededor, produciendo una infección que se cronifica, debido al bajo o nulo efecto de los antibióticos sobre las bacterias resistentes a este *biofilm* [320].

## 2.2 CULTIVOS BACTERIANOS: CARACTERÍSTICAS PREPARACIÓN DE MEDIOS Y TAMPONES

### 2.2.1 Tampón fosfato salino (PBS)

Las diluciones que se han realizado en todos los protocolos que se describen más adelante se realizan en PBS (*Phosphate Buffer Saline*) que tiene la siguiente composición:

En 800 mL de agua se añaden las siguientes cantidades:

- 8 g Cloruro sódico (Panreac®)
- 0,2 g Cloruro potásico (Riedel de Haën®)
- 1,44 g Disodio hidrógeno fosfato (Panreac®)
- 0,24 g Potasio dihidrógeno fosfato (Panreac®)

Seguidamente se ajusta el pH a 7,4 ( $\pm 0,02$ ), con ácido clorhídrico 37% (Panreac®) con el pHmetro (Eutech Instruments), y finalmente se afora la disolución con agua destilada hasta llegar a 1 L.

### 2.2.2 Medios de cultivo

Para realizar los cultivos líquidos en los ensayos bactericidas se han utilizado los siguientes medios de cultivo:

- Tryptone Soy Broth (TSB, Cultimed®, Panreac®). Es un medio líquido artificial no selectivo utilizado para el cultivo de una amplia variedad de microorganismos exigentes y no exigentes. El medio tiene la composición que se detalla en la Tabla 2.1.

Su preparación viene indicada por el fabricante: 30 g del medio deshidratado en 1L de agua destilada. Se calienta ligeramente hasta total disolución y se esteriliza en autoclave (Trade Raypa® Steam Sterilizer) a 121°C durante 20 minutos [321].

**Tabla 2.1.** Composición del medio nutritivo TSB

Sustancia	Cantidad (g/L)
Peptona de Soja	3,0
D(+)-Glucosa	2,5
Peptona de Caseína	17,0
di-Potasio Hidrógeno Fosfato	2,5
Cloruro de sodio	5,0
pH	7,3 ± 0,2

Los digeridos enzimáticos de soja proporcionan aminoácidos y otras sustancias nitrogenadas complejas. La glucosa es una fuente de energía, el cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico y el fosfato potásico dibásico actúa como tampón para controlar el pH.

Este medio ha sido utilizado para la obtención de los cultivos estacionarios y para hacer las diluciones para la obtención de cultivos en fase exponencial.

- Mueller-Hinton (M-H, Scharlau®). Es un medio general no selectivo para bacterias. Su preparación también viene indicada por el fabricante. El caldo Mueller-Hinton es el más utilizado en la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria y Bactericida (MIC y MBC, respectivamente) por diluciones seriadas. Su principal característica es que las concentraciones de timina, timidina y ácido 4-aminobenzoico, son lo suficientemente bajas para no inhibir la actividad antibacteriana de antibióticos y sulfamidas que se ensayan [321]. Su composición se indica en la tabla siguiente:

**Tabla 2.2.** Composición del medio nutritivo MH

Sustancia	Cantidad (g/L)
Almidón	1,5
Infusión de carne	2
Digerido pancreático de caseína	17,5
pH	7,4 ± 0,2

Para realizar los ensayos de liberación de plata procedentes de los materiales se han utilizado dos tipos de medios de cultivo, uno para bacterias y otro para levaduras.

- Tryptone Soy Broth (TSB). Anteriormente Descrito.
- Yeast Nitrogen Base w/o aminoacids (YNB, Difco™, Dickinson and Company). Se disuelven 6,7 g de YNB en 100 mL de agua destilada para obtener una solución 10x. Seguidamente, se le añade L-Leucina (fuente no animal, Sigma-Aldrich®), L-Histidina (fuente no animal, Sigma-Aldrich®) y D-Glucosa anhidra (Panreac®). Finalmente, se esteriliza y se diluye con agua destilada estéril hasta 500 mL para conseguir una concentración 2X. La composición se detalla en la tabla siguiente:

**Tabla 2.3.** Composición del medio nutritivo YNB 10x

Sustancia	Cantidad (g/L)
D(+)-Glucosa	5,4
Vitaminas esenciales	No indicada
Sales	No indicada
L-Leucina	0,65
L-Histidina	0,14
pH	6,5-7

Para realizar el recuento en placa, se han usado placas Petri estériles (Deltalab®Eurotubo) con el siguiente medio de cultivo agar:

- Tryptone Soy Agar (TSA, Cultimed®). Por el contenido de peptona de soja y peptona de caseína resulta una aportación nutritiva que permite el desarrollo óptimo de un gran número de microorganismos. Se prepara tal y como indica el fabricante, resuspendiendo 40 g del medio deshidratado en 1 L de agua destilada y calentando ligeramente hasta disolución total [321]. Se esteriliza a 121 °C durante 20 minutos.

**Tabla 2.4.** Composición del medio nutritivo TSA

Sustancia	Cantidad (g/L)
Digerido pancreático de soja	5
Digerido pancreático de caseína	15
Cloruro sódico	5
Agar	15
pH	7,3 ± 0,2

### 2.3 DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (MIC) Y CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (MBC)

MIC y MBC son los principales parámetros farmacocinéticos para determinar la actividad de un determinado agente antimicrobiano frente a un determinado patógeno. MIC se define como la concentración de agente antimicrobiano menor que inhibe *in vitro* el crecimiento de un determinado organismo infeccioso y la MBC se define como la menor concentración de agente antimicrobiano que se necesita *in vitro* para eliminar el 99,99% del inóculo inicial del organismo.

Para ello se eligieron dos antibióticos comúnmente usados a nivel hospitalario como son la Cefazolina® y la Cefuroxima®, ambas del grupo de las cefalosporinas de primera y segunda generación respectivamente, y otro de nueva generación como es la oxazolidinona Linezolid®. El mecanismo de actuación de estos antibióticos se describe en el Apéndice.

Los ensayos realizados están basados en las recomendaciones del *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) usando el método de microdiluciones o también llamado método de las diluciones decimales.

El protocolo se realiza en placas *microtiter* de 96 pocillos (8 filas x 12 columnas). Se hacen 12 diluciones 1:2 de los antibióticos desde 512 µg antibiótico/mL hasta 0,25 µg antibiótico/mL. Las diluciones se llevan a cabo en 100 µL de medio cultivo Mueller-Hinton. Se realizan dos réplicas de cada antibiótico (2 filas) y dos controles (agua destilada). Una vez realizadas estas diluciones se añade a cada pocillo 100 µL de una concentración de *S.aureus* de  $5 \times 10^5$  CFU/mL. La placa microtiter se deja en la estufa (JP Selecta®) a 37°C en incubación toda la noche.

El día siguiente el primer pocillo correspondiente a la menor concentración de cada antibiótico que esté claro (sin turbidez que indique crecimiento) corresponderá a la concentración MIC. Para determinar la MBC se siembra una gota de 50 µL en placas de TSA de todos los pocillos que no están turbios y por tanto no ha habido crecimiento y se dejan toda la noche en incubación a 37°C. La MBC corresponderá a la placa procedente del pocillo de menor concentración de cada antibiótico en el que no ha habido crecimiento.

## 2.4 ESTUDIOS DE FORMACIÓN DE BIOFILM

Para estudiar la formación de *biofilm* sobre distintos materiales se ha llevado a cabo el siguiente protocolo [320]:

En tubos previamente esterilizados se añaden 2mL de medio de cultivo TSB y 50 µL de un cultivo estacionario de 18-20h de *S.aureus* con una concentración  $10^9$  UFC/mL.

Estos tubos contienen las piezas o materiales que se desean probar para comprobar si se forma *biofilm* en su superficie. Estos materiales han sido previamente esterilizados, bien en autoclave o bien con vapores de etanol si estos materiales contienen algún elemento sensible a la temperatura y humedad como se ha mencionado anteriormente. Se hacen dos o tres réplicas por tiempo y por material.

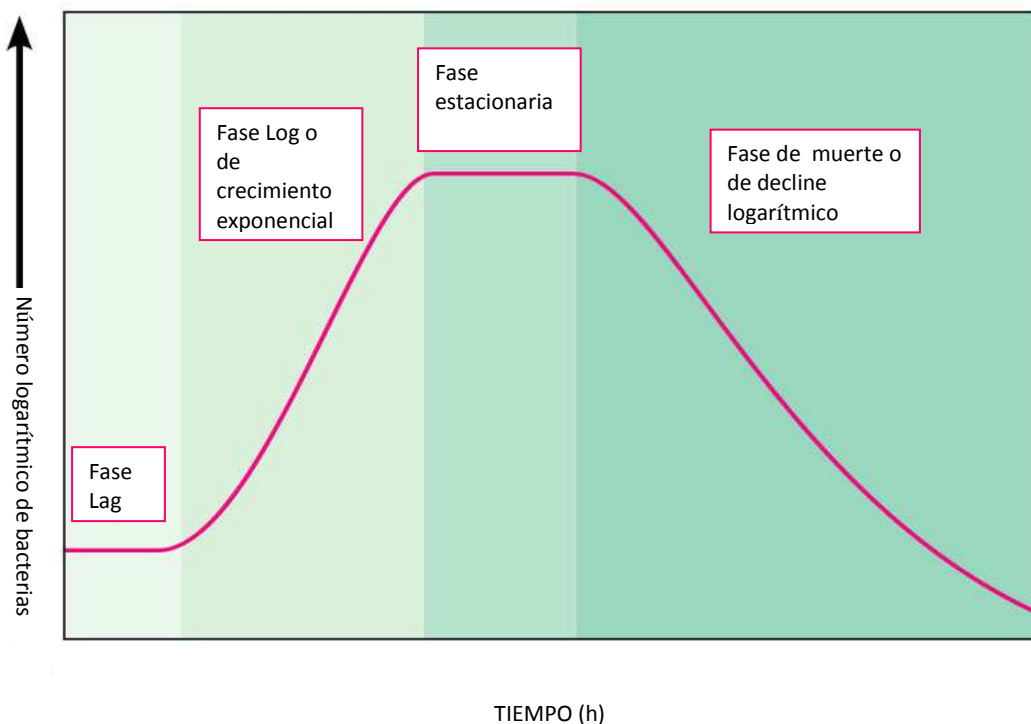
La formación de *biofilm* se ha estudiado a 1, 2, 12, 24 y 48 horas a 37°C. Cada 12 horas para los estudios de 24 y 48 horas se renueva el medio de cultivo. A los tiempos indicados los materiales estudiados se recuperan en condiciones de esterilidad y se lavan con PBS para eliminar aquellas bacterias que no se han unido y por tanto no forman parte del *biofilm*. Seguidamente, los materiales se sumergen en 2 mL de PBS y se les aplica ultrasonidos en un baño (JP Selecta) a 40 Hz durante 15 minutos para los tiempos de 1, 2 y 12 horas, y durante 30 minutos para los estudios de 24 y 48 horas. De esta manera se consigue la disgregación del *biofilm* de los soportes estudiados para después realizar el recuento en placa. Para ello se realizan siete diluciones 1:10 en PBS y se siembran tres gotas de 25 µL en placas de TSA, que posteriormente se dejan incubando toda la noche a 37°C.

## 2.5 ESTUDIOS BACTERICIDAS

Para comprobar las propiedades bactericidas de los materiales se ha llevado a cabo el siguiente protocolo [37]:

En tubos previamente esterilizados, se añaden aquellos materiales en los que se quieren ensayar sus propiedades bactericidas. Normalmente se evaluaron 60 mg de material en 2 mL de medio de cultivo bacteriano, pero hubo materiales en los que fue necesario analizar otras concentraciones. Estos materiales, al igual que en el apartado anterior, se esterilizan o en autoclave o con vapores de etanol si los materiales que se desean analizar son sensibles a la temperatura o a la humedad. Seguidamente se añaden 2 mL de un cultivo estacionario de *S.aureus* con una concentración aproximada de  $10^9$  UFC/mL. Se realizan estudios a 4, 6 y 24 horas, haciendo dos o tres réplicas por material, según la cantidad de que se dispusiera de los diferentes materiales, y por tiempo. A los tiempos determinados se disgregan los materiales y los organismos mediante ultrasonidos a 40 Hz durante 15 minutos para los estudios de 4 y 6 horas, y durante 30 minutos para los estudios de 24 horas. Posteriormente, se realizan siete diluciones 1:10 en PBS y se siembran tres gotas de 25  $\mu$ L en placas de TSA y se dejan incubando durante toda la noche a 37°C.

Se eligió esta concentración de cultivo estacionario porque es en la que mayor concentración de microorganismos viables hay. Por otro lado al ser una cepa formadora de *biofilm*, es esta fase en la que el *biofilm* es más estable [322]. Además, en esta fase el metabolismo cambia respecto a la fase exponencial y se produce una acumulación y liberación de metabolitos secundarios, que en muchos casos, les sirven de protección. Los microorganismos entran en fase estacionaria porque se agota algún nutriente esencial del medio, o porque los productos de desecho que han liberado durante la fase exponencial hacen que el medio sea inhóspito para el crecimiento microbiano. Finalmente se eligió trabajar con la fase estacionaria porque tiene gran importancia, ya que probablemente represente con mayor fidelidad el estado metabólico real de los microorganismos en los ambientes naturales [323].



**Figura 2.2.** Cinética de crecimiento bacteriano [324]

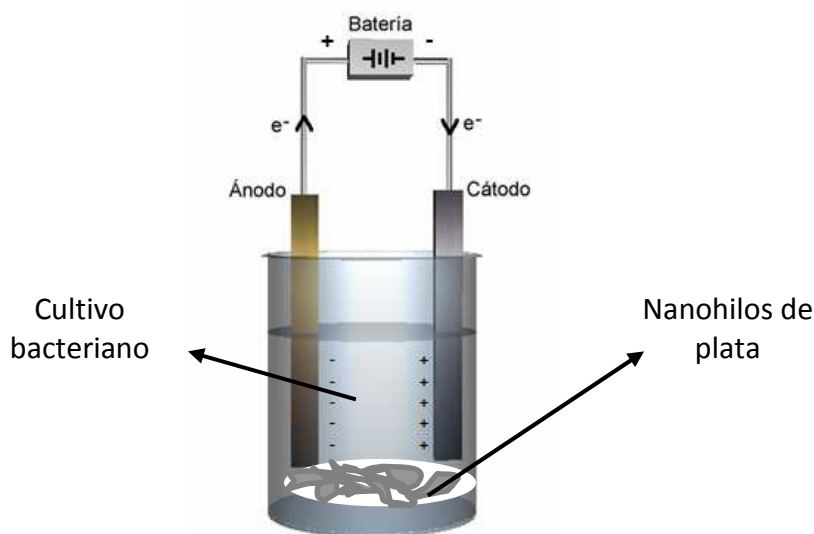
Como desventaja se podría decir que en ella no se incrementa el número de bacterias, ni la masa ni otros parámetros del cultivo. Por ello se decidió hacer también algunos estudios con una concentración bacteriana de  $10^5$  CFU/mL, es decir, en fase exponencial donde las bacterias se están multiplicando rápidamente.

## 2.6 ESTUDIOS BACTERICIDAS UTILIZANDO CAMPO ELÉCTRICO PARA ACELERAR LA OXIDACIÓN DE LA PLATA METÁLICA

El proceso que tiene lugar en estos experimentos, es el de reducción-oxidación no espontáneo, sino inducido por una corriente eléctrica continua que favorece y facilita la consecución de aquellas reacciones de potencial inferior a cero, y por tanto no espontáneas. En este proceso se basan también, las celdas voltaicas y algunos equipos comerciales como las lavadoras Samsung® [275] y otros equipos que utilizan corriente eléctrica para liberar plata iónica como se ha descrito en la introducción.

Una reacción redox es aquella en la que uno de los compuestos se reduce y el otro se oxida. El reactivo que se oxida está perdiendo electrones que capta el que se reduce.

En este trabajo la oxidación se consigue mediante la aplicación de un potencial eléctrico. Los electrodos, atraen a los iones de carga opuesta y se produce la transferencia electrónica entre ambos. La oxidación y la reducción tienen lugar en el ánodo y en el cátodo respectivamente.

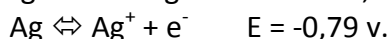
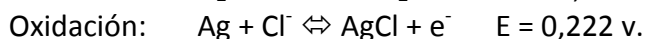


**Figura 2.3.** Esquema de la reducción-oxidación. La colocación de los nanohilos se realiza lo más cercana posible a los electrodos para facilitar el paso de la corriente eléctrica. Como se explicará en el capítulo 4, los nanohilos pueden estar autosoportados en filtros de celulosa, inmersos en espuma de carbón vítreo o incorporados directamente al cultivo bacteriano

El objetivo en este trabajo era determinar las propiedades bactericidas de los nanohilos de plata en presencia y ausencia de campo eléctrico. Cuando se lleva a cabo el proceso bajo campo eléctrico se favorece la oxidación de los nanohilos de plata



metálica, que en otras condiciones es muy lento. De esta forma, se produce la oxidación de la plata en el ánodo. Además, el ión cloruro, aun en muy pequeñas concentraciones (ppm) del agua destilada, ya es capaz de producir un enlace iónico con la  $\text{Ag}^+$  formando un precipitado de  $\text{AgCl}$  [308]. Por otro lado, en el cátodo tiene lugar la reducción del hidrógeno. Las reacciones que se dan son las siguientes:



El sistema experimental en el que se realizó la electrólisis está formado por dos electrodos inertes de grafito. Los electrodos están situados en un vaso de precipitados e inmersos en cultivo estacionario realizado en medio de cultivo líquido (TSB), que es una solución conductora iónica (ver composición en el apartado 2.2.2).

Además de las reacciones mencionadas anteriormente el proceso de electrólisis en un cultivo estacionario desarrollado en medio de cultivo líquido (TSB) también tiene como resultado la formación de cloro e hidrógeno en el cátodo y en el ánodo respectivamente. Las reacciones que se llevan a cabo son las siguientes:



Los electrodos de grafito estaban conectados a una fuente de corriente continua (HQ Power®, Alimentador Multitensión modelo 2A). Además, estaban inmersos en 5 mL de un cultivo estacionario de la bacteria modelo con los materiales a evaluar. Todo ello, al igual que en los estudios realizados anteriormente, se llevó a cabo en condiciones de esterilidad.

En primer lugar, se evaluaron las condiciones bajo las cuales la propia corriente eléctrica no producía efecto biocida alguno. Para ello, se probaron 3 voltajes 6 V, 9 V y 12 V, durante 10, 20 y 30 minutos, y durante 30 minutos dejando actuar sin voltaje durante 24 horas a 37°C. Se hicieron dos réplicas por tiempo, voltaje y material. A continuación, se pasaron por ultrasonidos aquellas muestras que estuvieron 24 horas incubando para disgregar el posible *biofilm* formado. Seguidamente, se realizaron siete diluciones 1:10 en PBS y se sembraron 3 gotas de 25  $\mu\text{L}$  en placas de TSA y se dejaron incubar toda la noche a 37°C, para al día siguiente contar las unidades formadoras de colonias que habían crecido.

## 2.7 ESTUDIOS DE DETECCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS) POR PEROXIDACIÓN LIPÍDICA. MALONIL DIALDEHIDO (MDA)

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son moléculas extremadamente reactivas, y que se forman durante el consumo y metabolismo del oxígeno. El ión hidroxilo, y el superóxido serían dos ejemplos de ROS. Los ROS son peligrosos porque pueden afectar a la estructura y función de las macromoléculas como las proteínas, ADN o lípidos. Si estos componentes son alterados de manera prolongada en el tiempo, se produce la muerte celular. Muchos microorganismos, en condiciones normales, son capaces de



eliminar la reactividad de estas moléculas mediante enzimas como la Superóxido Dismutasa (SOD) [325].

El aumento en la producción de ROS en el interior de las células, está relacionada con la adición externa de tóxicos o agentes oxidantes [326]. Los materiales evaluados en este trabajo, tenían una potencial toxicidad y se decidió comprobar si se producía un aumento de ROS. En condiciones ambientales óptimas, los seres vivos generan una concentración constitutiva y basal de ROS, aunque los antioxidantes naturales presentes en las células son capaces de eliminarlos. Sin embargo, algunas condiciones ambientales adversas al organismo, causan un exceso de ROS, ya que conducen al desequilibrio entre producción y degradación de ROS. Este proceso se conoce como estrés oxidativo [327].

Una de las reacciones más destacadas que producen los ROS, es la peroxidación de lípidos de la membrana [325], dando lugar al malonil dialdehído (MDA) que es un producto secundario final proveniente de la oxidación de los ácidos grasos polinsaturados y se considera un índice característico indicador de la peroxidación lipídica. El MDA actúa como mutágeno endógeno y se forma a través de la auto-oxidación y degradación enzimática de los ácidos grasos polinsaturados en las células. Sinnhuber en 1958 [328]; Heath y Packer en 1968 [329]; Pelle en 1990 [330]; Du y Bramlage en 1992 [331] y DeLong y Steffen en 1997 [332] ya utilizaron la reacción del MDA con dos moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) como medida de la peroxidación lipídica y por tanto, la presencia de ROS en las células. La reacción de MDA con TBA produce un cromógeno rojizo con una absorbancia máxima a 532 nm [333] y por tanto medible y cuantificable con un espectrofotómetro.

Las siguientes disoluciones son necesarias para llevar a cabo la determinación espectrofotométrica del MDA [333]:

1) Disolución de TBA<sup>+</sup>, la cual se almacena en condiciones de oscuridad a 4°C y en agitación. Está constituida por 20 g de ácido tricloroacético (Sigma-Aldrich®), 0,01 g de hidroxitolueno butilado (SAFC®) y 0,65 g de ácido tiobarbitúrico (Sigma-Aldrich®). Todo ello aforado a 100 mL con agua MilliQ®. Esta disolución se denominó “Disolución TBA<sup>+</sup>” por contener ácido tiobarbitúrico.

2) Disolución de TBA<sup>-</sup>, la cual se almacena en frío. Se prepara con 20 g de ácido tricloroacético y 0,01 g de hidroxitolueno butilado y se afora a 100 mL con agua MilliQ®. Esta disolución se denominó “Disolución TBA<sup>-</sup>” por no contener ácido tiobarbitúrico.

3) Además es necesario utilizar Etanol al 80 % (v/v).

4) A continuación se ponen en contacto 300 mg de los materiales que se desean evaluar con 10 mL de un cultivo estacionario de *S.aureus* y se deja incubar una noche.

5) Al día siguiente, se centrifugan a 10000 rpm durante 10 minutos en la centrífuga (Jouan® B4i), eliminando el sobrenadante y resuspendiendo el pellet obtenido en 1 mL de Etanol 80 %. Para hacer la extracción se someten las muestras a sonicación en frío con un dedo sonicador (Branson® Sonifier Digital 250) en dos ciclos de 30 segundos y 15 segundos con un intervalo de vórtex de 1 minuto. También se realiza una homogenización antes y después de sonicar. Se realizan tres extracciones de esta misma manera.

6) Seguidamente, se prepara el blanco, utilizando Etanol 80 % y las muestras para ser medidas en el espectrofotómetro (Agilent® 8453) a 440 nm, 530 nm y 600 nm. Para el blanco se necesitan 2 mL de Etanol 80 % y 2 mL de TBA<sup>+</sup> y TBA<sup>-</sup>, y para las muestras 1

mL del resultado obtenido de las tres extracciones (extracto) y 1 mL de TBA<sup>+</sup> y TBA<sup>-</sup>, de tal forma que se utiliza un blanco de TBA<sup>+</sup> y otro de TBA<sup>-</sup>, y de cada muestra, una con TBA<sup>+</sup> y otra con TBA<sup>-</sup>.

7) A continuación, se incuban las muestras tapadas durante 25 minutos a 95°C en la estufa (Memmert®) y después se dejan enfriar en la cámara fría durante 10 minutos.

8) Terminado el proceso de extracción y obtenidas las rectas de calibración correspondientes las muestras fueron analizadas mediante espectrofotometría.

La determinación de los equivalentes de Malonil Dialdehido en nmol/mL, se llevó a cabo utilizando las siguientes ecuaciones:

$$A = [(Absorbancia\ 532\ TBA^+) - (Absorbancia\ 600\ TBA^+) - (Absorbancia\ 532\ TBA^-) - (Absorbancia\ 600\ TBA^-)]$$

$$B = [(Absorbancia\ 440\ TBA^+) - (Absorbancia\ TBA^+) \times 0,0571]$$

$$\text{Equivalentes MDA (nmol/L)} = (A - B / 157000) \times 10^6$$

## 2.8 PREPARACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA EL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO (SEM)

Para poder visualizar muestras en el SEM es necesario fijar y deshidratar las muestras biológicas sin perder su morfología estructural, ya que al hacerse vacío en el interior del microscopio las muestras colapsarían por pérdida del agua contenida en ellas y no sería posible la observación de su morfología. Se han visualizado tanto muestras de bacterias en suspensión que estaban en contacto con los materiales de interés como muestras fijadas como *biofilm* en la superficie de estos mismos materiales.

El protocolo de fijación seguido para las muestras en suspensión y para el material biológico soportado sobre el material inorgánico se ha llevado a cabo en viales de 1,5 mL. Para muestras que son piezas o que son fácilmente manipulables con pinzas se ha realizado en placas *microtiter* de 12 pocillos.

En el caso de las muestras tratadas en viales de 1,5 mL, la eliminación de los componentes, es decir, el medio de cultivo y el metanol y el tampón de glutaraldehído utilizados en la fijación y deshidratación de la muestra, se realiza por centrifugación a 8000 rpm durante 5 minutos. Para las muestras sólidas, la eliminación de los componentes nombrados anteriormente, se lleva a cabo cambiando la pieza de un pocillo a otro mediante pinzas previamente esterilizadas en autoclave.

Lo primero que se ha de realizar en este protocolo es fijar la muestra con tampón de cacodilato de sodio con 2.5 % en peso de glutaraldehído 50 % en peso en agua y 0,1 M en sacarosa. Se añade 1 mL de este tampón a un pocillo de la placa *microtiter* donde están las muestras sólidas ó/y 1 mL al pellet de bacterias o bacterias-material polvo, en las que se ha desechado el sobrenadante. Se deja 1 hora y 30 minutos a 37°C.

Para preparar el tampón se disuelven 320 mg de Cacodilato de sodio trihidratado (Sigma-Aldrich®) en 20 mL de agua destilada. Seguidamente a 19 mL de esta disolución se añade 1 mL de glutaraldehído 50% en peso en agua (Sigma-Aldrich®), y 60 mg de Sacarosa (Sigma-Aldrich®).

Posteriormente es necesario hacer gradientes de deshidratación a temperatura ambiente de la siguiente manera:

- Metanol (Sigma-Aldrich®) 30% (v/v) 5 minutos (2 veces)
- Metanol 50% (v/v) 5 minutos (2 veces)
- Metanol 70% (v/v) 5 minutos (2 veces)
- Metanol 100% (v/v) 10 minutos (2 veces)
- Metanol (Sigma-Aldrich®) 100% anhidro (v/v) 5 minutos (2 veces)

Finalmente las muestras se guardan en la nevera hasta su visualización al microscopio electrónico. Con esta deshidratación progresiva se trata de preservar la morfología de las células para que se aproxime en mayor medida a su estructura real en condiciones fisiológicas.

## 2.9 PREPARACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA EL MICROSCOPIO ÓPTICO INVERTIDO DE FLUORESCENCIA

El microscopio de fluorescencia nos ha permitido visualizar el comportamiento del exopolisacárido que forma el *biofilm* en presencia y ausencia del ácido peroxiacético 36-40 % en peso estabilizado en ácido acético (PAA) (Sigma-Aldrich®).

Para ello se llevaron a cabo dos tipos de pruebas. La primera para ver como el PAA inhibió la formación del *biofilm* en un portaobjetos, y la segunda para determinar como el PAA elimina el *biofilm* formado sobre otro portaobjetos. Se eligió como soporte un portaobjetos de vidrio por diferentes motivos: Entre ellos, es una superficie lisa y fácilmente manipulable. Esta demostrado que esta cepa es capaz de formar *biofilm* sobre vidrio [320, 334]. Y por último, la muestra ha de ser vista en un microscopio, por lo que se facilita el manejo de la muestra trabajando directamente sobre dicho portaobjetos.

La primera prueba se llevó a cabo de la siguiente manera: Se obtuvo un cultivo estacionario de 20 horas al cual se añadieron 40 mL a un recipiente Pirex® de 100 mL previamente esterilizado, con un portaobjetos estéril en su interior y 40 mL a otro recipiente Pirex® de 100 mL que también contenía otro portaobjetos estéril. A un recipiente Pirex® se le añadió 90 µL de PBS y al otro 90 µL de PAA. Estos 90 µL de PAA corresponden a la proporción de PAA que está contenido en la zeolita (medido mediante termogravimetría) que se añade a los 2 mL de cultivo estacionario para hacer los ensayos bactericidas. Pasadas 3 horas se sacaron los portaobjetos de ambos recipientes Pirex® y se lavaron con 1 mL de PBS, para eliminar aquellas bacterias no adheridas y por tanto que no formaban parte del *biofilm*. Seguidamente se añadió el reactivo para la visualización posterior del *biofilm*, que es 1 mL de *Calcofluor White Stain* (Sigma-Aldrich®) y 1 mL de KOH, (Panreac®) 10%. Se dejó actuar durante un minuto y se retiró el exceso de reactivo con papel. A continuación se guardó en oscuridad para seguidamente ver las muestras al microscopio. Es importante recalcar, que tanto la muestra control (con PBS) como la muestra problema (con PAA) fueron tratadas de la misma manera y con los mismos tiempos.

La segunda prueba consistió en inocular una colonia en dos recipientes Pirex® de 100 mL con 40 mL de TSB, ambos con un portaobjetos estéril dentro. Los dos recipientes se

incubaron a 37°C durante una noche para permitir la formación del *biofilm* en la superficie del portaobjetos. Al día siguiente se sacaron los portaobjetos y uno se lavó con 10 mL de PBS y otro con 10 mL de una dilución que contenía 40 mL de PBS y 90 µL de PAA. Como se ha comentado anteriormente esta cantidad de PAA añadida es la proporción de PAA que hay adsorbida en los microporos de los 60 mg de zeolita que se añade a los 2 mL de cultivo estacionario para hacer los ensayos bactericidas. Seguidamente, se trataron y se guardaron las muestras de la misma manera que se ha comentado anteriormente.

El microscopio usado para visualizar las muestras fue un microscopio óptico invertido de fluorescencia. NIKON® ECLIPSE TE2000-S, y se utilizó el filtro azul para visualizar y obtener las fotografías. Para poder examinar la muestra hace falta aplicarle luz UV, y para ello se usó la lámpara UV NIKON® *Super high pressure mercury lamp. Power supply*. Modelo C-SHG1.

Las fotografías fueron tomadas con una cámara monocromática acoplada al microscopio. La cámara utilizada fue de la marca NIKON®, modelo TE-PSE30 con un controlador Hamamatsu® Orca-er, modelo CA742-80-12AG. El programa usado para capturar y visualizar las imágenes en el ordenador fue el Nis-Elements® D.2.30. Al ser una cámara monocromática las fotografías fueron obtenidas en escala de grises, por lo tanto para dar color azul a las muestra, color que se observaba por los oculares, se utilizó, el programa Adobe Photoshop®, tratando a todas las fotografías comparadas de muestras control y muestras problemas de la misma manera, es decir, con los mismos niveles de colores, sombras, luces e intensidades. Para poder cuantificar la intensidad de cada fotografía comparada, se realizó un gráfico longitud de la fotografía frente a la intensidad media de los píxeles en la dirección vertical, mediante el programa ImageJ® (National Institutes of Health).

## 2.10 SÍNTESIS HIDROTHERMAL DE LOS NANOHILOS DE PLATA

La síntesis hidrotermal de los nanohilos de plata se llevó a cabo en un autoclave como el que aparece representado en la Figura 2.4, el cual fue diseñado y fabricado por el grupo de trabajo por el Servicio de Mecánica de Precisión del Centro Politécnico Superior de la Universidad de Zaragoza.



**Figura 2.4.** A) Componentes de la autoclave. B) Esquema de la autoclave

Se observa en dicha figura que el autoclave, consta de una estructura de acero inoxidable y un cuerpo interno extraíble de teflón. La estructura de acero inoxidable está formada por un disco base, un cuerpo de acero, un disco de rotura, dos piezas de sellado separadas por un muelle y una tapa roscada. En su interior se sitúa el cuerpo de teflón de 43 cm<sup>3</sup> de capacidad, formado por un cilindro y una tapa. El sistema permite soportar una presión máxima de 1200 kPa.

## Capítulo 3

### Plata iónica

#### **3.1 ZEOLITAS**

**3.1.1 Zeolitas: ZSM5 intercambiada con plata**

**3.1.2 Pastillas de ZSM5**

**3.1.3 Zeolitas comerciales con plata**

**3.1.4 Caracterización de las zeolitas con plata**

**3.1.5 Ensayos biológicos**

#### **3.2 ÓXIDO DE PLATA**

**3.2.1 Procedencia del óxido de plata**

**3.2.2 Caracterización**

**3.2.3 Ensayos biológicos**

#### **RESUMEN DEL PODER BACTERICIDA DE LOS MATERIALES CON PLATA IÓNICA USADOS**

### 3. PLATA IÓNICA

En este capítulo se muestran los procedimientos, síntesis, ensayos bactericidas y resultados que involucran a los materiales utilizados en este trabajo que poseen y liberan plata en forma iónica.

#### 3.1 ZEOLITAS

##### 3.1.1 Zeolitas: ZSM5 intercambiada con plata

El material objeto de estudio fue la zeolita ZSM5. Esta zeolita se obtuvo comercialmente en forma de  $\text{NH}_4\text{-ZSM5}$  (Zeolyst™). De acuerdo con los datos aportados por el fabricante, se caracteriza por tener una relación molar  $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$  de 30 y una superficie específica de  $400 \text{ m}^2/\text{g}$ .

Para poder intercambiarla con el nitrato de plata y así obtener la ZSM5 intercambiada con plata (Ag-ZSM5) fue necesario pasar de la forma amónica de la ZSM5 ( $\text{NH}_4\text{-ZSM5}$ ) a la forma protónica (H-ZSM5). Para ello se calcinó en una mufla (modelo PR 1000, Hoberal®, Barcelona, España) a  $550^\circ\text{C}$  durante 8 horas, con una rampa de ascenso de temperaturas de  $1^\circ\text{C}$  por minuto. De esta manera se obtuvo la H-ZSM5 y así se pudo intercambiar ésta con el nitrato de plata. Para ello se añadieron 3 g de H-ZSM5 y 12 mL de nitrato de plata solución estándar para absorción atómica 1% en peso ( $\text{HNO}_3$ ) de 1000 ppm (Sigma-Aldrich®). El intercambio se hizo durante 24 horas a temperatura ambiente y en oscuridad en una placa de agitación magnética (Stuart®). Una vez llevado a cabo dicho intercambio se filtró por gravedad con papel de filtro y al día siguiente se recogió el polvo obtenido una vez seco en viales cerrados y conservados en ausencia de luz, denominándolo Ag-ZSM5 [111].

##### 3.1.2 Pastillas de ZSM5

Para poder demostrar si las bacterias formaban *biofilm* sobre la ZSM5 de una manera natural, se prepararon unas pastillas de 13 mm de diámetro. Para ello, se hicieron pastillas con una masa total de 150 mg las cuales llevaban un 12% en peso de un polímero ligante (fluoruro de polivinilideno (Sigma-Aldrich® Saint Louis, MO, USA) para dar cohesión a la pastilla y evitar que se deshiciera en contacto con el cultivo estacionario. Se mezclaron 132 mg de ZSM5 y 18 mg de fluoruro de polivinilideno en presencia de acetona. Una vez evaporada la acetona, se realizaron las pastillas en una prensa del laboratorio (Lightpath; Optical (UK) Ltd.) con una presión de 12 Ton durante 1 minuto.

En contrapartida, se observó que la presencia de esta sustancia ligante facilitaba la formación de *biofilm*. Por otro lado, el ligante no quedó uniformemente repartido por la pastilla, por lo que los estudios de formación de *biofilm* no fueron reproducibles. Como se pudo observar, al ser el fenómeno de producción de *biofilm* un fenómeno de superficies, era crítico el cuantificar y homogeneizar la cantidad de ligante expuesto en superficie comparada con la cantidad de zeolita presente en la misma. Se pudo observar mediante SEM que la dispersión del ligante, pese a utilizarse intensa agitación

durante la preparación de la dispersión, no era homogénea por lo que la adhesión bacteriana tampoco lo era.

### 3.1.3 Zeolitas comerciales con plata

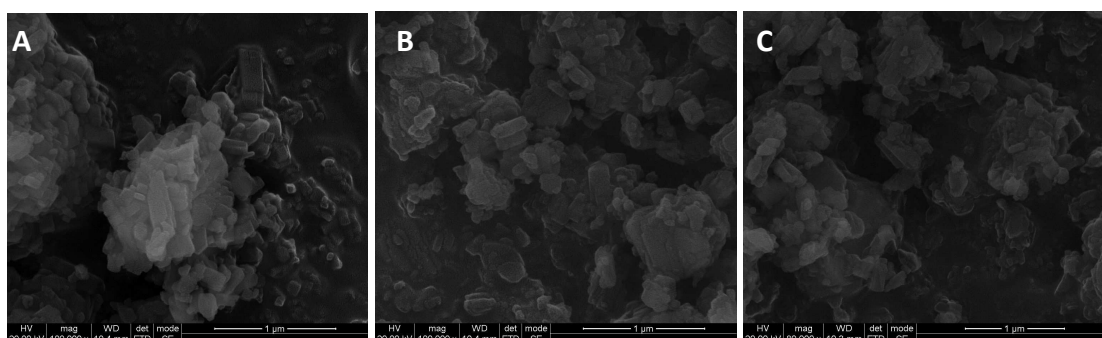
Para poder realizar ensayos comparativos con la ZSM5 intercambiada con plata, se adquirieron dos zeolitas comerciales, en ambos casos fue mordenita, pero una en forma de pellets de 1,6 mm y con un 15-20% de plata (Sigma-Aldrich®) y otra en forma de granular con una concentración de 20 y 35 % de plata (Sigma-Aldrich®).

### 3.1.4 Caracterización de las zeolitas con plata

A continuación se muestran diferentes técnicas que se usaron para poder caracterizar las zeolitas

- **MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO**

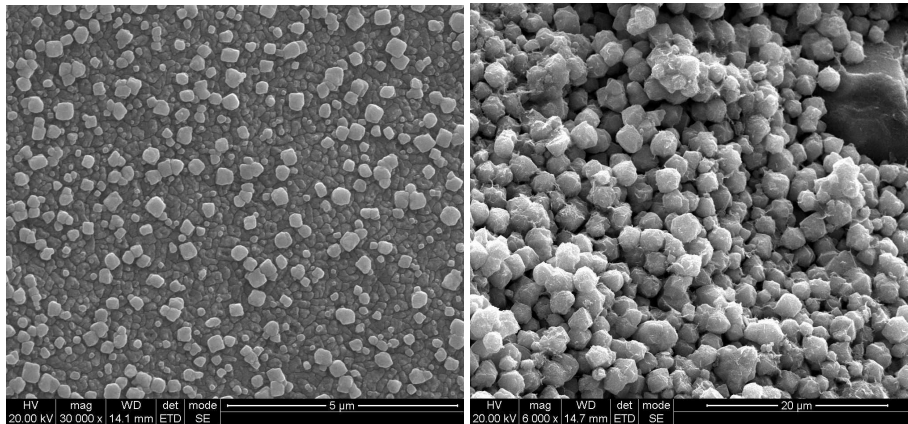
A continuación en la Figura 3.1 aparecen tres fotos de NH<sub>4</sub>-ZSM5, H-ZSM5 y Ag-ZSM5. En ella podemos observar que la forma amónica comercial, ya tiene los cristales con las aristas redondeadas, lo que puede ser debido al tratamiento básico que sufren industrialmente los cristales de ZSM5. También observamos que tanto el proceso de calcinación como el proceso de intercambio iónico no afectan a la estructura ni a la forma de los cristales.



**Figura 3.1.** Microfotografías de SEM mostrando la morfología de las muestras de zeolita ZSM5 de distintos estudios: **A)** NH<sub>4</sub>-ZSM; **B)** H-ZSM5 y **C)** Ag-ZSM5

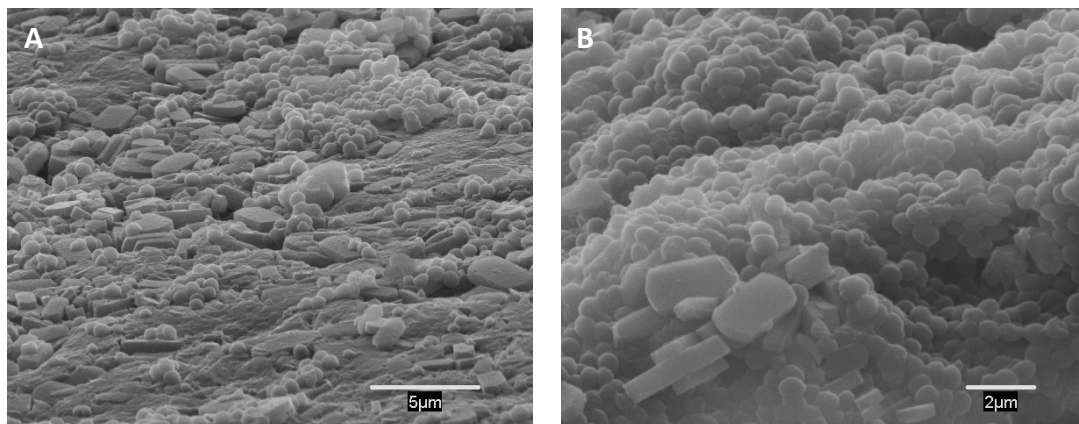
Seguidamente se muestran fotos de las zeolitas comerciales con plata, tanto la que tiene forma granular como la que tiene forma de pellet. De esta manera podemos observar la forma y la estructura que forman estos materiales.





**Figura 3.2.** Microfotografías de SEM mostrando la morfología de las muestras de zeolita modernita comercia **A)** La que presenta forma de pellet; **B)** La que presenta forma granular

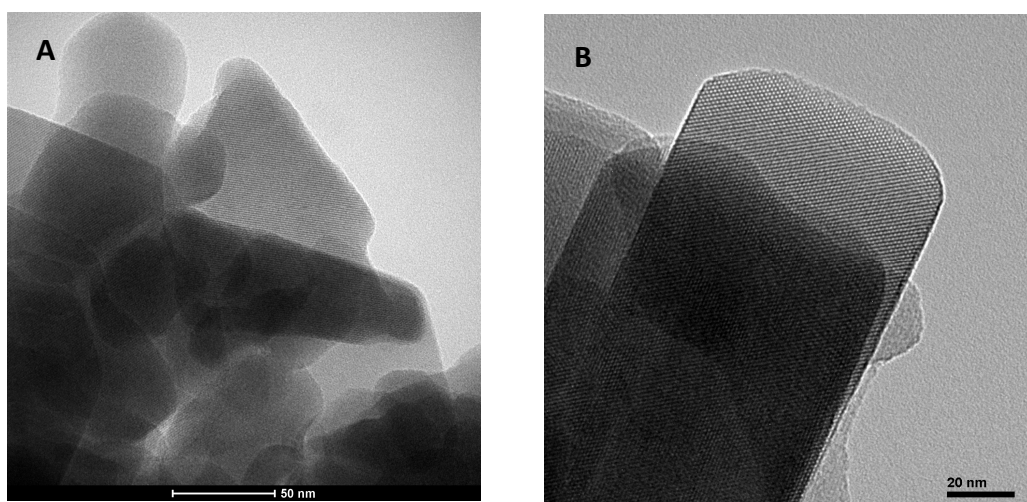
Finalmente, se muestra la zeolita comercial  $\text{NH}_4\text{-ZSM5}$  en forma de pastilla. En ella podemos observar como se ha formado un *biofilm* bacteriano en 24 horas de incubación con la bacteria *S. aureus*. De esta manera vemos como las bacterias (en forma esférica en la imagen) son capaces de cubrir los cristales de la zeolita que forman las pastillas (cristales de forma hexagonal).



**Figura 3.3. A) y B)** Microfotografías de SEM mostrando el biofilm formado sobre pastillas de zeolita comercial  $\text{NH}_4\text{-ZSM5}$ . Se puede observar como las bacterias, dispuestas en biofilm, recubren los cristales de la zeolita  $\text{NH}_4\text{-ZSM5}$

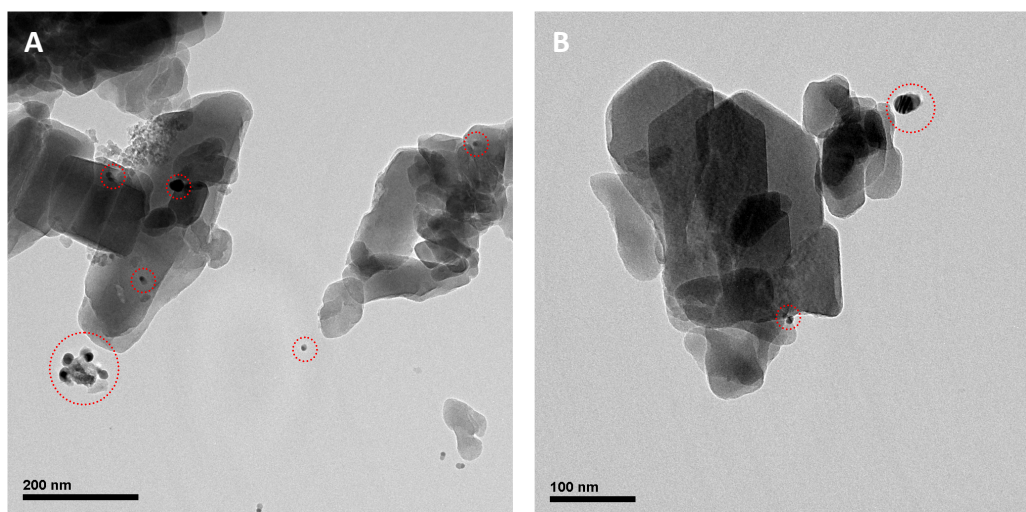
#### ▪ MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Mediante esta técnica se pudo observar las características de los materiales utilizados. En la Figura 3.4, podemos observar la zeolita comercial  $\text{NH}_4\text{-ZSM5}$ , en ella se observan los planos característicos de este material.



**Figura 3.4. A) y B)** Microfotografías de TEM. Se pueden observar los cristales de la zeolita comercial  $\text{NH}_4\text{-ZSM5}$ . En la microfotografía B, se muestra la geometría del cristal e incluso, se puede observar los poros de este material

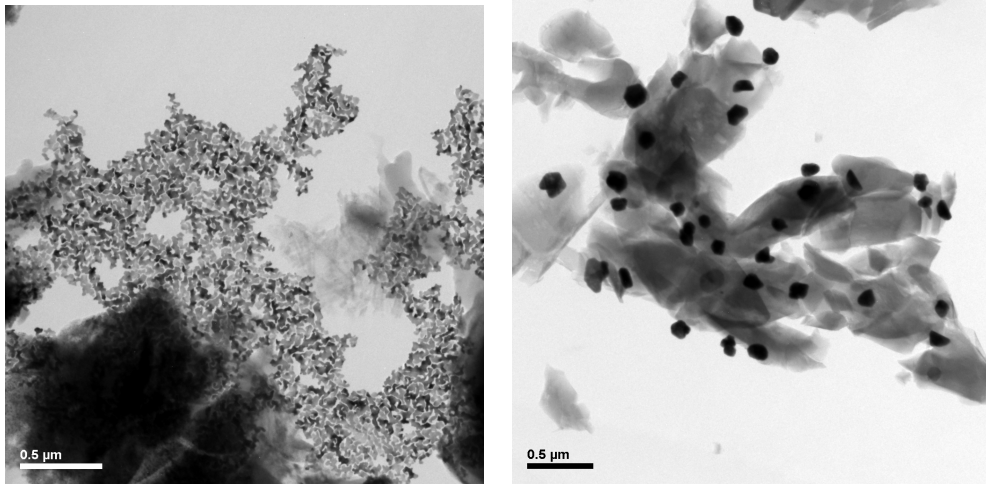
Seguidamente en la Figura 3.5, se muestra la Ag-ZSM5. En ella se puede observar agrupamientos de nanopartículas de plata metálica depositada en la superficie de los cristales (círculos discontinuos en rojo).



**Figura 3.5. A) y B)** Microfotografías de TEM mostrando los cristales de la zeolita intercambiada Ag-ZSM5. En ellas se han redondeado los depósitos de plata metálica de diferente tamaño formados durante el intercambio con  $\text{AgNO}_3$

También, mediante esta técnica se han podido constatar diferencias significativas entre las zeolitas comerciales intercambiadas con plata, así como las diferencias con la Ag-ZSM5 preparada en el laboratorio mediante intercambio iónico. La principal diferencia es la cantidad de plata presente en la superficie de los cristales zeolíticos. Dicha plata puede estar constituida por pequeños agrupamientos atómicos o por aglomerados de nanopartículas de plata. En las dos zeolitas comerciales se pueden observar numerosos agrupamientos de plata metálica depositada, mientras que en la Ag-ZSM5, en la figura anterior, son muy poco abundantes, debido a la baja

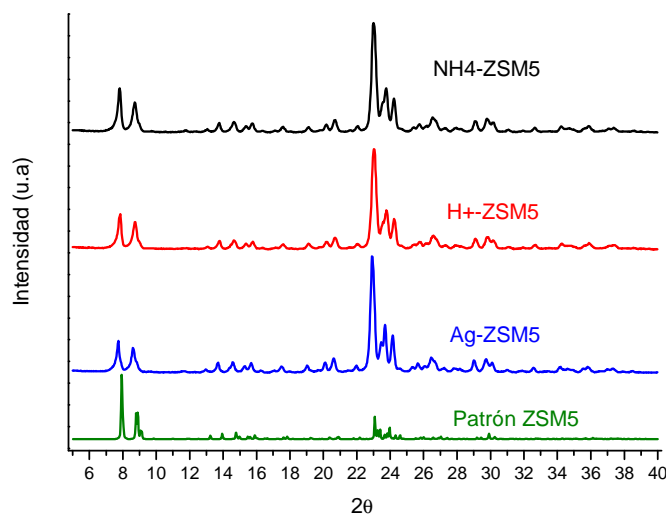
concentración de plata utilizada durante el intercambio (cerca 0,2 % en peso, ver Tabla 3.7).



**Figura 3.6.** Imágenes de TEM de **A)** Zeolita comercial granular **B)** Zeolita comercial en forma de pellet. Los agrupamientos más oscuros corresponden a la plata metálica. Si comparamos estas fotografías con las de la Figura 3.5 en las que aparece la Ag-ZSM5, se puede constatar la mayor presencia de agrupamientos de plata en estas zeolitas comerciales

#### ▪ DIFRACCIÓN DE RAYOS X

Mediante esta técnica se pudo demostrar la cristalinidad de la zeolita comercial NH<sub>4</sub>-ZSM5, antes y después de la calcinación, y tras el intercambio iónico con plata. Las muestras se han comparado con un patrón de la ZSM5 y en todos los casos se observó la aparición de todos los picos característicos de este material. No se observaron picos característicos de difracciones causadas por plata metálica o por nitrato de plata.



**Figura 3.7.** Resultados de la difracción de rayos X de NH<sub>4</sub>-ZSM5, H-ZSM5 y Ag-ZSM5. En esta figura se puede observar como todos los materiales mantienen los picos característicos del patrón del ZSM5



Además se pudo demostrar que aunque los cristales que aparecían en las fotografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido tenían las aristas redondeadas y en algunos casos parecían carentes de forma cristalina regular, la difracción de rayos X demostró que estos cristales mantenían su estructura cristalina intacta después de todos los tratamientos realizados.

El análisis del tamaño de la celda unidad aplicando la ecuación de Scherrer permitió demostrar que el tamaño de la celda se expandió de 20,5 nm en H<sup>+</sup>-ZSM5, a 23 nm en la zeolita Ag-ZSM5 después del intercambio. Sin embargo, como se muestra en la Figura 3.7, no se observaron picos de difracción que potencialmente podrían haber producido agrupamientos de plata metálica o el nitrato de plata.

#### ▪ ESPECTROSCOPÍA DE FOTOELECTRONES EMITIDOS POR RAYOS X

Con la ayuda de esta técnica, se logró obtener el porcentaje en peso de plata que posee la zeolita intercambiada con plata, Ag-ZSM5. A continuación en la siguiente tabla, se muestran los valores obtenidos para algunos de los diferentes lotes de Ag-ZSM5 obtenidos durante el desarrollo de este trabajo:

**Tabla 3.1.** Resultado de XPS de diferentes muestras de Ag-ZSM5

Material	% de plata en peso
AgZSM5_A	0,21%
AgZSM5_B	0,22%
AgZSM5_C	0,15%
AgZSM5_D	0,11%
MEDIA	<b>0,17%</b>

Pese a ser una técnica superficial, se investigó si dicha composición se mantenía constante a lo largo de todo el espesor de la muestra. Mediante el análisis de la descomposición de perfiles obtenidos utilizando la técnica de eliminación de capas sucesivas del material mediante el bombardeo iónico (*depth profiling*) desde el exterior hacia el interior de la muestra se obtuvieron valores similares en todo el material analizado. Es decir, la composición superficial y la composición en el interior del cristal analizado se mantenía constante.

#### ▪ ESPECTROSCOPÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA

Por medio de esta técnica, se han podido determinar diferentes variables:

1. Cantidad de plata total intercambiada en la zeolita:
  - Mediante digestión del material con agua regia. La mezcla de ácido nítrico y ácido clorhídrico fue capaz de disolver la estructura de la zeolita quedando en disolución la plata, la cual se pudo medir mediante esta técnica.
  - Mediante intercambio con nitrato de sodio. La Ag-ZSM5 se intercambió con nitrato de sodio. De esta manera, el catión sodio desplazó el catión plata de la estructura de la ZSM5 quedando como Na-ZSM5, y la plata volvía a la disolución. Se midió la

concentración de plata que contenía dicha disolución y por tanto, se conseguía conocer la plata que formaba la Ag-ZSM5.

- Mediante la medición de la plata que queda después del intercambio. La H-ZSM5 se intercambió con una solución que contenía una concentración conocida de nitrato de plata para obtener Ag-ZSM5. Seguidamente, se analizó la cantidad de plata que quedaba en esta solución de nitrato de plata, y por tanto, se pudo averiguar la cantidad que se había intercambiado y daba lugar a Ag-ZSM5.

Los tres procedimientos anteriores proporcionaron valores comparables de la carga total de plata en la zeolita.

## 2. Cantidad de plata que se liberó al medio de cultivo (TSB):

- Plata total en el sobrenadante con tamaño superior a 5 nm. Con bacterias y sin bacterias. Se realizó la centrifugación para eliminar los restos del material estudiado y/o bacterias mediante el uso de tubos Falcon® de centrífuga convencionales, es decir, sin filtro. Se evitó la presencia de partículas macroscópicas en la dispersión a analizar.
- Plata total en el sobrenadante con tamaño inferior a 5 nm. En la centrifugación para obtener la muestra sin restos de material para ser analizados, fueron utilizados tubos de centrífuga con unos filtros incorporados (Amicon Ultra centrifugal filter units, Millipore®). Estos filtros evitaron la presencia de partículas superiores a 5 nm.

## 1. Cantidad de plata que se intercambió en la zeolita

Para saber la cantidad de plata que contenía el material, se hizo una digestión de éste con agua regia. Concretamente, se pusieron en contacto 50 mg del material en 40 mL de agua regia en digestores de teflón aptos para el reactor de microondas (Milestone, Ethos plus) y se mantuvo una potencia máxima de 800 W con una temperatura de 200°C durante 30 minutos. Seguidamente, las muestras obtenidas se dejaron enfriar y se aforaron hasta 50 mL.

Estas muestras fueron medidas mediante espectroscopia de absorción atómica obteniéndose el contenido en plata (mg/L) que hay en la solución. Los resultados obtenidos mediante esta técnica fueron muy similares a los obtenidos mediante XPS:

**Tabla 3.2.** Resultados de AAS de la digestión de diferentes Ag-ZSM5

Material	% de plata en peso
AgZSM5_A	0,19%
AgZSM5_B	0,19%
AgZSM5_C	0,20%
AgZSM5_D	0,23%
<b>MEDIA</b>	<b>0,2%</b>

Otra manera de poder conocer la cantidad de plata que hay en la zeolita intercambiada con este metal fue haciendo un intercambio con nitrato de sodio en ausencia de luz, renovando el medio cada 8 y 24 horas con el objeto de reemplazar toda la plata iónica intercambiada por el catión sodio y analizar en disolución la

cantidad de plata iónica liberada al medio (isoterma de intercambio). A los tiempos determinados, se centrifugó el material con la solución de nitrato de sodio a 10000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se analizó mediante espectroscopía de absorción atómica y el precipitado resultante de la centrifugación se resuspendió con una solución fresca de nitrato de sodio de concentración conocida para seguir intercambiando la plata. El proceso se repitió a los tiempos determinados. Para ello se hicieron diferentes experimentos con distintas concentraciones de nitrato de sodio. Primero se usó una concentración de 8,7 mM de nitrato de sodio, y 0,037 g de Ag-ZSM5. Se guardaron las muestras renovando el medio a 8, 24, 32, 48 y 72 horas. En la Tabla 3.3 se muestran los datos obtenidos en (mg/L o ppm) y el tanto por ciento en peso de plata correspondiente a esta Ag-ZSM5 calculado a partir de los datos obtenidos en absorción atómica.

**Tabla 3.3.** Resultados de AAS y % en peso de plata tras intercambio con 8,7 mM de  $\text{NaNO}_3$  y 0,037g de Ag-ZSM5

Renovación	Tiempos (h)	mg/L de plata
1	0-8	5,547
2	8-24	1,665
3	24-32	0,907
4	32-48	0,847
5	48-72	0,864
% en peso de plata		<b>0,16%</b>

También usando la misma concentración de nitrato de sodio de 8,7 mM, se pusieron 0,185 g de Ag-ZSM5 y se añadió un tiempo de renovación del medio, es decir, una renovación intermedia a las 56 horas entre los tiempos de 48 horas y 72 horas. En la Tabla 3.4, se muestran los resultados obtenidos de la misma manera que se han explicado anteriormente.

**Tabla 3.4.** Resultados de AAS y % en peso de plata tras intercambio con 8,7 mM de  $\text{NaNO}_3$  y 0,185 g de Ag-ZSM5

Renovación	Tiempos (h)	mg/L de plata
1	0-8	5,116
2	8-24	1,236
3	24-32	0,689
4	32-48	0,608
5	48-56	0,604
6	56-72	0,648
% en peso de plata		<b>0,15%</b>

En conclusión, se pudo observar que los resultados eran comparables, con un 0,16 % en peso de plata en el primer experimento y un 0,15 % en peso de plata en el segundo experimento.

Otro método para determinar la cantidad de plata que hay en la Ag-ZSM5, fue medir por espectroscopía de absorción atómica, la concentración de la disolución de nitrato de plata que queda tras el intercambio con H-ZSM5. De esta manera se pudo calcular el tanto por ciento en peso de plata que hay en la Ag-ZSM5 ya que se conocía la cantidad de H-ZSM5 que se puso, de 3 g, y la cantidad de nitrato de plata solución estándar para absorción atómica 1% en peso (HNO<sub>3</sub>) de 100 ppm (Sigma-Aldrich), de 12 mL.

**Tabla 3.5.** Resultados de % en peso de plata de 2 lotes diferentes de Ag-ZSM5, midiendo la cantidad que queda de plata tras el intercambio

Material	% en peso de plata
AgZSM5_A	0,19%
AgZSM5_B	0,21%
MEDIA	<b>0,2%</b>

Por lo tanto, se pudo observar que la cantidad de plata en la zeolita intercambiada, resulto muy similar entre los diferentes métodos usados. En la siguiente tabla se resumen todos los valores y métodos usados, así como un valor medio calculado de tanto por ciento en peso de plata:

**Tabla 3.6.** Resultados de % en peso de plata de Ag-ZSM5, obtenida por diferentes métodos y medida por AAS

Método	% en peso de plata
Digestión Microondas-Agua regia	0,2%
Intercambio 8,7mM NaNO <sub>3</sub> -0,037g Ag-ZSM5	0,16%
Intercambio 8,7mM NaNO <sub>3</sub> -0,185g Ag-ZSM5	0,15%
Resto del intercambio	0,2%
MEDIA	<b>0,18%</b>

Finalmente, en la Tabla 3.7 se resume el porcentaje en peso de plata que hay en la Ag-ZSM5 medida por espectroscopía de fotoelectrones emitidos por Rayos X y por espectroscopía de absorción atómica.

**Tabla 3.7.** Resultados de % en peso de plata de Ag-ZSM5, obtenida por dos técnicas: XPS y AAS

Método	% en peso de plata
XPS	0,17%
AAS	0,18%
MEDIA	<b>0,175 %</b>

En conclusión, tres técnicas analíticas independientes (XPS, AAS y realización de la isoterma de intercambio) condujeron a resultados similares para cuantificar la cantidad de plata iónica intercambiada en la red zeolítica.

Apuntar, que para el caso de las zeolitas comerciales intercambiadas con plata en forma granular y de pellet, no se llevaron a cabo ninguno de estos análisis para determinar la cantidad de plata contenida ya que este dato venía suministrado por el fabricante, tal y como se ha explicado en el apartado 3.1.3.

## 2. Cantidad de plata que se liberó al medio de cultivo (TSB)

A continuación se muestra la cantidad de plata liberada al medio de cultivo bacteriano (TSB) procedente de diferentes lotes de Ag-ZSM5, y de zeolitas comerciales (forma de pellets y forma de granular), a 4, 6 y 24 horas, sin renovación del medio. Para realizar este experimento, se pusieron en contacto 300 mg de los diferentes materiales con 10 mL de TSB en tubos Falcon® estériles. Para cada tiempo se utilizó un tubo de ensayo (o dos en los casos que se hicieron réplicas), por lo que no hubo renovación del medio.

Los tubos se colocaron en un agitador orbital (IKA®, modelo KS130) a 37°C y en ausencia de luz, con una agitación de 350 rpm. A los tiempos determinados, los tubos se sacaron y se centrifugaron durante 10 minutos a 10000 rpm. Los sobrenadantes se guardaron en frío, oscuridad y en condiciones de esterilidad hasta ser medidos mediante espectroscopia de absorción atómica. Los pellets fueron desechados.

En la siguiente Figura 3.8 se muestran los valores de plata en mg/L detectados en los sobrenadantes a 4, 6 y 24 horas. Tanto en las zeolitas comerciales como en la Ag-ZSM5, la cinética de liberación fue similar. En las primeras 4 horas ya se liberó casi toda la plata, aumentando la concentración de plata entre un 8% y un 15% en el tiempo de 24 horas respecto al tiempo de 6 horas analizado.

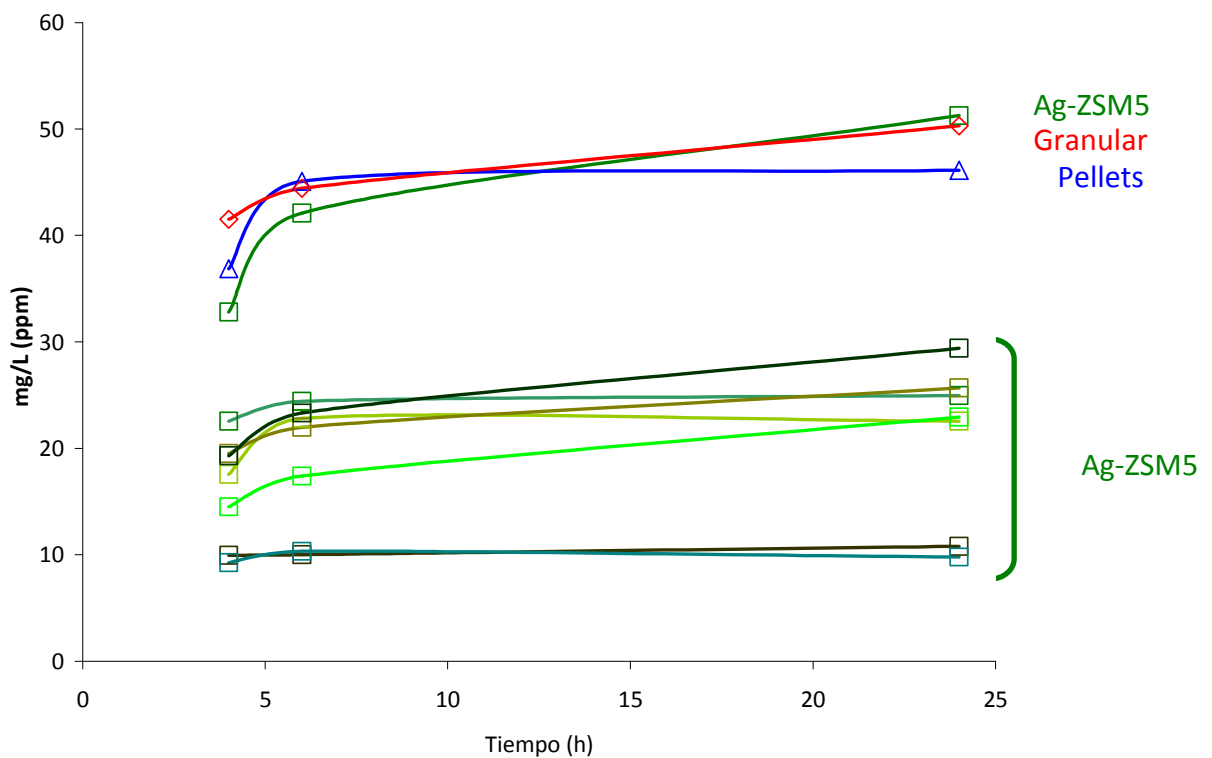
En la liberación de plata procedente de las zeolitas comerciales, cada punto es la media de dos liberaciones diferentes. Se obtuvo una buena reproducibilidad para todos los tiempos, siendo la variación de las medidas efectuadas de  $\pm 0,67$  g/mL en el caso de la forma de pellets y  $\pm 0,71$  g/mL para la forma granular. Se observó que son estas zeolitas comerciales las que más cantidad de plata liberan al medio de cultivo y de una manera más reproducible en todos los experimentos, tal y como cabía esperar por su constante y elevada carga inicial de plata.

La liberación de plata de los diferentes lotes de Ag-ZSM5 no fue tan reproducible. La media de liberación fue de 24,68 mg/L  $\pm$  12,83 mg/L a las 24 horas. Sin embargo, hubo tres lotes, que se alejaban de este valor medio, uno era muy elevado (51,26 ppm a 24 horas) y otros dos muy inferiores a esta media (9,785 ppm y 10,797 ppm a 24 horas). Las otras cinco liberaciones variaron entre 22,56 mg/L y 29,41 mg/L a 24 horas con una desviación estándar de  $\pm 2,74$  mg/L. La variación de liberación de plata procedente de los tres lotes de Ag-ZSM5 fue debida, a pequeñas variaciones en la temperatura ambiental y en el grado de agitación durante el intercambio.



**Tabla 3.8.** Valores de plata liberada a las 24 horas por los lotes de Ag-ZSM5 y la media de estos valores. Datos obtenidos por AAS

Plata liberada en mg/L por los lotes de Ag-ZSM5 a las 24 horas	Media de plata liberada en mg/L de los ocho lotes a las 24 horas
9,785	24,677
10,797	
22,555	
22,950	
24,975	
25,680	
29,414	
51,260	

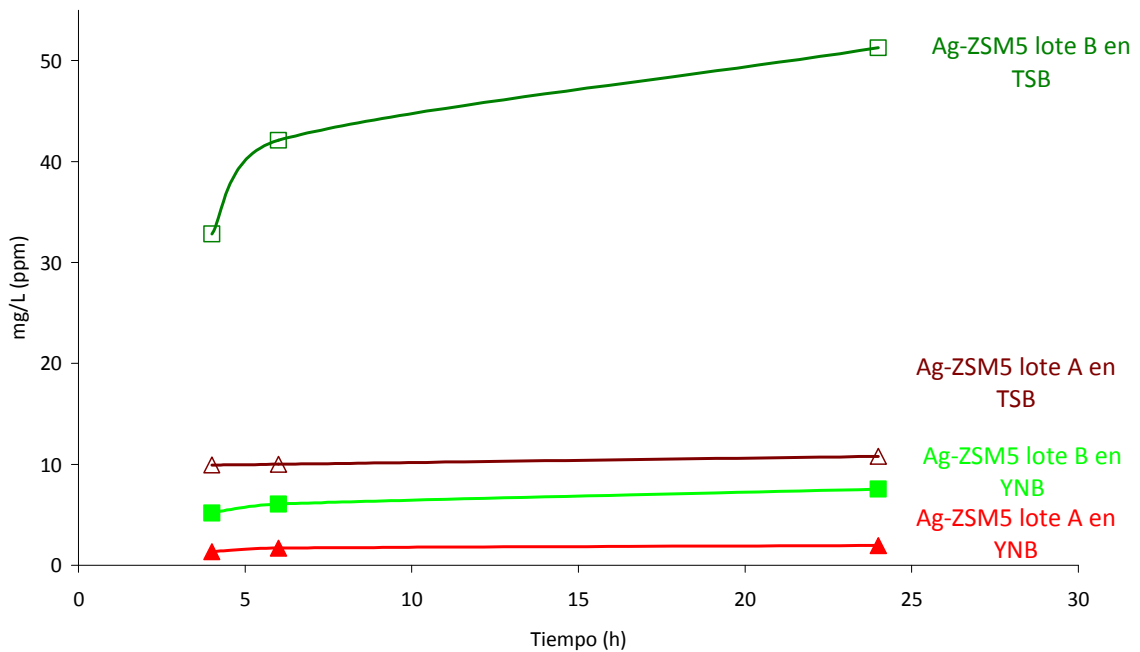


**Figura 3.8.** Liberación de plata medida por AAS a 4, 6 y 24 horas. Los triángulos en azul corresponden a los pellets. Los rombos en rojo a la forma granular. Los cuadrados en diferentes gamas de verde a los diferentes lotes de Ag-ZSM5

Por otro lado, se comparó la liberación de plata procedente de la Ag-ZSM5 en dos medios de cultivo diferentes. Uno es el medio de cultivo para bacterias usado comúnmente que es el TSB, y otro es un medio de cultivo especialmente dirigido al

crecimiento de hongos que es el YNB (ver composición de los medios en el apartado 2.2.2).

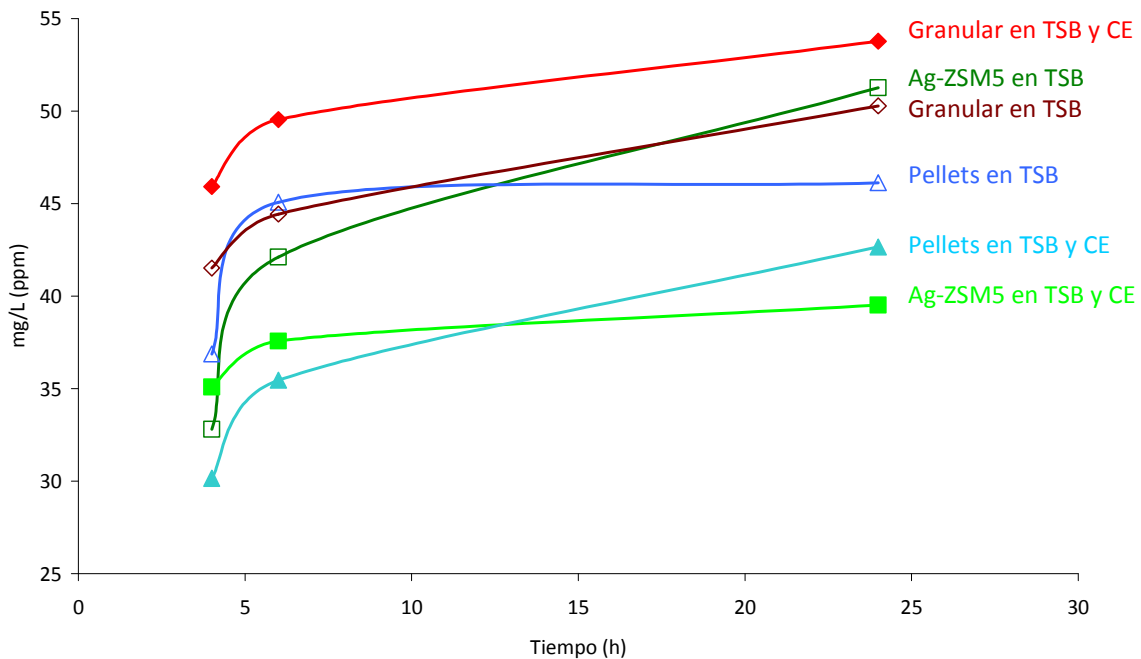
Se hicieron liberaciones de dos lotes de Ag-ZSM5, y en ambos casos se demostró la importancia de la composición del medio de cultivo, ya que ambos lotes liberados en medios diferentes dieron resultados de hasta 10 veces menos mg/L de plata en YNB. La diferencia puede ser debido a diversas razones, tales como la concentración de cationes en el medio (que afecta a la fuerza impulsora para el intercambio iónico) o la viscosidad del medio (que afecta al coeficiente de transferencia de materia), ya que este último medio (YNB), tiene muchos más compuestos, como mayor concentración de aminoácidos que pudieran formar complejos con la plata liberada y precipitar [189, 200, 335, 336], y por tanto, no pudieron ser detectados en espectroscopía de absorción atómica.



**Figura 3.9.** Liberación de plata medida por AAS a 4, 6 y 24 horas en dos medios de cultivo: TSB y YNB. Lote A de Ag-ZSM5 en TSB (Triángulos rojos vacíos). Lote A Ag-ZSM5 en YNB (Triángulos rojos llenos). Lote B Ag-ZSM5 en TSB (Cuadrados verdes vacíos). Lote B Ag-ZSM5 en YNB (Cuadrados verdes llenos)

También se estudió la diferencia entre la liberación de plata al medio de cultivo TSB estéril y liberación de plata en cultivo estacionario. Con la AgZSM5 y la zeolita comercial en forma de pellet, la liberación y presencia de plata fue mayor en el medio de cultivo estéril, sin bacterias. En cambio, con la zeolita comercial granular se obtuvo más plata cuando existían bacterias en el medio, indicando que la liberación de plata depende del medio de cultivo y que no se puede generalizar en cuanto a su influencia en la cantidad de plata liberada a dicho medio. De hecho, el efecto de la presencia de bacterias puede variar también dependiendo de la fase en que se encuentra el cultivo, o los metabolitos secretados por éstas. También es importante considerar la concentración de iones cloruro en cada uno de los medios ya que se ha demostrado

como a bajas concentraciones de dicho anión la plata precipita pero a mayores concentraciones puede formar compuestos solubles [200] .



**Figura 3.10.** Liberación de plata medida por AAS a 4, 6 y 24 horas con y sin bacterias en el medio: Ag-ZSM5 en TSB (Cuadrados verdes vacíos). Ag-ZSM5 en Cultivo estacionario (CE) (Cuadrados verdes llenos). Pellets en TSB (Triángulos azules vacíos). Pellets en Cultivo estacionario (CE) (Triángulos azules llenos). Granular en TSB (Rombos rojo vacíos). Granular en Cultivo estacionario (Rombos rojos llenos)

También debe tenerse en cuenta que todas estas medidas se hicieron, como se ha comentado anteriormente, con los sobrenadantes, por lo que se midieron todas aquellas formaciones, nanopartículas, complejos... [337, 338] que pudieron haberse formado entre la plata liberada y los compuestos que forman parte del medio de cultivo, y quedan en el sobrenadante y no en el precipitado de la centrifugación.

Para medir solamente la plata liberada como plata iónica o presente como agrupamientos atómicos de reducido tamaño, en el momento de la centrifugación, se usaron unos tubos de centrifuga con unos filtros incorporados (Amicon Ultra® centrifugal filter units, Millipore®) que evitaron que en el sobrenadante hubieran formaciones superiores a 5 nm.

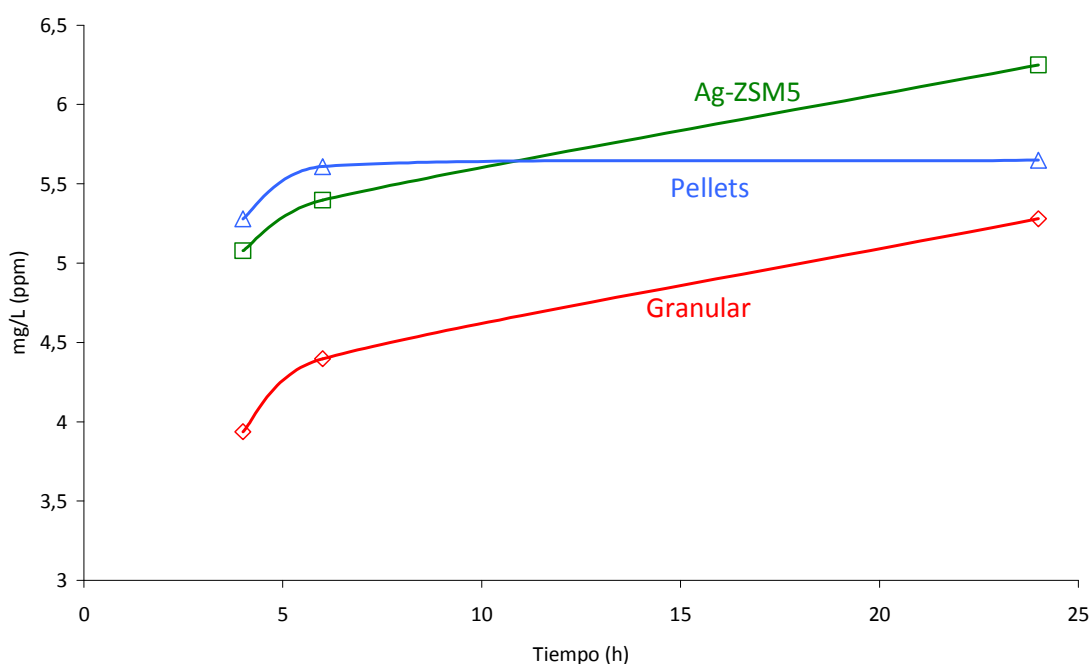


**Figura 3.11.** Tubos con filtros incorporados (Amicon Ultra® centrifugal filter units, Millipore®)

Como podemos observar en la Figura 3.12, al contabilizar sólo la plata inmediatamente disponible, su concentración se reduce en gran medida.

En el caso de la zeolita comercial en forma de pellet se pasa de 46,123 ppm liberadas al medio a 5,65 ppm. Para la zeolita comercial en forma granular se reduce de 50,281 ppm a 5,28 ppm. Y, por último, en el caso de la Ag-ZSM5 se consigue disminuir la liberación de plata desde un valor medio de 24,68 ppm resultado de los diferentes ensayos (Tabla 3.8. Valores de plata liberada a las 24 horas por los lotes de Ag-ZSM5 y la media de estos valores. Datos obtenidos por AAS.) a 6,25 ppm.

Gracias a este nuevo método de contabilización, se pudo concluir que el material que más plata activa liberó es la Ag-ZSM5. De esta manera, se demostró que las otras dos zeolitas comerciales liberaban la mayor parte de plata en forma de nanopartículas o agrupamientos superiores a 5 nm. Esto se corroboró con las fotografías obtenidas por TEM (mostradas anteriormente en este apartado) ya que son estas dos zeolitas comerciales, las que más agrupamientos en forma de plata metálica tienen en la superficie comparada con la Ag-ZSM5. Estas zeolitas comerciales, tenían agrupamientos de un tamaño en torno a 100 nm, que se han reportado como inactivos desde el punto de vista bactericida [183, 186].



**Figura 3.12.** Liberación de plata activa medida por AAS, tras centrifugar usando tubos con filtros de 5 nm incorporados. Ag-ZSM5 (cuadrados verdes). Pellets (Triángulos azules). Granular (Rombos rojos)

### 3. Detección de aluminio

Se intentó averiguar mediante esta técnica, si las zeolitas estudiadas liberaban aluminio que también podrían tener efecto bactericida [339, 340] junto con la plata.

Los datos no se muestran porque en la mayoría de los casos se obtuvieron valores por debajo del límite de detección del equipo de AAS utilizado. Los límites de detección de

esta técnica dependen de el fluido donde se encuentre el elemento a analizar y el equipo utilizado. A lo largo de la literatura se determina que el límite de detección está entre 0,05 ppm [341] y de 0,1 ppm [342]. Por ello, la posible liberación en cantidades significativas del aluminio procedente de las zeolitas al medio de cultivo y su potencial influencia bactericida fueron descartados.

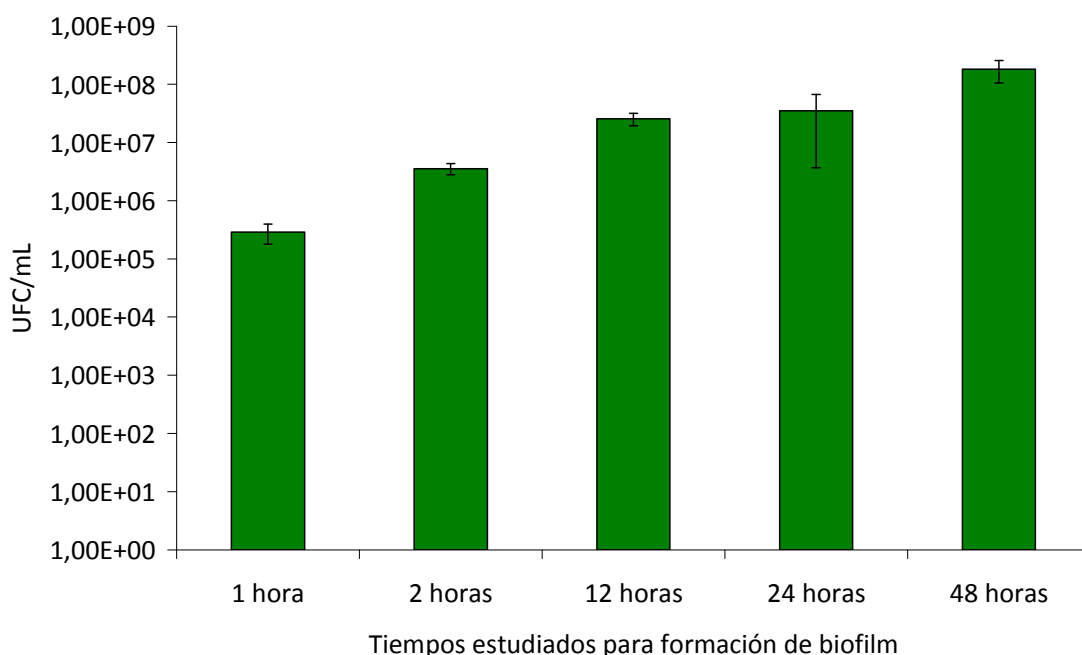
### 3.1.5 Ensayos biológicos

En ese apartado se muestran los resultados de experimentos llevados a cabo con *S.aureus* cepa 9213, en relación con la cantidad bactericida de las zeolitas.

#### ▪ ESTUDIOS DE FORMACIÓN DE *BIOFILM* SOBRE PASTILLAS DE NH<sub>4</sub>-ZSM5

Con este ensayo, se observó la formación de *biofilm* sobre las pastillas de zeolita NH<sub>4</sub>-ZSM5.

Se pretendía saber, si partíamos de una material en el que se formaba *biofilm* de una manera natural y se pudo concluir que así era, ya que, tal y como se observa en la Figura 3.13, el número de UFC/mL fue aumentado de unos valores de  $5 \times 10^5$  en 1 hora a valores de  $10^8$  en 48 horas. Además, como ya se ha comentado, la presencia del ligante en la pastilla, facilitaba la formación de *biofilm*. En la Figura 3.13 se muestran dichos resultados:



**Figura 3.13.** Formación de *biofilm* sobre pastillas de NH<sub>4</sub>-ZSM5 con 12% de ligante

## ▪ ESTUDIOS BACTERICIDAS

### 1. Con cultivo estacionario

Con estos estudios se pretendió observar la capacidad biocida que tiene cada material en ausencia de luz en cultivo estacionario.

En la Figura 3.14, se muestran los resultados del poder bactericida de los materiales respecto al tiempo en cultivo estacionario.

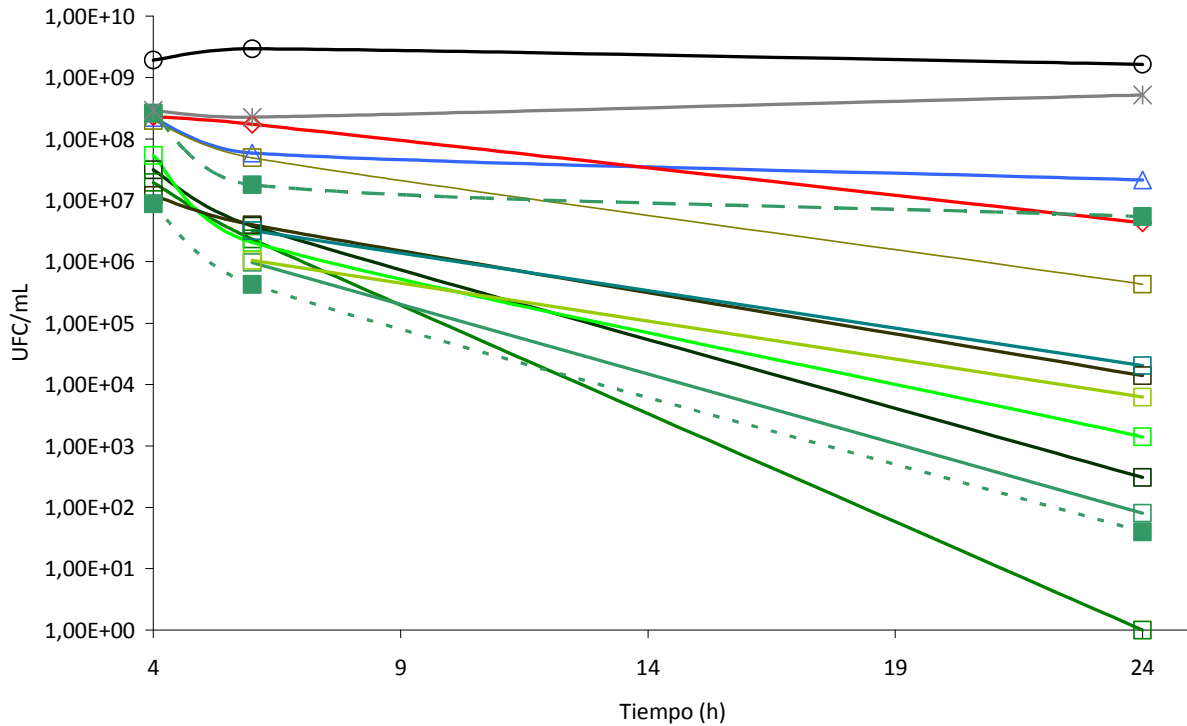
Por un lado, se pudo observar la reproducibilidad de los resultados en el caso de las zeolitas comerciales en forma de pellets y en forma granular. Las gráficas obtenidas corresponden a un promedio de experimentos independientes. Se pudo observar que ambos materiales tienen menor poder bactericida que la Ag-ZSM5. Con la zeolita comercial en forma de pellet se produce una disminución de dos unidades logarítmicas a 24 horas, y con la zeolita comercial en forma granular una disminución de tres unidades logarítmicas también a 24 horas respecto al control. Esto concuerda con la cantidad de plata que indica el fabricante siendo de un 35% en peso de plata para la zeolita comercial en forma granular, y de un 15-20% en peso de plata para la zeolita comercial en forma de pellet.

Respecto a los diferentes lotes de Ag-ZSM5, se observó reproducibilidad a tiempos cortos de 4 y 6 horas (excepto el lote 6 que tuvo un poder bactericida de un logaritmo inferior en ambos tiempos). En cambio a 24 horas, se observó una dispersión considerable de resultados, obteniendo una disminución de entre nueve y cuatro unidades logarítmicas. Esta dispersión se atribuyó a que esta cepa de *S.aureus* es formadora de *biofilm* [37] por lo que a tiempos suficientemente largos (24 horas), la masa del biofilm estaría suficientemente desarrollada como para dificultar el acceso de la plata iónica a las bacterias. Sin embargo, el *biofilm* no crece de una forma reproducible ya que la formación de dicho *biofilm* depende de la superficie de contacto y al trabajar con el material en polvo la superficie expuesta no es homogénea ya que depende del empaquetamiento, por lo tanto, la presencia del exopolisacárido del *biofilm* impediría una liberación de plata similar entre los lotes.

Sin embargo, en todos los lotes se observó un poder bactericida mayor para la Ag-ZSM5 al de las dos zeolitas comerciales, lo que corresponde con la más intensa liberación de plata activa ya discutida.

Por otro lado, vimos que la forma amónica de la ZSM5 no producía casi efecto bactericida.

Finalmente se hicieron dos pruebas más. Un parte de un lote de Ag-ZSM5 fue autoclavado y se detectó que se perdía en gran medida su poder bactericida, disminuyendo este poder en cinco unidades logarítmicas a las 24 horas. Este hecho, se atribuye a la extracción de plata iónica de la red de la zeolita para formar agrupamientos de menor actividad bactericida proceso favorecido por la alta temperatura del proceso de autoclavado [343]. Con otra parte de este lote, se hicieron ensayos bactericidas en presencia de luz y se comprobó que ésta no afectaba al poder bactericida.



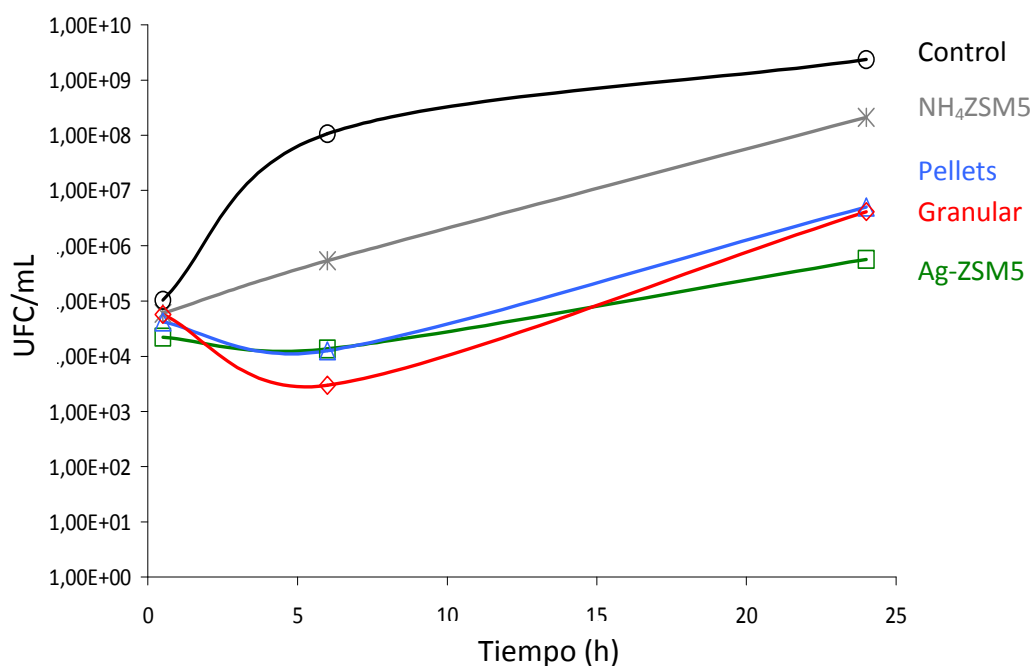
**Figura 3.14.** Poder bactericida con cultivo estacionario. Control (círculo negro). NH<sub>4</sub>ZSM5 (estrella gris). Pellets (triángulo azul). Granular (rombo rojo). Lotes AgZSM5 (cuadrados vacíos en gama de verdes). AgZSM5 con luz (cuadro verde lleno discontinuo pequeño). AgZSM5 autoclavado (cuadro verde lleno discontinuo grande)

NOTA: Las variantes (autoclavada y con luz) tienen el mismo color de verde que su AgZSM5 de referencia

## 2. Con cuatro diluciones 1:10 a partir de la concentración del cultivo estacionario

Los resultados presentados hasta ahora, muestra el poder bactericida en la fase estacionaria con una elevada concentración de bacterias ( $10^9$  UFC/mL).

En este apartado, se presentan experimentos encaminados a estudiar la capacidad de eliminar las bacterias que tiene cada material en ausencia de luz pero en una fase de crecimiento como es la fase exponencial. Para ello se hicieron cuatro diluciones 1:10 en TSB a partir de un cultivo estacionario. Los resultados se presentan en la Figura 3.15.



**Figura 3.15.** Poder bactericida con cultivo en fase exponencial. Control (círculo negro). NH<sub>4</sub>ZSM5 (estrella gris). Pellets (triángulo azul). Granular (rombo rojo). Ag-ZSM5 (cuadrado verde)

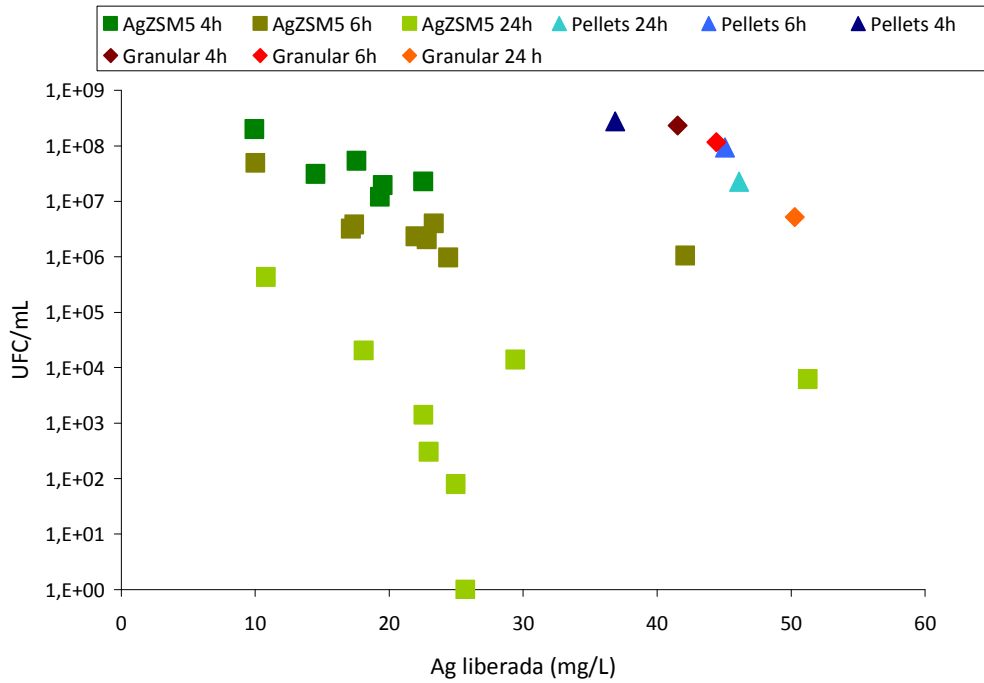
Con ese experimento se demostró que en la fase de crecimiento, el poder bactericida es inferior al de la fase estacionaria. A 24 horas, no se produce eliminación de bacterias, pero sí que se consiguió un control del crecimiento bacteriano (inhibición), siendo de nuevo la Ag-ZSM5, la que produce un mejor control del crecimiento bacteriano.

### 3. Poder bactericida respecto a la plata liberada

En la Figura 3.16 se observan los resultados bactericidas teniendo en cuenta la plata total liberada, es decir, sin utilizar los tubos con un filtro de tamaño de corte de 5 nm. Debido a esto, se observa que aunque la Ag-ZSM5 tiene mayor poder bactericida a todos los tiempos, aparentemente, se liberaba menos plata que en las zeolitas comerciales en forma de pellet y granular. Pero como se ha comentado anteriormente, se estaba refiriendo a plata total, es decir, también se tomaban en cuenta, aquellos agrupamientos de plata tan abundantes en las zeolitas comerciales y que quedaban en el sobrenadante a analizar. Es lógico pensar que parte de las nanopartículas observadas en la superficie de las zeolitas comerciales se desprenden de estas liberándose al medio. Por su tamaño dichas nanopartículas permanecen en suspensión como coloides y son analizadas mediante absorción atómica, pero presenta un bajo poder bactericida.

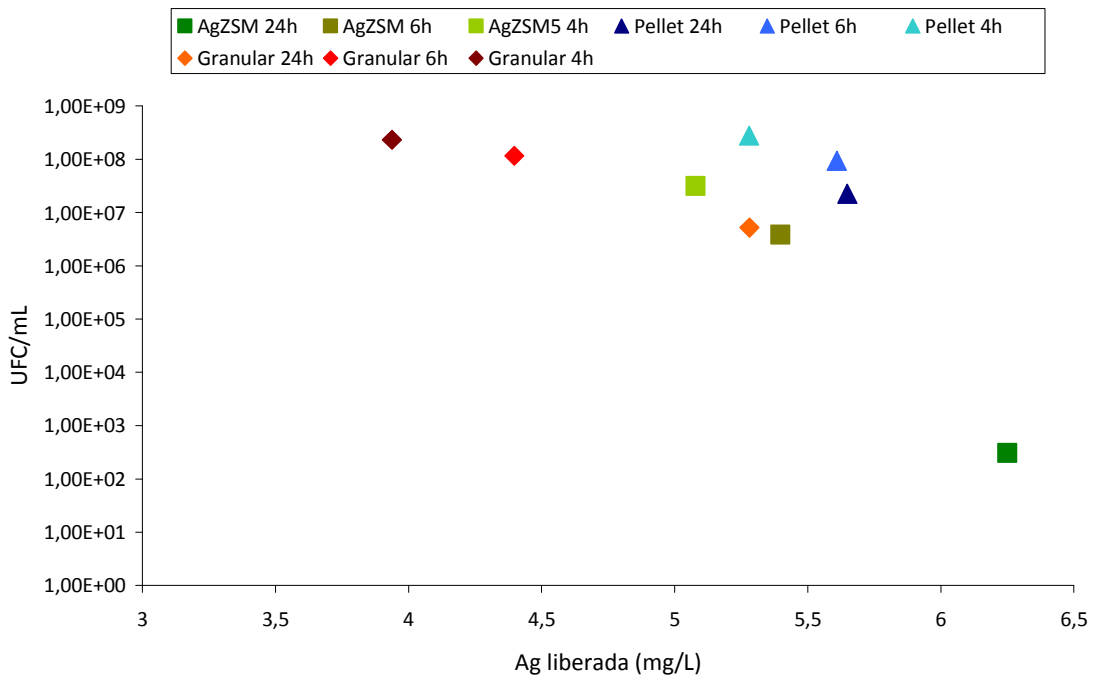
También se sigue observando la dispersión ya señala de valores de poder bactericida de la Ag-ZSM5 a tiempos de 24 horas.





**Figura 3.16.** Plata liberada (sin filtro de 5 nm) respecto a las UFC/mL. Ag-ZSM5 4, 6 y 24 horas (cuadrados en gamas de verde). Pellets 4, 6 y 24 horas (triángulos azules). Granular 4, 6 y 24 horas (rombos rojos)

Por el contrario, en la Figura 3.17 se representan los valores del poder bactericida de la plata activa determinada en el sobrenadante como se ha explicado anteriormente, es decir, tras haber sido centrifugada con los tubos dotados de filtro con un tamaño de corte de 5 nm.



**Figura 3.17.** Plata liberada con filtro de 5 nm respecto a las UFC/mL. Ag-ZSM5 4, 6 y 24 horas (cuadrados en gamas de verde). Pellets 4, 6 y 24 horas (triángulos azules). Granular 4, 6 y 24 horas (rombos rojos)

Haciendo la representación de esta manera, podemos observar la clara correlación existente entre la plata liberada al medio por la Ag-ZSM5, la zeolita comercial en forma de pellet y la zeolita comercial granular y las bacterias eliminadas. La Ag-ZSM5 a las 24 horas es el material que más plata libera al medio (6,25 ppm) y por tanto es el material que mayor poder bactericida tiene a ese tiempo ( $3,07 \times 10^2$  UFC/mL). Aquellos puntos de los diferentes materiales y tiempos en los que la plata liberada al medio es muy similar (por ejemplo: zeolita comercial granular a las 24 horas: 5,28 ppm y Ag-ZSM5 a las 6 horas: 5,398 ppm) el poder bactericida también es muy similar (por ejemplo: zeolita comercial granular a las 24 horas:  $5,21 \times 10^6$  UFC/mL y Ag-ZSM5 a las 6 horas:  $3,83 \times 10^6$  UFC/mL).

### 3.2 ÓXIDO DE PLATA

Se usó este material, porque se quiso probar la influencia de la disponibilidad del ión plata cuando está formando parte de un óxido, su solubilidad al medio de cultivo y su consecuente poder bactericida.

#### 3.2.1 Procedencia del óxido de plata

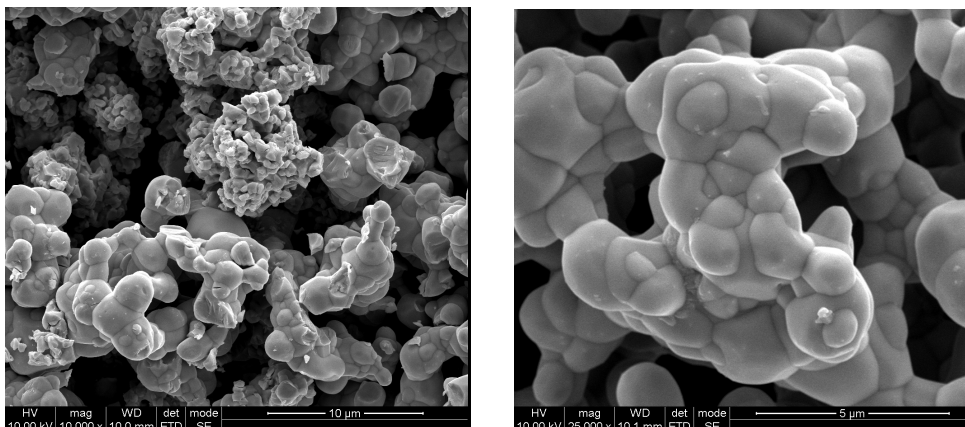
El óxido de plata (I) se adquirió comercialmente (Sigma-Aldrich®).

#### 3.2.2 Caracterización

A continuación se muestran diferentes técnicas que se usaron para poder caracterizar el óxido de plata.

##### ▪ MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Mediante esta técnica se pudo observar la estructura a nivel microscópico de este material comercial.



**Figura 3.18.** Microfotografía de SEM donde se muestra la morfología del material comercial  $Ag_2O$

En las fotografías de la Figura 3.18, podemos observar la morfología y agrupación de las partículas de óxido de plata. Se tratan de agrupaciones irregulares con aristas redondeadas de tamaño elevado (5-8  $\mu\text{m}$ ). Estas agrupaciones están formadas por gránulos individuales de tamaño variable, desde 1  $\mu\text{m}$  a 3  $\mu\text{m}$ .

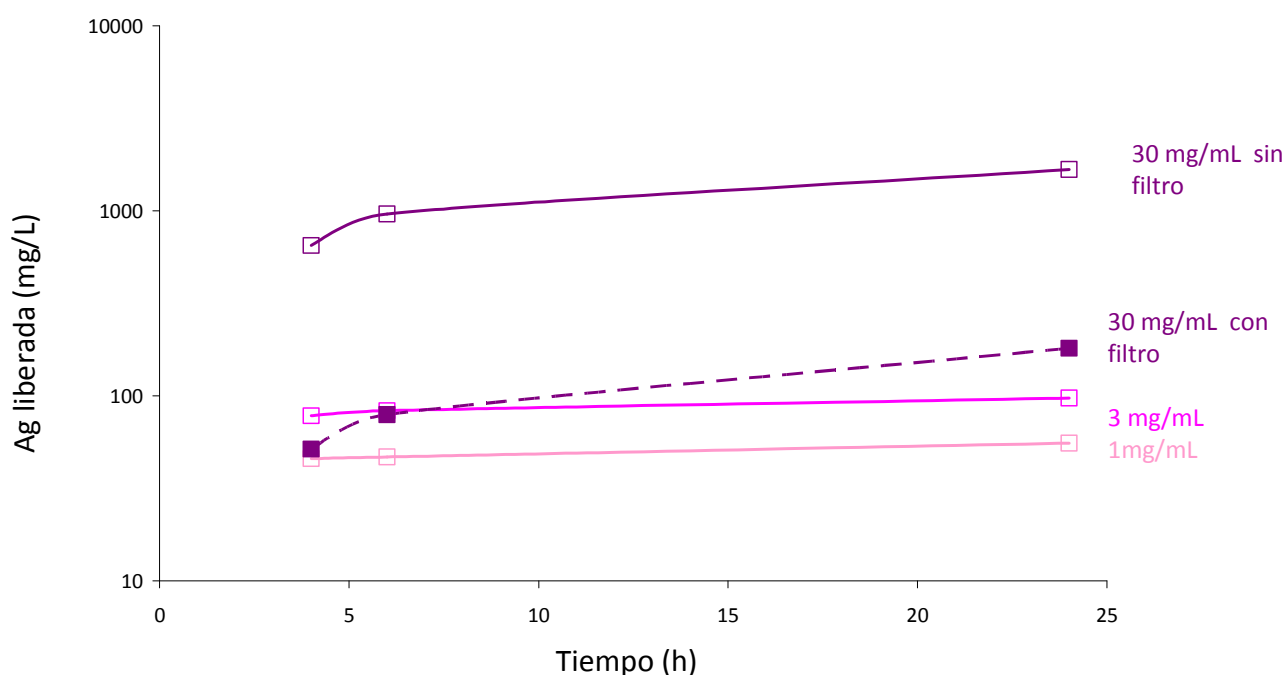
### ▪ ESPECTROSCOPÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA

Con esta técnica se comprobó la liberación de plata al medio de cultivo TSB.

Con todos los materiales se ha utilizado una concentración de 30 mg de material por mL de medio de cultivo TSB. Pero con este material, como se ve en la Figura 3.19, a esta concentración se liberaba una gran cantidad de plata, por lo que se decidió usar dos concentraciones más bajas de 3 mg/mL y 1 mg/mL.

Se pudo observar que gracias al filtro de tamaño de corte de 5 nm, se redujo la cantidad de plata activa hasta 10 veces al tiempo de 24 horas en la concentración de 30 mg/mL, siendo sin filtro de 1669,5 ppm y con filtro de 180,84 ppm.

A 24 horas se liberó más plata al medio (55,51 ppm), que con la zeolita Ag-ZSM5 a concentraciones más altas de 30 mg/mL (24,677 ppm como valor medio). Esto fue debido a que dos terceras partes de la molécula de  $\text{Ag}_2\text{O}$  es plata correspondiendo a un 93% del peso del material, mientras que la Ag-ZSM5 tiene alrededor de 0,17 % en peso de plata.



**Figura 3.19.** Plata liberada procedente de  $\text{Ag}_2\text{O}$  a 4, 6 y 24 horas. 1 mg/mL  $\text{Ag}_2\text{O}$  (Rosa pálido) 3 mg/mL  $\text{Ag}_2\text{O}$  (Rosa oscuro). 30 mg/mL  $\text{Ag}_2\text{O}$  (Morado) 30 mg/mL.  $\text{Ag}_2\text{O}$  con filtro (Morado. Cuadrados llenos y líneas discontinuas)

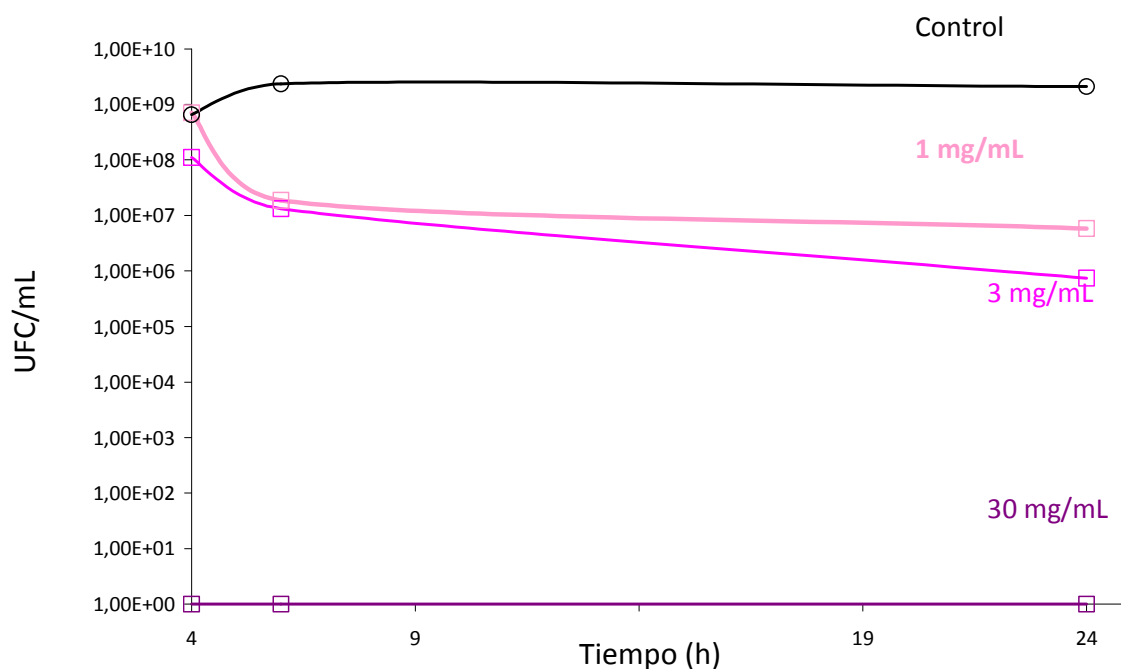
### 3.2.3 Ensayos biológicos

En este apartado se muestran los ensayos realizados con el *S.aureus* 9213 en combinación con el  $Ag_2O$  a diferentes concentraciones.

- **CON CULTIVO ESTACIONARIO Y EN FASE DE CRECIMIENTO EXPONENCIAL (CORRESPONDIENTE A LA DILUCIÓN MENOS CUATRO A PARTIR DE UN CULTIVO ESTACIONARIO)**

En la Figura 3.20, se muestran los ensayos bactericidas a diferentes concentraciones de  $Ag_2O$ . Se comprobó que a la concentración más elevada de 30 mg/mL, ya se obtuvo la total eliminación de las bacterias. Debido a esto se utilizaron concentraciones más bajas obteniendo a 24 horas con una concentración de 1mg/mL una reducción de dos unidades logarítmicas.

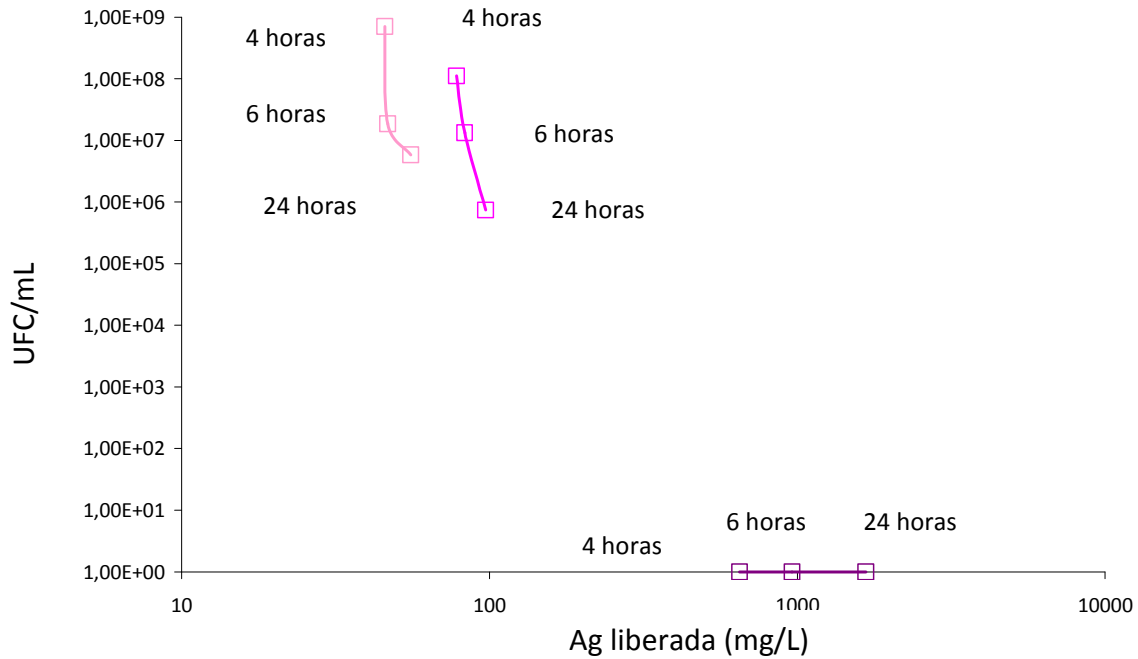
También se hicieron ensayos en fase de crecimiento exponencial con una concentración intermedia a las anteriores de 10mg/mL. Los datos no se muestran porque a tiempo de 30 minutos, ya se produjo una eliminación total de las bacterias.



**Figura 3.20.** Ensayos bactericidas con  $Ag_2O$  a 4, 6 y 24 horas. 1 mg/mL  $Ag_2O$  (Rosa pálido) 3 mg/mL  $Ag_2O$  (Rosa oscuro). 30 mg/mL  $Ag_2O$  (Morado) Control (círculos negros)

- **PODER BACTERICIDA RESPECTO A LA PLATA LIBERADA**

En este apartado, se relaciona la plata liberada al medio por parte del óxido de plata y el poder bactericida de esta. En este caso, se usaron los valores de plata liberada al medio de cultivo obtenidos sin utilizar los tubos con filtro de tamaño de corte de 5 nm.



**Figura 3.21.** Poder bactericida según la plata liberada con  $Ag_2O$  a 4, 6 y 24 horas. 1 mg/mL  $Ag_2O$  (Rosa pálido) 3 mg/mL  $Ag_2O$  (Rosa oscuro). 30 mg/mL  $Ag_2O$  (Morado)

Se pudo observar, que concentraciones muy bajas de este compuesto (1mg/mL) liberan gran cantidad de plata al medio (55,51 ppm). También se comprobó, que altas concentraciones de material (30 mg/mL), liberan gran cantidad de plata (1669,5 ppm) al medio de cultivo las cuales consiguen la eliminación total de las bacterias.

Gracias a estos experimentos, se ha podido observar la gran biodisponibilidad de la plata en forma de óxido de plata y su gran poder bactericida, ya demostrado por Djokic y Burell [344] haciendo películas de óxido de plata que inhibían totalmente el crecimiento bacteriano. Las mismas películas como plata metálica no producían efecto biocida alguno.

### RESUMEN DEL PODER BACTERICIDA DE LOS MATERIALES CON PLATA IÓNICA USADOS

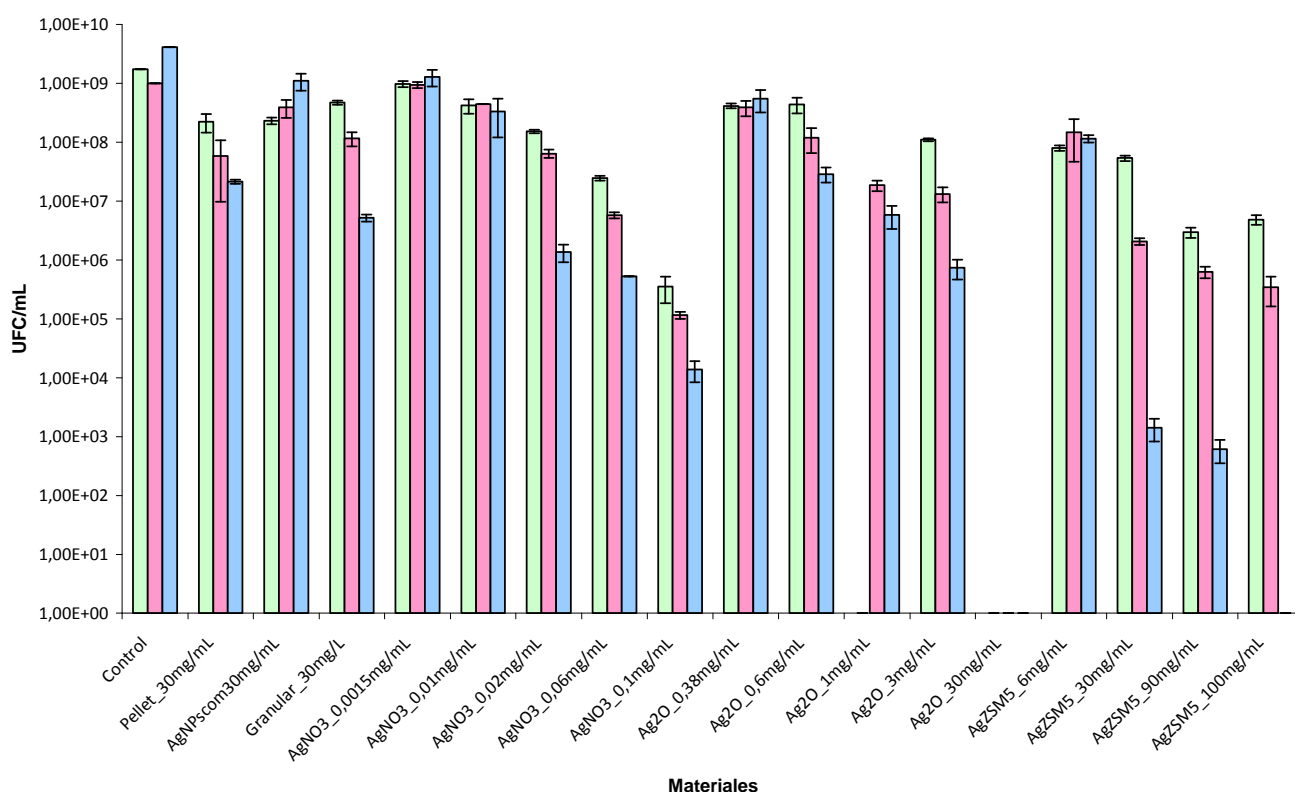
Cuando se trabaja con materiales que contienen plata, la correlación entre su efecto bactericida y la cantidad total de plata presente en el medio de cultivo puede ser engañosa.

Hubo que tener en cuenta diferentes parámetros para dilucidar el efecto bactericida de la plata en los materiales, como es el estado de la plata cuando está en contacto con la bacteria (iones, la combinación de ellos, los grupos, los complejos, sales parcialmente solubles o insolubles, etc), los medios de cultivo, la presencia o ausencia de bacterias, tamaño de partícula, cristalinidad, etc. [153].

En la Figura 3.22, se realiza un resumen del poder bactericida de los diferentes materiales mencionados en este capítulo. Además se han añadido diferentes

concentraciones de  $\text{AgNO}_3$ , cuyo poder bactericida ha sido muy estudiado debido a la rápida biodisponibilidad del ión plata al disociarse la sal. También se incluye unas nanopartículas de plata de 100 nm (Sigma-Aldrich®) para tener una referencia de plata metálica.

También se añadieron tres concentraciones nuevas de Ag-ZSM5: 6 mg/mL, 90 mg/mL y 100 mg/mL, lográndose con esta última a 24 horas la eliminación total de las bacterias. No se mencionaron anteriormente porque no estaban vinculadas con los estudios realizados.



**Figura 3.22.** Poder bactericida de los materiales. 4 horas (verde), 6 horas (rosa) y 24 horas (azul)

Para los diferentes materiales a prueba, su efecto bactericida se ordena según la siguiente secuencia:

**$\text{AgNO}_3$  >  $\text{Ag}_2\text{O}$  > Ag-ZSM5 > zeolita comercial granular > zeolita comercial en forma de pellets > nanopartículas de plata.**

De esta manera se puede concluir que el material con la mayor biodisponibilidad de plata iónica es el que presenta mayor poder bactericida tiene [153]. Sin embargo, se podría pensar en la baja solubilidad que tiene el  $\text{Ag}_2\text{O}$ , ampliamente estudiada a lo largo de la bibliografía. Algunos de los primeros datos estudiados fueron de 26,2 mg/L [345], y del orden de  $10^{-4}$  M ó  $10^{-6}$  M, según hubiera o no KOH en el medio

respectivamente [346]. En fichas técnicas más recientes nos indican una solubilidad de 0.2 ppm [347]. Desde el punto de vista de su aplicación, esto podría representar una ventaja ya que el sólido actuaría como reservorio desde el cual se irían lentamente liberando iones  $\text{Ag}(\text{OH})_2^-$  al medio acuoso [196]. De esta manera, la liberación de plata sería cuasi-continua, y aunque la solubilidad es muy baja, la plata podría reponerse a medida que se elimina del medio de cultivo. Se ha de tener en cuenta que en este material un 93% del peso corresponde a plata, que proporciona una alta capacidad de acción bactericida, a diferencia de los otros materiales zeolíticos ensayados.

## Capítulo 4

### Plata metálica

#### 4.1 SBA15 FIBROSA

- 4.1.1 Síntesis
- 4.1.2 Funcionalización con APTES
- 4.1.3 Pastillas de SBA 15
- 4.1.4 Síntesis de nanopartículas de plata *in situ*
- 4.1.5 Caracterización
- 4.1.6 Ensayos bactericidas

#### 4.2 MCM-41

- 4.2.1 Síntesis
- 4.2.2 Pastillas de MCM 41
- 4.2.3 Síntesis de nanopartículas de plata *in situ* sobre la MCM 41 con nanopartículas magnéticas
- 4.2.4 Caracterización
- 4.2.5 Ensayos biológicos

#### 4.3 ZSM5

- 4.3.1 Síntesis: Obtención de Ag-ZSM5
- 4.3.2 Síntesis de AgNPs *in situ*
- 4.3.3 Caracterización
- 4.3.4 Ensayos biológicos

#### 4.4 NANOPARTÍCULAS DE PLATA COMERCIALES

- 4.4.1 Procedencia
- 4.4.2 Caracterización
- 4.4.3 Ensayos bactericidas

#### 4.5 NANOHILOS DE PLATA

- 4.5.1 Síntesis hidrotermal de los nanohilos de plata
- 4.5.2 Caracterización
- 4.5.3 Ensayos bactericidas



## 4 PLATA METÁLICA

En este capítulo se muestra la síntesis, caracterización y resultados de los ensayos bactericidas de todos aquellos materiales basados en plata metálica.

### 4.1 SBA15 FIBROSA

#### 4.1.1 Síntesis

La SBA 15, es un material mesoporoso silíceo con un tamaño de poro entre 9 y 10 nm. Su síntesis se llevó a cabo siguiendo el procedimiento experimental descrito por Katiyar, A., y colaboradores [348] y con la colaboración de Daniel Carmona Rioja: Para ello se mezclaron:

- 4 g de P123, copolímero de bloque basado en Polietilen glicol-polipropilen glicol-polietilen glicol (Sigma-Aldrich®).
- 104 mL de agua destilada.
- 20 mL (2 M) de ácido clorhídrico (Panreac®).
- 8,4 g de TEOS, Tetraetil ortosilicato (Sigma-Aldrich®).

Las soluciones se agitaron durante 24 horas a 35°C o a 60°C, para ser envejecidas posteriormente a 100°C ó 120°C respectivamente durante 3 días. El sólido que se obtuvo se lavó y filtró con agua destilada varias veces y se dejó secar a temperatura ambiente. Para eliminar el agente estructurante fue necesario calcinar el sólido a 550 °C durante 6 horas, con una velocidad de ascenso de temperatura de 1°C/minuto. La velocidad de descenso de la temperatura fue de 5°C/minuto [348].

#### 4.1.2 Funcionalización con APTES

La funcionalización superficial del material se realizó mediante silanización con APTES (3-Aminopropilo) trietoxisilano (Sigma-Aldrich®) con el objetivo de obtener una carga negativa al pH de trabajo, para que posteriormente en la síntesis de nanopartículas de plata *in situ*, el ión plata procedente del nitrato plata, se uniese electrostáticamente en el material.

Para realizarla se introdujo 1 g de SBA 15 en un matraz de 3 bocas, conectado a una columna de reflujo y cerrado con *septums*. Seguidamente se conectó una corriente de argón para evitar la presencia de humedad que pudiese hidrolizar el APTES. Posteriormente, se añadieron alrededor de 20 mL de tolueno anhidro (Sigma-Aldrich®) y se puso bajo agitación. Mediante un baño de aceite alrededor del matraz se aumentó la temperatura hasta 110°C, que es la temperatura de ebullición del tolueno. Cuando se empezó a observar el reflujo del disolvente, se añadió el agente funcionalizante APTES a través del *septum* y se dejó entre 7 u 8 horas en estas condiciones. Pasado este tiempo, se dejó enfriar y se filtró el material. Se lavó tres veces con tolueno y se secó a temperatura ambiente, obteniéndose la SBA 15 funcionalizada con APTES (llamada SBA 15-APTES).

### 4.1.3 Pastillas de SBA15

Al igual que con la zeolita ZSM5, se quiso evaluar si las bacterias formaban *biofilm* sobre la superficie de la SBA15 de una manera natural. Para ello, se hicieron pastillas de 200 mg de 13 mm de diámetro las cuales llevaban un 12 % en peso del ligante utilizado anteriormente con la ZSM5, el fluoruro de polivinilideno (Sigma-Aldrich) con el objeto de dar consistencia estructural al composite. Se mezclaron 176 mg de SBA15 y 24 mg de fluoruro de polivinilideno en presencia de acetona. Una vez evaporada la acetona a temperatura ambiente, se realizaron las pastillas en una prensa hidráulica con una presión de 10 Ton durante 2 minutos. Como con las pastillas de ZSM5, se observó que la presencia de esta sustancia ligante facilitaba la formación de *biofilm*. Los estudios previos demostraron que las bacterias tenían una especial afinidad por formar *biofilm* sobre el ligante. Además al igual que con la ZSM5, se observó mediante microscopía óptica que dicho ligante no quedó uniformemente repartido por la pastilla, por lo que los estudios de formación de *biofilm* no fueron reproducibles y por lo tanto fueron descartados.

### 4.1.4 Síntesis de nanopartículas de plata *in situ*

Para la síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs) *in situ* [349-351], se utilizaron dos concentraciones de plata diferentes:

- Nitrato de plata 0,1 M (Panreac® Barcelona, España) en un volumen de disolución de AgNO<sub>3</sub> de 100 mL.  
(SBA 15-APTES con elevada concentración de AgNPs que se denominará **SBA 15-APTES-Ag-A**)
- 12 mL de Nitrato de plata solución standard para absorción atómica 1% en peso (HNO<sub>3</sub>) de 1000 ppm (Sigma-Aldrich®).  
(SBA 15-APTES con baja concentración de AgNPs que se denominará **SBA 15-APTES-Ag-B**)

En ambos casos se puso en contacto 1 g de SBA15-APTES con dichas disoluciones durante 24 horas bajo agitación, en ausencia de luz a temperatura ambiente en recipientes cerrados. Pasado este tiempo el material fue filtrado con filtros (de 1-3 micras, Prat Dumas). El material obtenido se dejó secar a temperatura ambiente, en ausencia de luz. Seguidamente, tras la impregnación, se redujo la plata iónica enlazada electrostáticamente a los grupos amino del material mesoporoso para formar las AgNPs. Para ello, fue necesario añadir una solución en agua destilada, de un agente reductor fuerte como es el Borohidruro de Sodio NaBH<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich® Saint Louis, MO, USA) con concentración de 0,05 M, a una determinada cantidad de SBA15 APTES intercambiada con AgNO<sub>3</sub>.

Las condiciones fueron las siguientes:

- Para obtener el material con elevada concentración de AgNPs:

**Tabla 4.1.** Obtención de elevada concentración de AgNPs

Material	Cantidad
SBA 15-APTES-Ag-A	0,53 g
NaBH <sub>4</sub>	0,05 M
Volumen H <sub>2</sub> O destilada	100 mL
COLOR	<b>MARRÓN</b>

- Para obtener el material con baja concentración de AgNPs:

**Tabla 4.2.** Obtención de baja concentración de AgNPs

Material	Cantidad
SBA 15-APTES-Ag-B	1 g
NaBH <sub>4</sub>	0,05 M
Volumen H <sub>2</sub> O	200 mL
COLOR	<b>GRIS</b>

Esta dispersión se agitó manualmente hasta que ésta dejara de burbujear, es decir, hasta que se dejara de liberar hidrógeno generado por la hidrólisis del NaBH<sub>4</sub>, y por tanto terminara su capacidad reductora. El material se filtró, y se dejó secar a temperatura ambiente en la oscuridad.



**Figura 4.1.** Fotografía óptica mostrando el aspecto de la SBA15 APTES, con y sin AgNPs. **A)** SBA 15-APTES-Ag-A **B)** SBA 15- APTES. **C)** SBA 15-APTES-Ag-B. Se observa como la SBA 15-APTES-Ag-A adquiere un color marrón oscuro debido a la elevada concentración de AgNPs, mientras que en la SBA 15-APTES-Ag-B se aprecia solo un ligero cambio de color a grisáceo respecto a la SBA 15-APTES debido a la baja concentración de AgNPs que posee

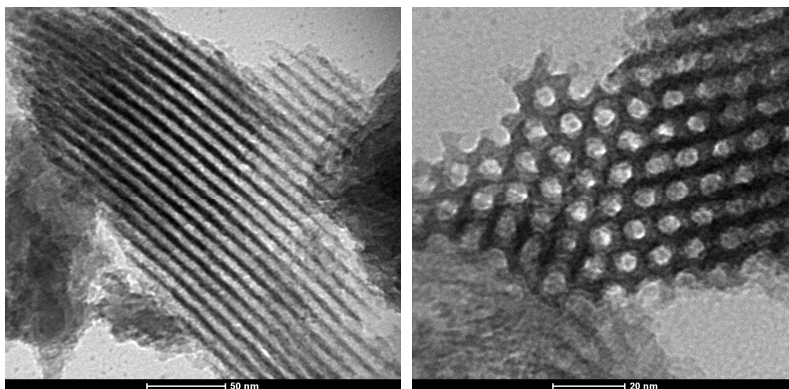
Finalmente, los materiales obtenidos se guardaron en viales siempre en ausencia de luz.

#### 4.1.5 Caracterización

A continuación se muestran diferentes técnicas resultados de caracterización de la SBA 15-APTES con y sin AgNPs a elevada o baja concentración.

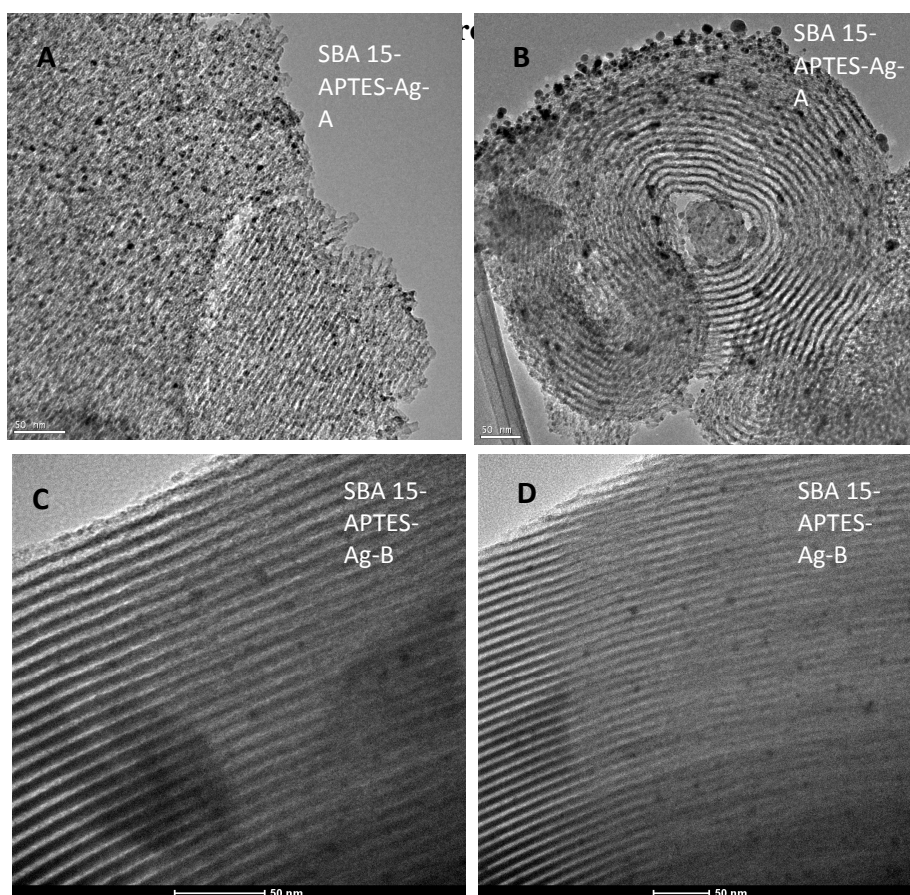
▪ MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Mediante esta técnica se pudo visualizar la estructura mesoporosa de este material (canales, poros, morfología de partícula). En la Figura 4.2 se muestra la morfología de la SBA 15-APTES, donde se puede observar que el tamaño de poro esta entre 7 y 8 nm.



**Figura 4.2.** Imagen de TEM mostrando la morfología de la SBA15-APTES. Se pueden observar la estructura de planos y los poros de este material

En la siguiente Figura 4.3, se puede observar la presencia de AgNPs sintetizadas *in situ* dentro de la estructura de la SBA 15-APTES. Mediante EDX se corroboró que dichas partículas correspondían a plata.

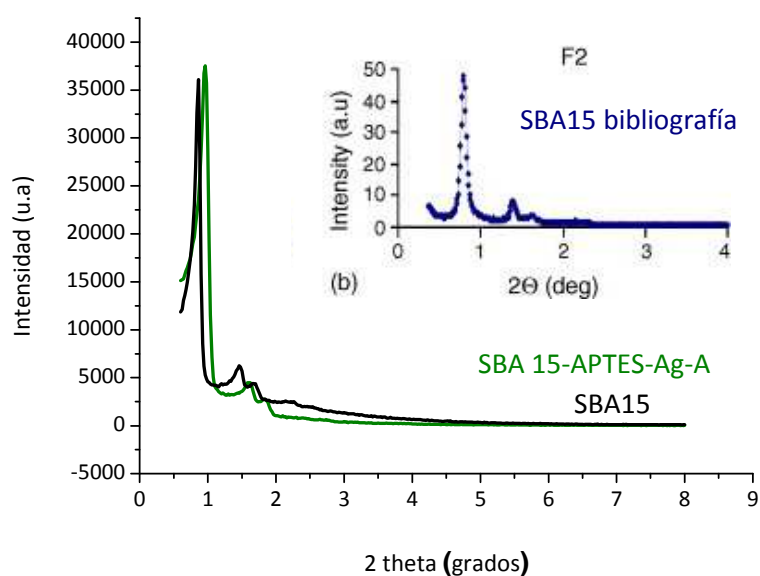


**Figura 4.3.** Imagen de TEM mostrándose la SBA15-APTES **A)** y **B)** SBA15-APTES-Ag-A, **C)** y **D)** SBA15-APTES-Ag-B. Se puede observar la elevada concentración de AgNPs en SBA15-APTES-Ag-A comparada con la baja frecuencia de estas en SBA15-APTES-Ag-B

Las microfotografías del TEM, permitieron corroborar que, como era previsible, la cantidad de AgNPs era mayor en la muestra sintetizada con una concentración 0,1 M de  $\text{AgNO}_3$ , es decir, las que se habían sintetizado con la concentración más elevada de  $\text{AgNO}_3$ . En ambos casos se observó que el tamaño de la mayoría de las nanopartículas estaba entre 6 nm y 8 nm, con la presencia de algún agrupamiento más grande de plata aislado fuera de la estructura porosa del material.

#### ▪ DIFRACCIÓN DE RAYOS X A ÁNGULO BAJO.

En la Figura 4.4, se muestra el difractograma de rayos X de ángulo bajo con los picos característicos de la SBA 15 fibrosa obtenidos en la bibliografía, comparada con la SBA 15 sintetizada en el laboratorio y la SBA 15-APTES con elevada concentración de nanopartículas de plata.



**Figura 4.4.** SAXRD de la SBA15 (negro), SBA 15-APTES-Ag-A (verde). Inset: SAXRD bibliografía [348]

Se observó un desplazamiento de los picos hacia valores mayores en el caso de la SBA15 con elevada concentración de AgNPs, lo que corresponde a distancias entre planos menores.

En ambos casos, aparecen los tres picos definidos en la bibliografía, lo que demuestra que se mantiene la estructura ordenada mesoporosa tras sintetizar nanopartículas en el interior de los poros.

#### ▪ ADSORCIÓN DE NITRÓGENO

Mediante la adsorción de nitrógeno se determinó la superficie específica de cada tipo de material así como la distribución de tamaños de poro en cada caso.



**Tabla 4.3.** Resultados de la caracterización superficial mediante adsorción de nitrógeno

Material	Área superficial BET (m <sup>2</sup> /g)	Tamaño de poro (nm)
SBA15	954,42	9,1
SBA15-APTES-Ag-A	351,47	7,4

Como se esperaba, cuando el material fue funcionalizado y se sintetizaron las AgNPs tanto el área superficial como el tamaño de poro disminuyeron, lo que se atribuyó a un bloqueo parcial de los poros por parte de las nanopartículas generadas.

#### ▪ ESPECTROSCOPÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA

Para determinar la cantidad de plata que contenía el material, se hizo una digestión de éste con agua regia, tal y como se realizó con los diferentes lotes de la zeolita Ag-ZSM5, pero modificando ligeramente el protocolo. Para ello, se dispersaron 20 mg de la muestra a digerir en 20 mL agua regia y se sometieron a tratamiento hidrotermal a 200°C durante 25 minutos en un horno de microondas (Milestone®, Ethos plus).

Una vez terminada esta primera digestión se sacó la muestra y se añadieron 10 mL de ácido fluorhídrico (Panreac®) que se dejó actuar durante toda una noche. Al día siguiente las muestras se traspasaron a un matraz donde se aforaron a 50 mL con agua destilada.

Estas muestras fueron analizadas mediante espectroscopía de absorción atómica obteniéndose para cada muestra la concentración de plata presente en cada disolución. Los resultados se muestran en la tabla siguiente:

**Tabla 4.4.** Resultados de % en peso de plata de las muestras SBA15 conteniendo AgNPs

Material	% en peso de plata
SBA 15-APTES-Ag-A	1,98%
SBA 15-APTES-Ag-B	0,34%

Por medio de estos cálculos se pudo observar que la SBA15-APTES-Ag-A, tenía casi 6 veces más de plata que la SBA15-APTES-Ag-B. En ambos casos se obtuvo un porcentaje en peso de plata mucho mayor que el obtenido para la zeolita Ag-ZSM5, que era de 0,175% en peso. Sin embargo, en el caso de la SBA15 la plata se encuentra como plata metálica (Ag<sup>0</sup>) al ser reducida por el borohidruro sódico, mientras que en la Ag-ZSM5, la mayoría de la plata se encuentra en forma de ión plata (Ag<sup>+</sup>) al estar intercambiada dentro de la red zeolítica, y por tanto su disponibilidad es inmediata.

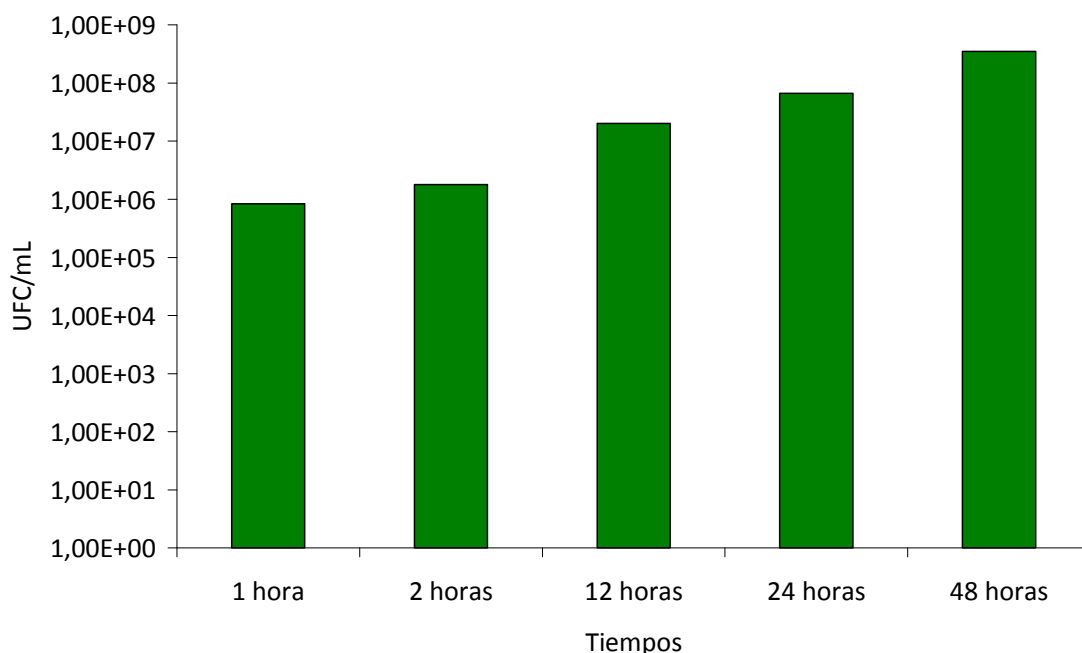
#### 4.1.6 Ensayos bactericidas

En ese apartado se muestran los resultados de los experimentos antimicrobianos llevados a cabo sobre la bacteria *S.aureus* cepa 9213, con la SBA15 con y sin plata incorporada en su estructura.

▪ ESTUDIOS DE FORMACIÓN DE *BIOFILM* SOBRE PASTILLAS DE SBA15

Con este ensayo se observó la formación de *biofilm* sobre las pastillas de zeolita SBA15 en ausencia de plata. Se pretendía conocer, si, al igual que con la NH<sub>4</sub>-ZSM5, partíamos de un material en el que se formaba *biofilm* de una manera natural siendo fácilmente colonizable. Se pudo concluir que así era, y que también la presencia del ligante en la pastilla, facilitaba aún más la formación de *biofilm*. Los resultados no son concluyentes, ya que, como se ha dicho anteriormente, la capacidad de ser colonizada depende de la superficie y en muchos casos de la cantidad de ligante o de material silíceo en superficie no es reproducible ya que depende de las condiciones de mezclado y de compresión, quedando en unos casos mucho ligante en superficie y en otros no pese a seguir siempre el mismo protocolo de mezcla y compresión.

En la Figura 4.5 se muestran los resultados de colonización bacteriana observándose que la cinética de formación de *biofilm* es muy similar y comparable con la de la NH<sub>4</sub>-ZSM5 estudiada en el capítulo anterior.



**Figura 4.5.** Formación de *biofilm* sobre pastillas de SBA15 con 12% en peso de ligante

▪ ESTUDIOS BACTERICIDAS

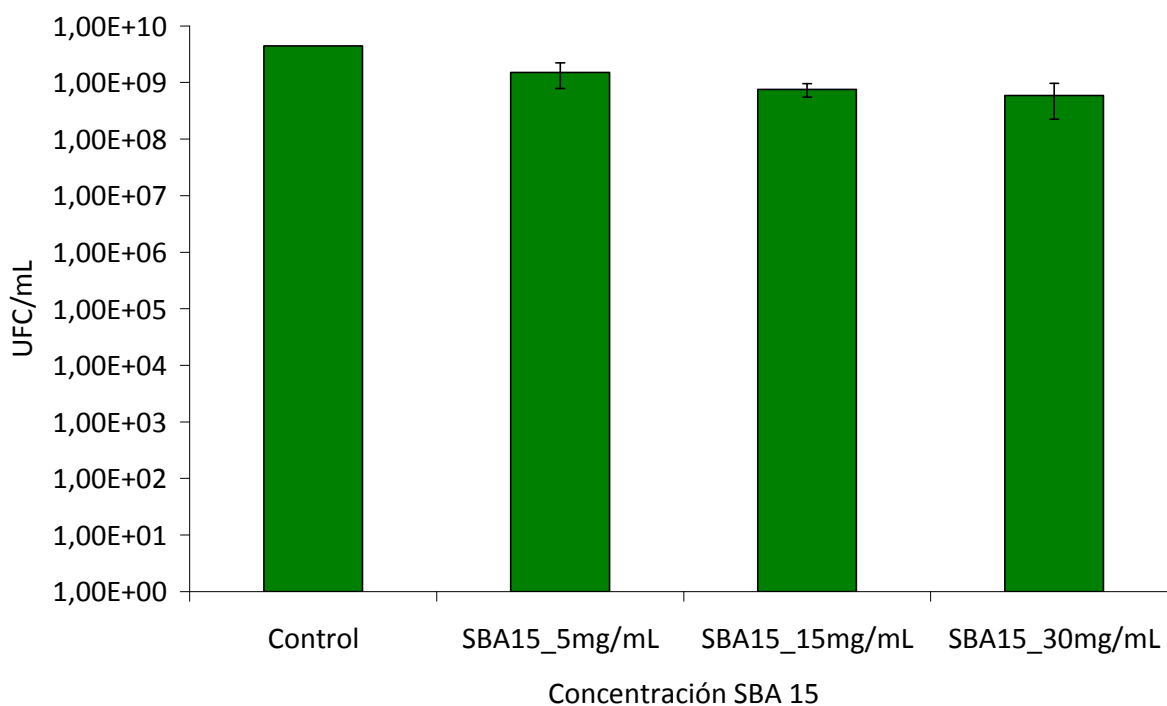
En este apartado se llevaron a cabo los ensayos bactericidas con *S.aureus* cepa 9213 en fase de crecimiento estacionario y las diferentes variantes de la SBA15 con y sin plata en su estructura como materiales particulados.

### 1. Concentración utilizada de SBA15

La SBA15 es un material mesoporoso amorfo y como otras sílices amorfas presenta una ligera solubilidad en agua para dar ácido silícico alcanzándose una concentración de saturación de hasta 116 ppm [352], la cual es tóxica para las bacterias.

Debido a esto, lo primero que se hizo, fue comprobar qué concentración de material no era tóxica *per se* para las bacterias. Se analizaron a un tiempo de 24 horas, tres concentraciones: la que se ha usado con todos los materiales 30mg/mL, y además 15 mg/mL y 5 mg/mL. Los resultados aparecen en la Tabla 4.5 y en la Figura 4.6.

La concentración de 30 mg/mL tiene un efecto bactericida moderado, produciéndose un descenso de una unidad logarítmica respecto del control en el número de unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL). La mínima concentración usada no tiene poder bactericida, pero por facilidad de manipulación se escogió la concentración intermedia que tenía un muy ligero poder bactericida de poco más de media unidad logarítmica.



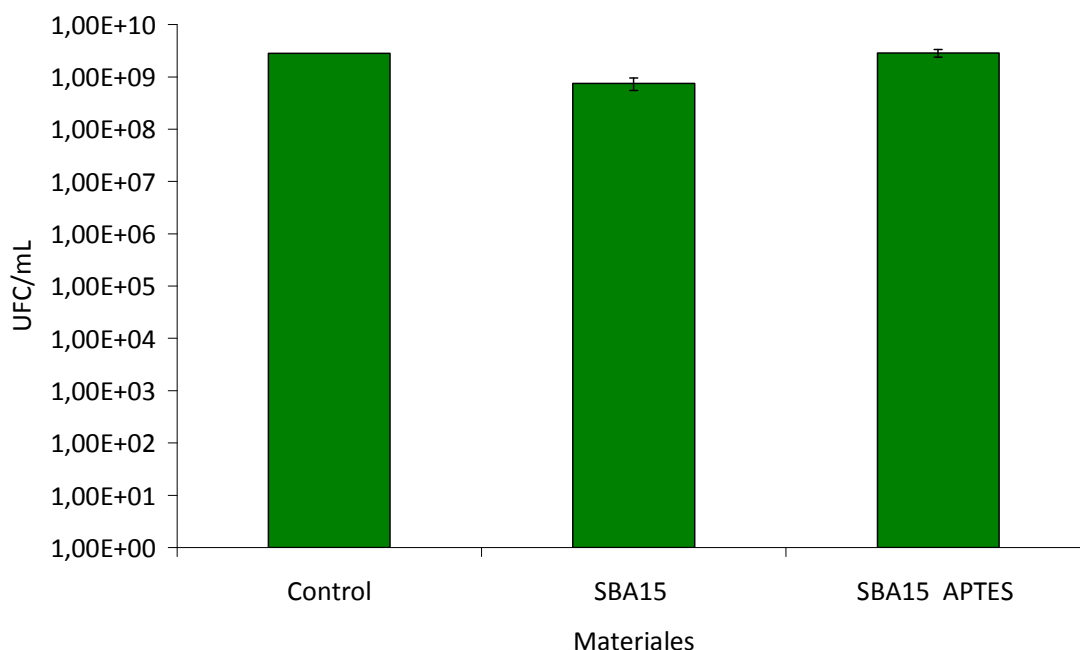
Concentración material	SBA15 5 mg/mL		SBA15 15 mg/mL		SBA15 30 mg/mL		Control
	Media (UFC/mL)	SD	Media (UFC/mL)	SD	Media (UFC/mL)	SD	
<b>Tiempo (h)</b>							
<b>24</b>	1,51x10 <sup>9</sup>	725962962	7,53x10 <sup>8</sup>	197989899	5,93x10 <sup>8</sup>	367695526	4,45x10 <sup>9</sup>

**Figura 4.6 y Tabla 4.5.** Concentraciones de SBA15 evaluadas y su poder bactericida



## 2. Toxicidad de SBA15-APTES

Se evaluó el poder bactericida de las muestras tras la funcionalización con APTES. Para ello, los experimentos se realizaron con la concentración de 15 mg/mL elegida anteriormente.



Material	SBA15		SBA15-APTES		Control
	Media (UFC/mL)	SD	Media (UFC/mL)	SD	Media (UFC/mL)
<b>24</b>	7,53x10 <sup>8</sup>	725962962	2,27x10 <sup>9</sup>	197989899	2,81x10 <sup>9</sup>

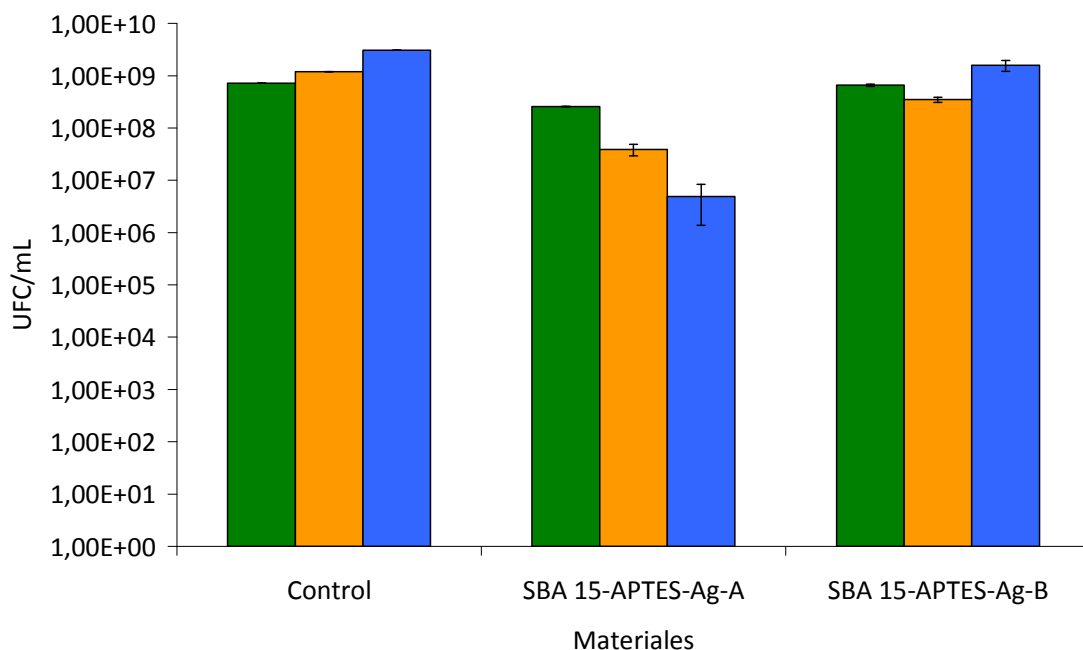
**Figura 4.7 y Tabla 4.6.** Comparación entre SBA15 y SBA15-APTES y su poder bactericida

Con este experimento, se pudo demostrar que la funcionalización del material no añade poder bactericida, ya que los datos obtenidos en ambos materiales están dentro del rango de media unidad logarítmica comparada con el control. Por lo que el material es inocuo para las bacterias a las dosis ensayadas. Las hojas de seguridad de APTES proporcionadas por la casa comercial, nos indican toxicidad por contacto, ingestión e inhalación para los humanos, pero no se ha demostrado genotoxicidad sobre varias especies bacterianas [353].

## 3. Ensayos de SBA15-APTES con AgNPs a diferentes concentraciones

En este experimento, se comprobó el efecto bactericida de la SBA 15-APTES-Ag-A y SBA 15-APTES-Ag-B.

Los experimentos se realizaron con la concentración de 15 mg/mL, a 4, 6 y 24 horas.



Material	SBA15-APTES-Ag-A		SBA15-APTES-Ag-B		Control
Tiempo (h)	Media (UFC/mL)	SD	Media (UFC/mL)	SD	Media (UFC/mL)
4	2,58x10 <sup>8</sup>	3482108,06	6,57 x10 <sup>8</sup>	28912810,6	7,2x10 <sup>8</sup>
6	3,91x10 <sup>7</sup>	9553798,29	3,5 x10 <sup>8</sup>	38556313,4	1,21x10 <sup>9</sup>
24	4,87x10 <sup>6</sup>	3482108,06	1,59 x10 <sup>8</sup>	377123617	3,07x10 <sup>9</sup>

**Figura 4.8 y Tabla 4.7.** Ensayos de SBA15-APTES-Ag-A y SBA15-APTES-Ag-B a 4 horas (verde), 6 horas (naranja) y 24 horas (azul)

Se comprobó, como cabía esperar, que el mayor efecto bactericida fue producido por la SBA 15-APTES que tenía una mayor concentración de AgNPs, la mayor reducción se produjo a las 24 horas, con una disminución de tres unidades logarítmicas respecto del control (obteniéndose valores de  $4,87 \times 10^6$  UFC/mL).

Sin embargo, la reducción no fue tan alta como la que producía la zeolita Ag-ZSM5 a 24 horas, con una disminución de entre cuatro y nueve unidades logarítmicas respecto al control. Esto puede explicarse debido a que el gran efecto bactericida observado en el caso de la zeolita es producido por la plata iónica. En dicho material la biodisponibilidad del ión plata es inmediata, mientras que en el caso de los materiales mesoporosos la plata se encuentra como plata metálica ( $Ag^0$ ), por tanto, dicha biodisponibilidad depende de un fenómeno de disolución difusión por el cual la plata metálica (constituyente de la nanopartícula) se tiene que disolver liberando al medio el ión plata. Es importante mencionar que en el caso de la zeolita incluso teniendo casi 10 veces menos de porcentaje en peso de plata (0,17% en peso de plata en Ag-ZSM5 y 1,98% en peso de plata en SBA 15-APTES-Ag-A) su poder bactericida es mucho mayor.

## 4.2 MCM 41

La MCM41, es un material mesoporoso silíceo con un tamaño de poro entre 3 y 5 nm. En este apartado se trabajó con dos tipos de MCM41. Una sintetizada en nuestro laboratorio y otra facilitada por el grupo del Dr. King Lun Yeung de la Universidad de Ciencia y Tecnología de Hong Kong, que incorporaba nanopartículas magnéticas en su estructura, lo que facilitaba su retirada tras su utilización en medio líquido con la ayuda de un simple imán permanente.

### 4.2.1 Síntesis

La síntesis de MCM41 que se llevo a cabo en nuestro laboratorio se realizó siguiendo el protocolo descrito por Xinqing Chen, Koon Fung Lam, King y Lun Yeung [354]. Brevemente:

A 1 L de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (Panreac<sup>®</sup>) a una concentración de 1,1 N se añadieron 4 g de CTABr, Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) que se agitaron magnéticamente hasta total disolución del agente surfactante. Seguidamente se añadieron 16 mL de TEOS, Tetraetil ortosilicato (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>). El pH de la disolución resultante se ajusto a 11,5 añadiendo  $\text{NH}_4\text{OH}$  bajo fuerte agitación magnética. De esta manera, a las 2 horas se obtuvo una síntesis de 20 g de sólido. Una vez pasado este tiempo, la solución se filtró y se lavó abundantemente con agua destilada caliente, finalizando con dos lavados con etanol 96% v/v (Panreac<sup>®</sup>). Así el sólido que se obtuvo, se dejó secar a temperatura ambiente. Cuando este estuvo seco, se eliminó el agente estructurante (CTABr) mediante calcinación a 550°C durante 8 horas, con una rampa de temperaturas de 1°C/minuto. Así, finalmente se obtienen unas partículas con estructura tipo MCM-41 de alrededor de 1 micrómetro.

### 4.2.2 Pastillas de MCM 41

Al igual que con la zeolita ZSM5 y la SBA15, se quiso investigar si las bacterias formaban *biofilm* sobre la MCM 41 sintetizada en el laboratorio de una manera natural, en pastillas de 13 mm de diámetro. Para ello, se hicieron pastillas de 140 mg las cuales llevaban un 12 % en peso del ligante utilizado anteriormente con la ZSM5 y la SBA 15, el fluoruro de polivinilideno (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>). Se mezclaron 123,2 mg de SBA 15 y 16,8 mg de fluoruro de polivinilideno en presencia de acetona. Una vez evaporada la acetona a temperatura ambiente, se realizaron las pastillas con una presión de 12 Ton durante 1 minuto y 30 segundos.

Como con las pastillas de ZSM5 y de SBA15, se observó que la presencia de esta sustancia ligante facilitaba la formación de *biofilm*. Los mismos problemas de reproducibilidad mostrados anteriormente fueron observados para estas pastillas.

### 4.2.3 Síntesis de nanopartículas de plata *in situ* sobre la MCM 41 con nanopartículas magnéticas

Para la síntesis *in situ* de nanopartículas de plata (AgNPs) en la MCM41 con nanopartículas magnéticas (MCM41-MagNPs), se utilizó el mismo método usado para la síntesis de SBA 15-APTES-Ag-A.

- 0,1 M de Nitrato de plata (Panreac®) en un volumen de 100 mL.

Se impregnó con la disolución de  $\text{AgNO}_3$ , 1 g de MCM41-MagNPs durante 24 horas en ausencia de luz, a temperatura ambiente y bajo agitación en un agitador orbital (IKA®, modelo KS130). Después, el material se filtró. El material se dejó secar a temperatura ambiente en ausencia de luz. Seguidamente, para reducir la plata iónica y formar las AgNPs se utilizó el mismo protocolo mencionado anteriormente con la SBA 15-APTES, es decir se utilizó el  $\text{NaBH}_4$  como agente reductor.

Esta solución se agitó manualmente hasta que dejó de burbujear. A continuación, el material se filtró por gravedad, y se dejó secar a temperatura ambiente en oscuridad. Como se observa en la Figura 4.9 el material se oscurece considerablemente, al igual que pasaba con la SBA 15-APTES con elevada concentración de AgNPs.



**Figura 4.9.** Fotografía óptica mostrando el aspecto de la MCM 41. **A)** Sintetizada en el laboratorio. **B)** MCM41-MagNPs. **C)** MCM41-MagNPs y AgNPs. Se puede observar el color marrón oscuro que adquiere la muestra debido a la presencia de AgNPs. La presencia de nanopartículas magnéticas hace que la muestra adquiera un color anaranjado

El material, finalmente, se guardó en un vial y en ausencia de luz hasta su uso posterior.

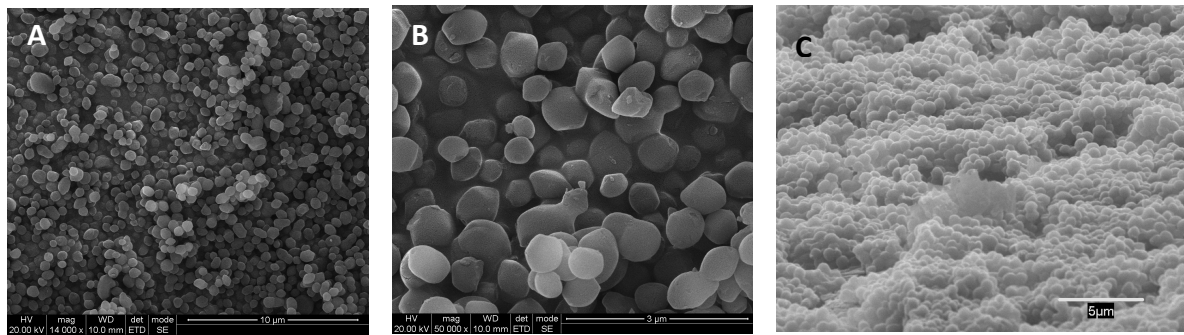
### 4.2.4 Caracterización

A continuación se muestran los resultados obtenidos con diferentes técnicas que se usaron para poder caracterizar la MCM-41 y la MCM41-MagNPs con y sin AgNPs.

#### ▪ MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Gracias a esta técnica se pudo observar la morfología de las partículas de MCM41 obtenidas mediante síntesis en el laboratorio y corroborar su forma esférica y su tamaño de alrededor de un micrómetro, tal y como se muestra en la Figura 4.10.

También podemos ver en esta Figura 4.10.C, el *biofilm* tras 48 horas de incubación formado sobre la superficie de la pastilla de MCM41, donde se puede ver una cubierta de bacterias sobre el material, y se corrobora que esta cepa forma un *biofilm* de forma natural sobre la superficie de la MCM41.

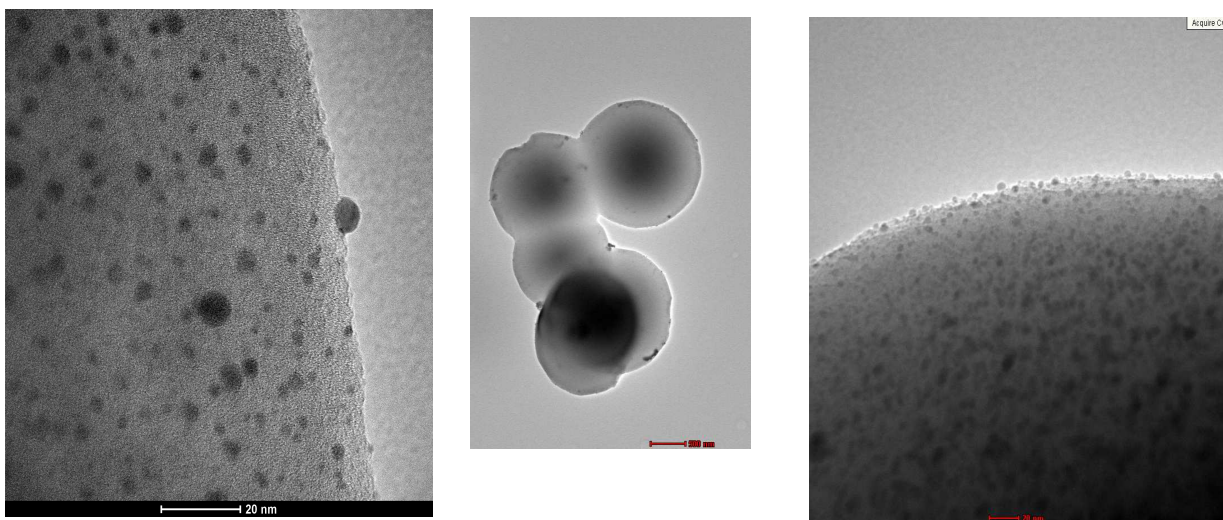


**Figura 4.10.** Microfotografías de SEM donde se mostrándose en **A) y B)** de las partículas de MCM41 sintetizadas. **C)** Biofilm de 48 horas sobre este material. Se observa como las bacterias cubren todo la muestra del material MCM41 formando un biofilm. La elevada concentración bacteriana hace incluso difícil diferenciar el material existente debajo de este biofilm

#### ■ MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Mediante esta técnica se ha observado la morfología de las AgNPs sintetizadas en la MCM41-MagNPs.

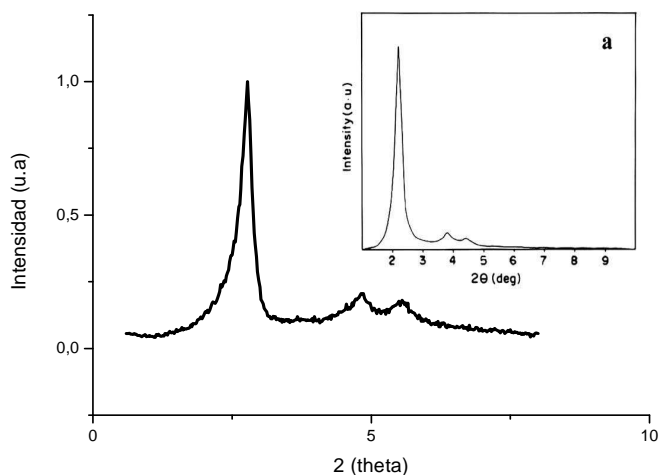
En la Figura 4.11, se han observado partículas con un tamaño medio de 4,9 nm, y valores comprendidos entre 8 nm y 2 nm. También se han observado otras partículas más grandes con un tamaño de alrededor de 20 nm. No se pudo distinguir si eran nanopartículas magnéticas o las de plata. Sin embargo, se comprobó que el material tras ser cargado con nanopartículas de plata seguía siendo atraído por un imán permanente del laboratorio.



**Figura 4.11.** Imágenes de TEM de las partículas de MCM41-Mag-NPs y AgNPs. En ellas se puede observar la variabilidad de tamaño de las nanopartículas y la dificultad para diferenciar las AgNPs de las nanopartículas magnéticas

▪ DIFRACCIÓN DE RAYOS X A ÁNGULO BAJO

A continuación, en la Figura 4.12, se muestra el SAXRD con los picos característicos de la MCM 41 obtenidos de la bibliografía, comparada con la MCM41 sintetizada en el laboratorio.



**Figura 4.12.** SAXRD de MCM41 sintetizada en el laboratorio, comparada con la bibliografía (figura pequeña) [355]

Se puede observar que la estructura de los poros y planos del material se mantienen respecto a la que aparece en la bibliografía, ya que aparecen los picos característicos de este material en la MCM41 sintetizada en el laboratorio.

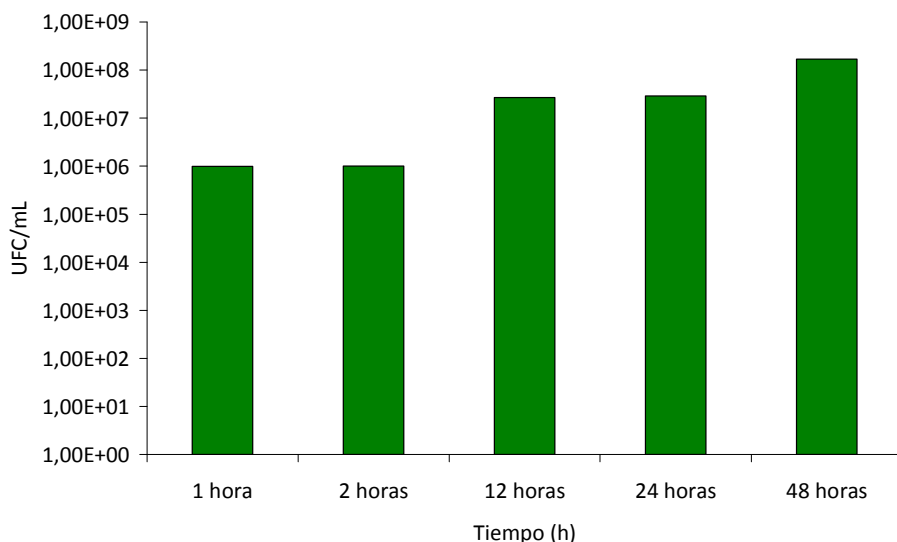
**4.2.5 Ensayos biológicos**

En ese apartado se muestran los resultados de los estudios realizados con *S.aureus* cepa 9213, con la MCM 41 sintetizada en el laboratorio y la MCM41-MagNPs con y sin AgNPs.

▪ ESTUDIOS DE FORMACIÓN DE *BIOFILM* SOBRE PASTILLAS DE MCM41

Con este experimento se pretendía conocer la posible formación de *biofilm* de forma natural, sobre pastillas de MCM41, al igual que se hizo con la zeolita NH<sub>4</sub>-ZSM5 y la SBA15.

Se pudo concluir que así era, y que también la presencia del ligante en la pastilla, facilitaba aún más la formación de *biofilm* como se ha mencionado anteriormente.

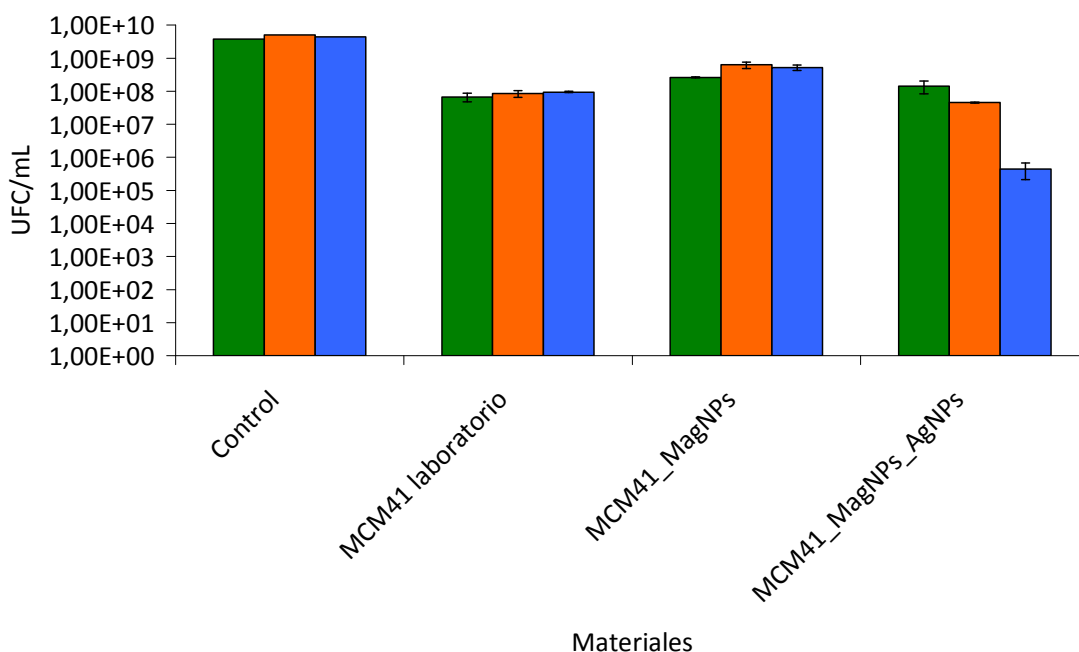


**Figura 4.13.** Formación de biofilm sobre pastillas de MCM41 sintetizada en el laboratorio con 12% de ligante

En la Figura 4.13 se puede observar que el comportamiento de la formación y el crecimiento de *biofilm* fue muy similar tanto al de la zeolita NH<sub>4</sub>-ZSM5 como al de la SBA15 estudiadas en apartados anteriores. También se puede concluir que esta cepa formadora de *biofilm* es capaz de colonizar fácilmente superficies silíceas.

#### ESTUDIOS BACTERICIDAS

En este apartado se realizaron los experimentos antimicrobianos con el *S.aureus* cepa 9213 en fase estacionaria y con las diferentes variantes de la MCM41.



**Figura 4.14.** Estudios bactericidas con las variantes de MCM 41 a 4 horas (verde), 6 horas (naranja) y 24 horas (azul)



La concentración usada en este apartado ha sido de 30 mg de material por cada mililitro de cultivo estacionario.

En la Figura 4.14 podemos observar como la MCM41 sintetizada en el laboratorio, por si misma presenta un moderado poder bactericida, probablemente causado por la liberación de ácido silícico al medio de cultivo, con una disminución de alrededor de una unidad logarítmica y media respecto al control, en todos los tiempos. Sin embargo, la MCM 41 MagNPs mostró menos efecto antimicrobiano, de alrededor de media unidad logarítmica. Esto puede ser atribuido a su menor número de grupos hidroxilo superficiales, ya que ha sido tratada térmicamente, lo cual reduce la solubilidad en medios acuosos.

Por otro lado, se pudo comprobar que la MCM41 MagNPs con AgNPs a las 24 horas produjo una disminución de cuatro unidades logarítmicas ( $4,43 \times 10^5$  UFC/mL). Aunque los resultados obtenidos son favorables y muestra potencial aplicabilidad como material biocida, no concuerdan con los datos obtenidos con la SBA 15 con la misma concentración de AgNPs a 24 horas que fueron de  $1,57 \times 10^8$  UFC/mL. Esto puede ser debido a que la combinación de ambas nanopartículas tenga efectos bactericidas sinérgicos como ya ha sido demostrado anteriormente [356], algo que también se ha comprobado cuando la plata se combina con otros metales nobles como el platino atribuido a un aumento de la oxidación de la plata a través de la sustitución galvánica producida por la reacción redox entre la plata y el platino [357]. O también puede ser potencialmente atribuible a la presencia de restos orgánicos procedentes de la síntesis del ferrofluido utilizado en la impregnación de la matriz silícea.

### 4.3 ZSM5

En este apartado se trabajó de nuevo a partir de la zeolita  $\text{NH}_4\text{ZSM5}$ , estudiada en el capítulo anterior intercambiada con plata iónica.

#### 4.3.1 Síntesis: Obtención de Ag-ZSM5

Para conseguir el material de partida, es decir, Ag-ZSM5, se siguió el mismo protocolo que se indica en el apartado 3.1.1, intercambiando la zeolita  $\text{NH}_4\text{ZSM5}$  calcinada (H-ZSM5) con  $\text{AgNO}_3$  y así obtener la Ag-ZSM5 [111].

#### 4.3.2 Síntesis de AgNPs *in situ*

Para la síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs) *in situ* en la Ag-ZSM5 se utilizó el mismo método usado para la síntesis de AgNPs a baja concentración en la SBA 15-APTES, ya que partíamos de la zeolita ya intercambiada, Ag-ZSM5 con el nitrato de plata solución estándar para absorción atómica 1 % en peso ( $\text{HNO}_3$ ) de 1000 ppm.

Se siguió el mismo protocolo usado con la MCM41 y la SBA15. Es decir, en resumen, lo que se hizo fue reducir la plata iónica de 1 g de Ag-ZSM5 para formar las AgNPs utilizando  $\text{NaBH}_4$  a concentración de 0,05 M en un volumen de 100 mL. Posteriormente, se filtró, secó y guardo en oscuridad.

En la Figura 4.15, se puede observar como la reducción de la plata para, formar AgNPs-ZSM5, produjo un cierto oscurecimiento del material. También se puede observar, el



color blanco que tiene la Ag-ZSM5, color que se ha mantenido en todos los lotes usados en este trabajo.



**Figura 4.15.** Fotografía óptica mostrando la zeolita ZSM5 en diferentes estados. **A)** Ag-ZSM5 donde la plata es iónica y no aporta color a la muestra y **B)** AgNPs-ZSM5 donde ya se han formado AgNPs y, por tanto, la muestra adquiere un color grisáceo

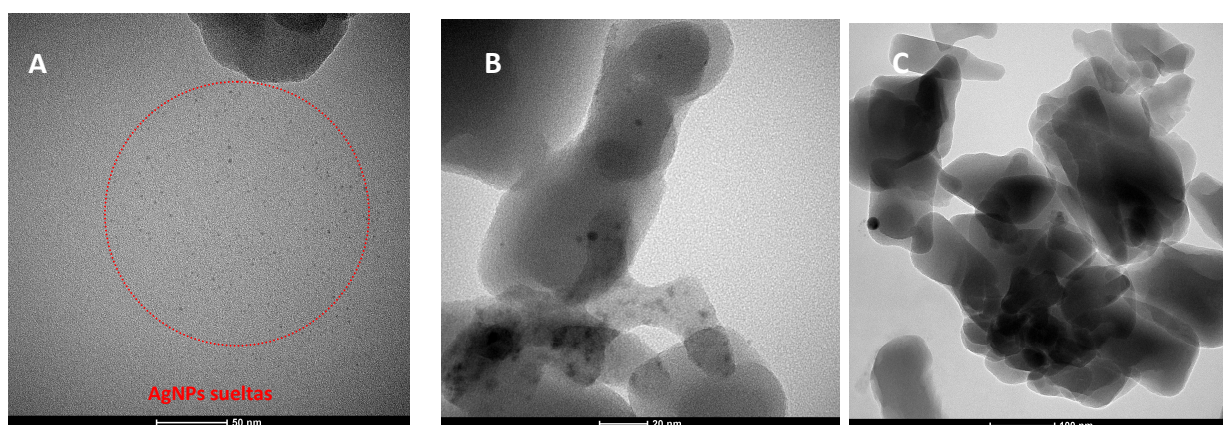
### 4.3.3 Caracterización

Aquí se muestran las diferentes técnicas usadas para caracterizar AgNPs-ZSM5.

#### ▪ MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

A nivel microscópico, como se muestra en la Figura 4.16, se observó una menor concentración de AgNPs que en el caso de la SBA 15-APTES-Ag-B. Se pensó que podría ser debido principalmente a los siguientes factores:

- La zeolita ZSM5 no estaba funcionalizada con grupos amino, por lo que la fijación de las nanopartículas al material mediante el enlace nitrógeno-plata no era posible. Este enlace químico se da entre los electrones del nitrógeno presente en los grupos amino y los electrones de la plata [358].
- Los poros de la ZSM5 de 0,55 nm, son muchos más pequeños que la SBA 15, de entre 8 nm y 10 nm. Esto hacía que las AgNPs de 6 a 8 nm, nombradas con anterioridad en el apartado 4.1.5, no se pudieran introducir en los poros.



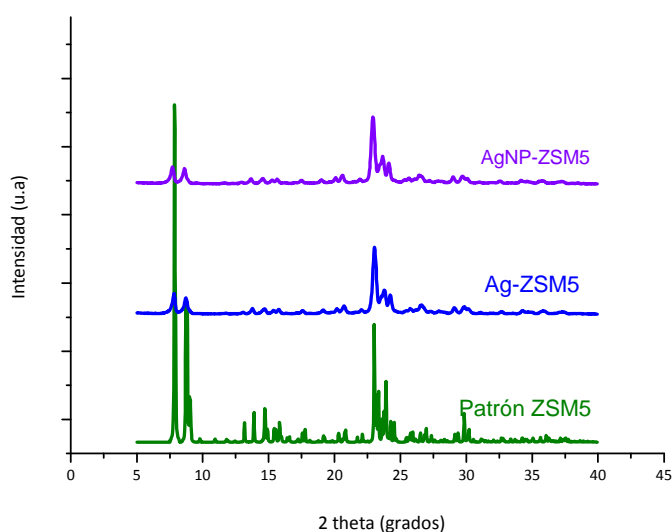
**Figura 4.16.** Microfotografías de TEM mostrándose distintas variaciones de ZSM5. **A)** AgNPs sueltas procedentes de la AgNPs-ZSM5 debido a la falta de fijación de las AgNPs en este material, **B)** AgNPs-ZSM5, **C)** Ag-ZSM5

Tal y como se muestra en la Figura 4.16, se observó la presencia AgNPs en la AgNPs-ZSM5 que se corresponden con los agrupamientos más oscuros de la microfotografía de TEM (Figura 4.16.B), aunque no todas permanecieron unidas a la estructura cristalina de la ZSM 5, ya que por diversas causas comentadas con anterioridad, parte de estas AgNPs aparecieron sueltas y no fijadas a los cristales de la zeolita ZSM5 (Figura 4.16.A). En el último caso de la Ag-ZSM5 (Figura 4.16.C), se observó la existencia de pequeños agrupamientos de plata precipitada de mayor tamaño (24 nm) que las AgNPs y que se corresponden con los agrupamientos oscuros de la microfotografía (en este caso aparece uno).

#### ▪ DIFRACCIÓN DE RAYOS X

En la Figura 4.17, se puede observar el diagrama XRD de Ag-ZSM5 y AgNP-ZSM5 comparadas con un patrón de la zeolita ZSM5.

De la misma manera que en la Ag-ZSM5, en el XRD de la AgNP-ZSM5 no se observaron cambios en la cristalinidad, ni nuevos picos que pudieran provenir de las AgNPs, lo cual demuestra que la estructura microporosa de la zeolita no se ve afectada por la incorporación de nanopartículas de plata, y por otro lado, la concentración y tamaño de las AgNPs no alcanza los valores mínimos para poder ser detectado mediante XRD.

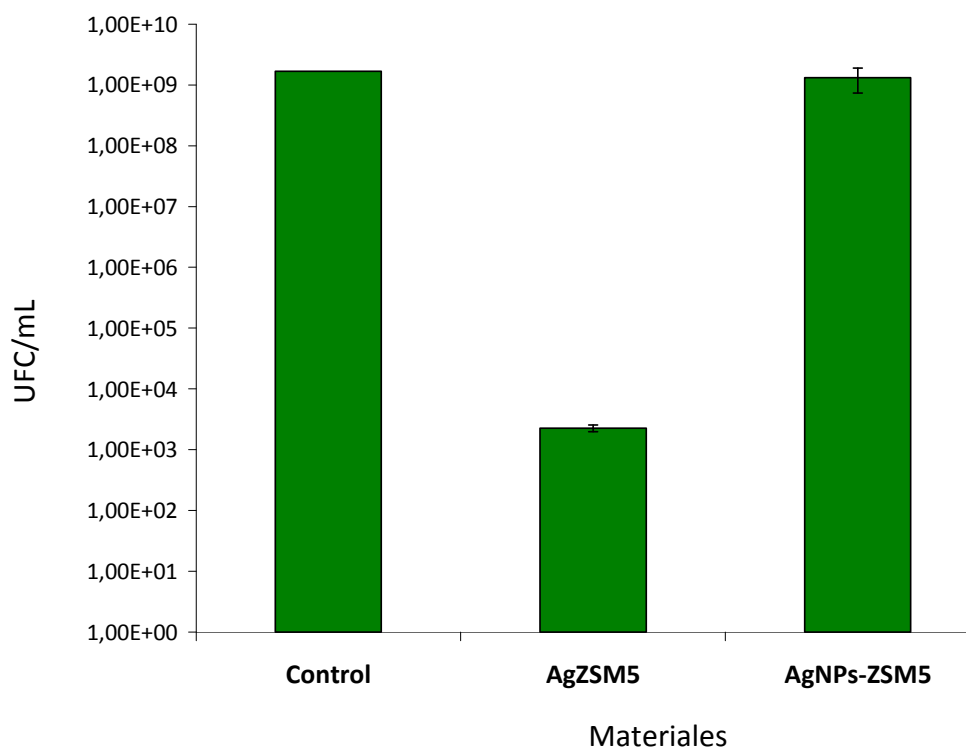


**Figura 4.17.** Diagrama XRD de AgNPs-ZSM5 y Ag-ZSM5 comparadas con el diagrama XRD patrón de la zeolita ZSM5

#### 4.3.4 Ensayos biológicos

A continuación se muestran los estudios antimicrobianos realizados con el *S.aureus* cepa 9213 y la AgNPs-ZSM5.

Se hicieron estudios, comparando el poder bactericida de Ag-ZSM5 y AgNP-ZSM5 a 24 horas.



**Figura 4.18.** Ensayos bactericidas realizados con los materiales AgNPs-ZSM5 y Ag-ZSM5 a tiempo 24 horas

Se pudo observar, la gran disminución del poder bactericida cuando la plata pasa de forma iónica (Ag-ZSM5) a forma metálica (AgNPs). De hecho, a la zeolita con AgNPs no se le atribuyó poder bactericida, ya que a las 24 horas se obtuvieron  $1,32 \times 10^9$  UFC/mL que no representa una diferencia significativa respecto al control ( $4,14 \times 10^9$  UFC/mL). Sin embargo, se volvió a comprobar el elevado efecto bactericida de la Ag-ZSM5 a las 24 horas, con una disminución de seis unidades logarítmicas lo cual corrobora la hipótesis de que el poder bactericida del material basado en plata depende fuertemente de la biodisponibilidad del catión plata.

#### 4.4 NANOPARTÍCULAS DE PLATA COMERCIALES

En este apartado se trabajó con unas nanopartículas de plata comerciales.

##### 4.4.1 Procedencia

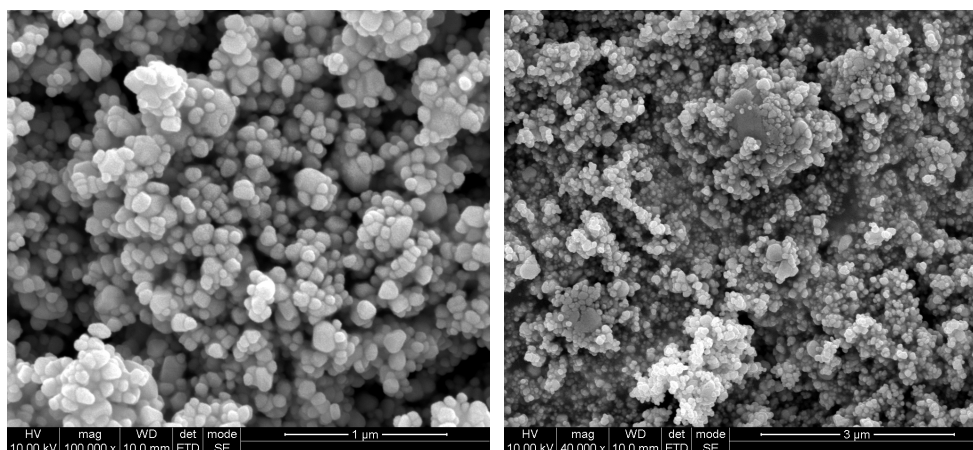
Las nanopartículas utilizadas fueron comerciales con tamaño de partícula inferior a 100 nm (Sigma-Aldrich®).

##### 4.4.2 Caracterización

Aquí se muestran las diferentes técnicas usadas para la caracterización de este material.

### ▪ MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

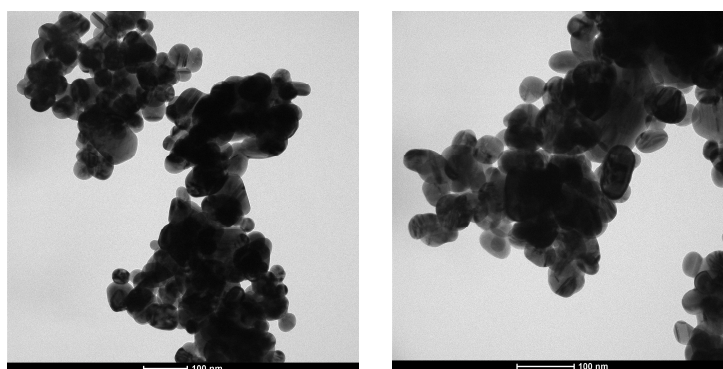
Por medio de esta técnica se pudo estudiar la morfología de las nanopartículas comerciales que se muestran a continuación en la Figura 4.19. Como se puede observar sus tamaños son, efectivamente, de menos de 100 nm, aunque se presentan en agregados de tamaño considerable.



**Figura 4.19.** Imágenes de SEM de las AgNPs comerciales. En estas microfotografías se muestran como las AgNPs tienen forma esférica y se presentan en agregados

### ▪ MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Mediante esta técnica, se pudieron visualizar las nanopartículas comerciales. En la Figura 4.20, se pueden visualizar este material.



**Figura 4.20.** Imágenes de TEM mostrándose AgNPs comerciales. Como se puede observar, las AgNPs se presentan en forma de grupo de tamaño considerable

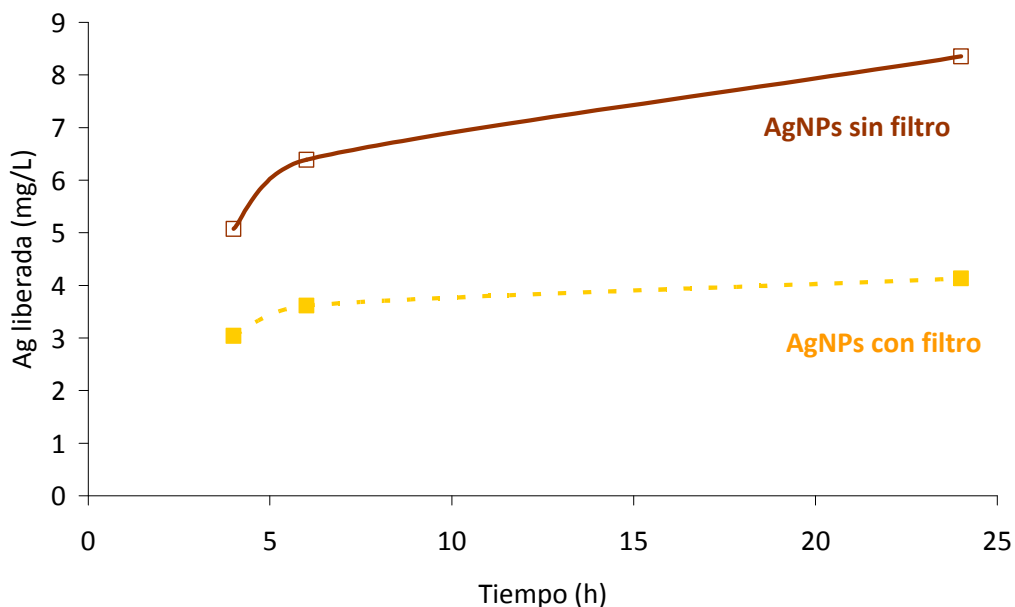
### ▪ ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA

Gracias a esta técnica, se pudo comprobar la cantidad de plata que las nanopartículas comerciales eran capaces de liberar al medio de cultivo.

Los experimentos se realizaron siguiendo el mismo protocolo que en el caso de las zeolitas (apartado 3.1.4 espectroscopía de absorción atómica). Igualmente, se

realizaron experimentos mediante centrifugación con tubos Falcon® y con tubos con filtro de tamaño de corte de 5 nm.

En la Figura 4.21, de forma análoga a lo ya observado en otros materiales, se puede observar que cuando los se utilizan los tubos que llevan incorporados los filtros, estos impiden el paso de nanopartículas de plata de más de 5 nm. A las 24 horas, la liberación medida se reduce a la mitad (sin filtro 8,36 ppm y con filtro 4,13 ppm).

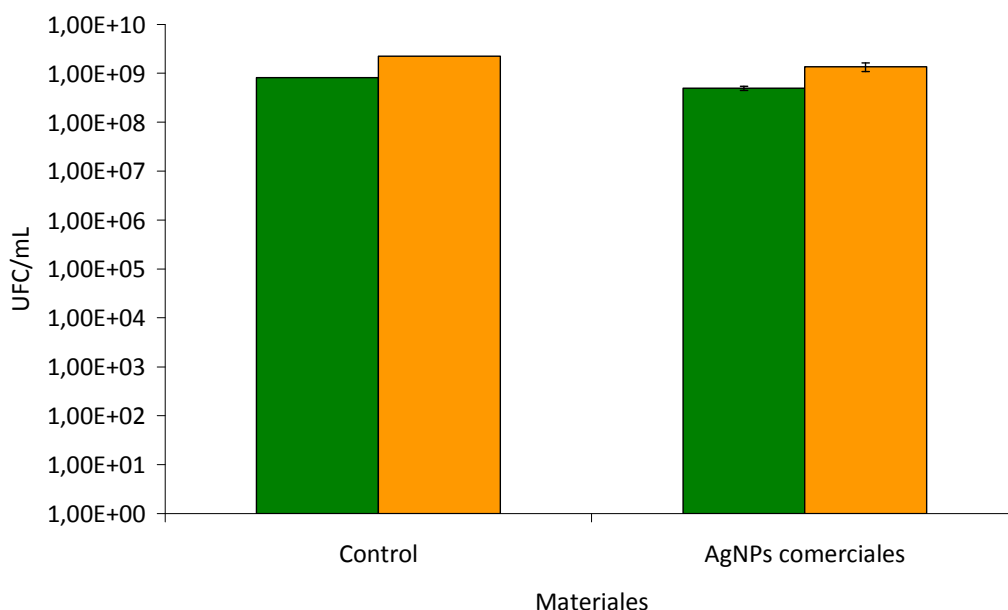


**Figura 4.21.** AAS de liberación de plata de AgNPs comerciales. Sin filtro (marrón), con filtro (amarillo, cuadrados llenos, discontinuo). Condiciones: Son la misma que se realizaron para la Ag-ZSM5 en el apartado 3.1.4 para los análisis de espectroscopía de absorción atómica en TSB. En resumen, se incubaron 300 mg de AgNPs en 100 mL de medio de cultivo TSB a 4, 6 y 24 horas sin renovación del medio a 37°C bajo agitación. A los tiempos determinados los tubos se centrifugaron (según el tipo de ensayo se utilizó tubos con y sin filtro de tamaño de poro de 5 nm) y se guardaban en frío para el posterior análisis de las muestras

A la vista de los datos de la Figura 4.21, resulta patente la lenta liberación de plata desde las nanopartículas comparada con la zeolita Ag-ZSM5 que con tan solo un 0,17 % en peso de plata libera 6,25 ppm en 24 horas al medio de cultivo, frente a las 4,13 ppm que liberan estas AgNPs comerciales. Una vez más, se ha de tener en cuenta que en la zeolita, la plata al estar en forma iónica, está totalmente disponible mientras que en las AgNPs, que se encuentra como plata metálica tiene que disolverse y difundir al medio de cultivo para estar disponible como plata iónica.

#### 4.4.3 Ensayos bactericidas

En este apartado se muestran, en conjunto, los ensayos bactericidas realizados con las nanopartículas de plata comerciales.



**Figura 4.22.** Ensayos bactericidas a 4 horas (verde) y 24 horas (naranja) con AgNPs comerciales

Se comprobó que, bajo las condiciones ensayadas, las AgNPs comerciales no presentaron poder bactericida a ninguno de los dos tiempos. Esto puede ser debido, a que las AgNPs comerciales tienen un elevado tamaño (100 nm) y además se encuentran agregadas, ya que se ha reportado que las AgNPs de tamaño superior a 10 nm [183, 192] y en forma de agregados [193] no tienen poder bactericida.

#### 4.5 NANOHILOS DE PLATA

Una vez comprobado el poder bactericida de la plata en diferentes formas (plata iónica y metálica distribuida en material zeolítico y en sílice mesoporosa) y en disolución en el medio de cultivo, se consideró interesante estudiar un soporte en el que poder facilitar el almacenamiento, tratamiento y manipulación de la plata para posibles aplicaciones tal y como están haciendo algunas empresas de electrodomésticos hoy en día en frigoríficos y lavadoras [359]. Para ello, se pensó en un soporte que tuviera una elevada superficie de contacto y que pudiera utilizarse en aplicaciones con utilización de corriente eléctrica. Por ello, se eligió el carbón vítreo reticulado comercial, y se decidió combinarlo con un material filamentoso de plata, como son los nanohilos de plata, que pudieran soportarse fácilmente en este carbón vítreo reticulado.

En este apartado, se muestran los diferentes resultados de síntesis, caracterización, impregnación en el carbón vítreo reticulado y el poder bactericida obtenidos con nanohilos de plata sintetizados de forma hidrotermal.



#### 4.5.1 Síntesis hidrotérmal de los nanohilos de plata

La síntesis se realizó en un autoclave tal y como se muestra en el apartado 2.10 y se llevó a cabo tal y como se describió en la bibliografía, para la obtención de nanohilos de plata de sección poligonal [323].

Para ello se emplearon los siguientes reactivos:

- PVP. Polivinilpirrolidona (Sigma-Aldrich®).
- Etilenglicol (Sigma-Aldrich®).
- Nitrato de plata (Panreac®).

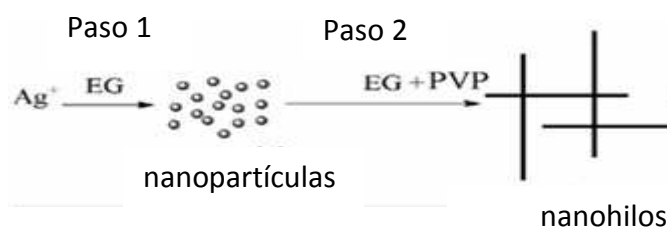
Y se realizaron las siguientes disoluciones:

- 10 mL de 0,15 M de PVP en etilenglicol
- 10 mL de 0,1 M de nitrato de plata en etilenglicol

Seguidamente, se fue añadiendo gota a gota la dilución de 0,15 M de PVP en etilenglicol sobre la disolución 0,1 M de nitrato de plata en etilenglicol bajo agitación magnética. Una vez la solución obtenida estuvo disuelta, se introdujo en un autoclave de teflón y se mantuvo en una estufa a 160°C durante 2,5 horas, a presión autógena. Transcurrido este tiempo, la síntesis se dejó enfriar a temperatura ambiente. A continuación, la dispersión obtenida se lavó con acetona y después con agua para eliminar el etilenglicol y el exceso de PVP, al final en la superficie de los hilos queda PVP que es lo que los mantiene estables. Este lavado se hizo mediante centrifugación a 6000 rpm durante 20 minutos para asegurarse de la recuperación de los nanohilos. Dichos nanohilos obtenidos se dispersaron en agua desionizada para su caracterización.

Al ser un proceso solvotérmal, durante la síntesis el autoclave de teflón está sellado y la temperatura sube rápidamente descomponiendo el precursor de plata, dando como resultado un medio de reacción sobresaturado donde se generan las semillas de las nanopartículas. En estas condiciones, estas semillas pueden crecer rápidamente en presencia de PVP mediante un mecanismo de *Ostwald ripening* [323]. Es decir, el proceso de síntesis consta de dos procesos [360]:

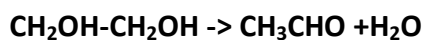
- Nucleación: Formación de nanopartículas de plata que actuarán como semillas (color amarillento)
- Crecimiento por *Ostwald ripening* para formar nanohilos. Las nanopartículas más pequeñas se disuelven y los productos de disolución sirven de crecimiento para los más grandes (color grisáceo).



**Figura 4.23.** Esquema de formación de nanohilos de plata

NOTA: EG es etilenglicol [361]

El mecanismo general de la síntesis se basa en la formación del producto principal, el diacetilo, que se puede explicar por una doble oxidación del acetaldehído, previamente producido por la deshidratación del etilenglicol [362]:



Por otro lado, el papel del PVP resulta esencial en dos aspectos principales:

**1. Estabilidad de los nanohilos de plata.** La interacción con la plata se produce mediante la coordinación con el átomo de oxígeno del grupo carbonilo (C=O) [361]. Sin embargo, varias etapas de la síntesis dificultaba esta interacción:

- La sonicación (necesaria en algunos experimentos realizados en este trabajo aportaba la energía necesaria para romper esta supuesta interacción)
- Los lavados para purificar los nanohilos (eliminaban el PVP)
- El almacenamiento de los nanohilos lavados sin PVP

Al no existir estabilización estérica del polímero podría producirse un recrecimiento de los nanohilos en dirección radial y la evolución consecuente hacia la forma esférica, que es termodinámicamente más estable. Es decir, sin la estabilización estérica del polímero se produciría el recrecimiento de los nanohilos y evolucionaban hacia nanopartículas esféricas.

Por lo tanto, para minimizar estos problemas:

- La sonicación fue mínima (1 minuto como máximo)
- Los nanohilos se almacenaban de un día a otro en frío y sin lavar.
- Los nanohilos se lavaban para ser usados a continuación.

**2. Mecanismo de crecimiento de los nanohilos de plata.** Las macromoléculas del PVP (agente estabilizante) interactúan más fuertemente con los planos {100} que con los planos {111} de la plata, de manera que las caras {100} están completamente pasivadas por el PVP y las caras {111} solo parcialmente [360, 361].

Las nanopartículas formadas en la primera fase tienen su superficie limitada por diez caras {111} y poseen cinco planos de simetría {100}. La cristalización de los átomos de plata en los límites de los planos compartidos da lugar a una elongación uniaxial de las nanopartículas en nanohilos bajo el confinamiento de los planos idénticos, formándose nanohilos de plata cristalinos.

Finalmente, se pudo observar que esta síntesis daba resultados reproducibles, tal y como se muestra en el siguiente apartado.

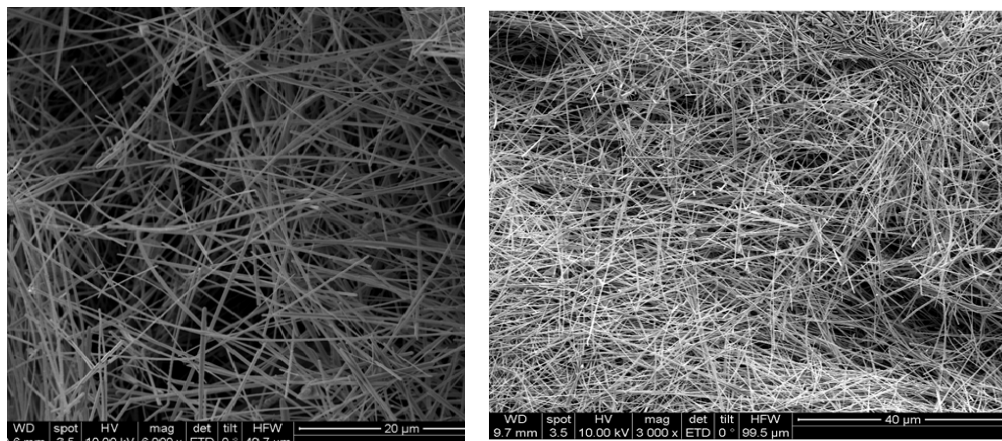
#### 4.5.2 Caracterización

En este apartado, se muestra la caracterización de los nanohilos de plata mediante diversas técnicas.



▪ MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

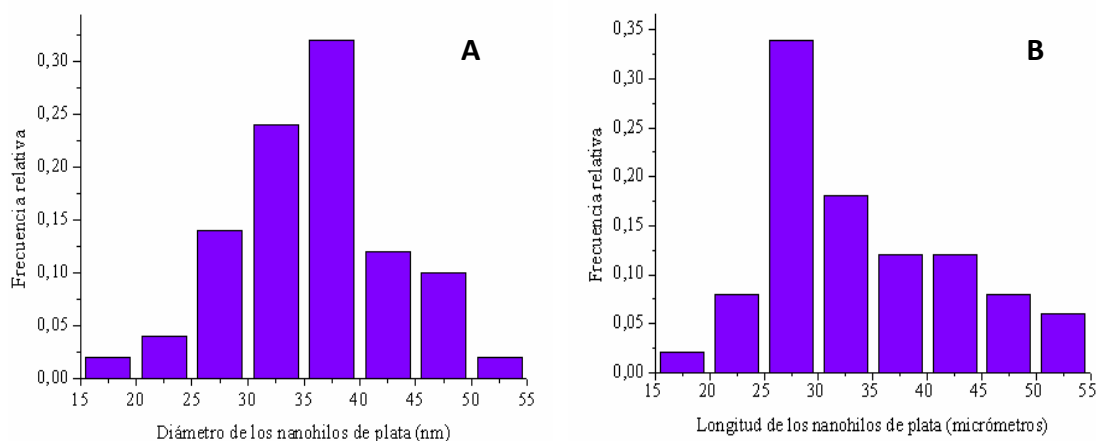
En la Figura 4.24, se puede observar los nanohilos sintetizados mediante el proceso solvotermal.



**Figura 4.24.** Microfotografía de SEM mostrando los nanohilos de plata. Se puede observar el tamaño y forma uniforme que presentan estos nanohilos

Las imágenes obtenidas por SEM, indican una buena reproducibilidad de la síntesis de los nanohilos ya que cada imagen corresponde con una síntesis independiente. Además se pudo observar la ausencia de impurezas (no se observan mediante XRD cristales de  $\text{AgNO}_3$  o nanopartículas de plata metálica) y una buena selectividad hacia los nanohilos.

Por medio del programa ImaQ Vision Builder®, se realizaron medidas de las frecuencias relativas del diámetro y de la longitud de los nanohilos de plata mediante histogramas. Por lo tanto, como se muestra en la Figura 4.25, se llegó a la conclusión que los nanohilos más frecuentes eran aquellos que tenían un diámetro de 35-40 nm y una longitud de 25-30 micras.

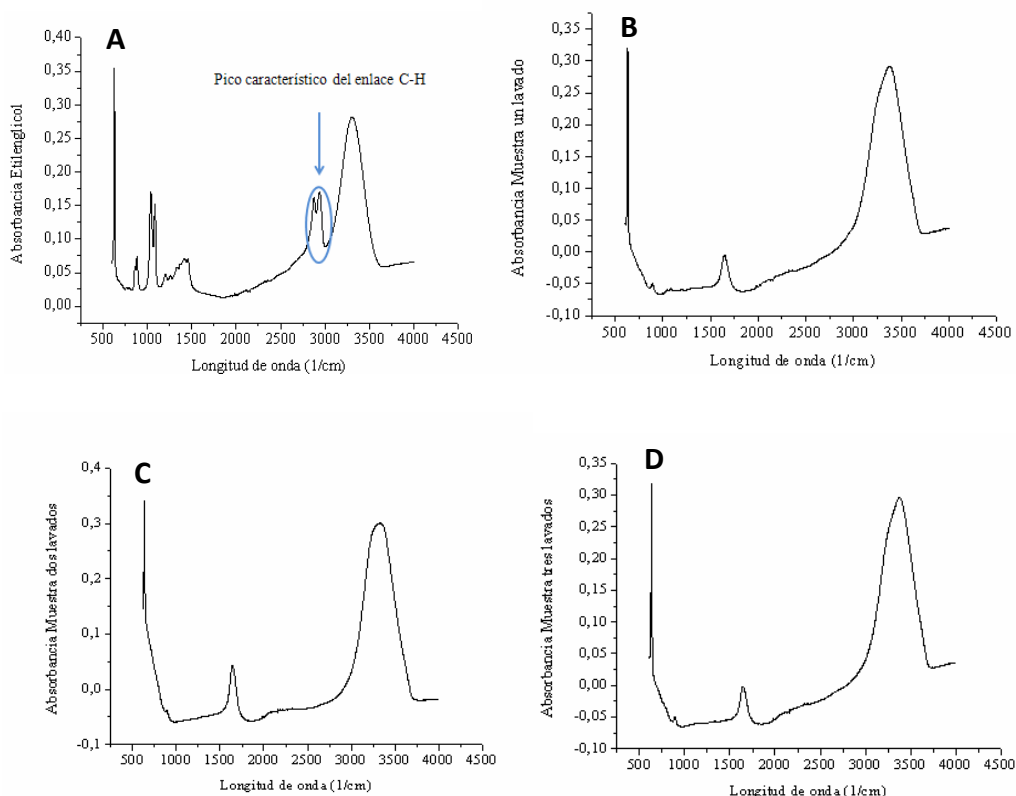


**Figura 4.25.** Frecuencias relativas de **A)** Diámetro y **B)** Longitud de los nanohilos de plata obtenidos en las síntesis

### ■ ESPECTROSCOPIA POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Se utilizó la técnica FTIR para determinar la cantidad de lavados que eran necesarios en la purificación de la síntesis de nanohilos de plata para la eliminación del compuesto orgánico (etilenglicol,  $\text{CH}_2\text{OH}-\text{CH}_2\text{OH}$ ).

La eliminación total del etilenglicol resultaba necesaria, ya que este compuesto es tóxico para las bacterias [363] y alteraría los resultados de los posteriores ensayos bactericidas.



**Figura 4.26.** FTIR Síntesis de nanohilos: **A)** Sin lavados, **B)** Con un lavado, **C)** Con dos lavados y **D)** Con tres lavados

En la Figura 4.26, se observó los resultados de FTIR de la síntesis de nanohilos de plata sin lavar y con varios lavados. De esta manera se comprobó que en el primer lavado se consigue eliminar todo el etilenglicol, ya que con un lavado (y por tanto con dos y tres) desapareció el pico de absorbancia característico del enlace C-H (*stretching* entre 2750-3000  $1/\text{cm}$ ) que aparece en la síntesis sin lavar.

### ■ ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO

Por medio de esta técnica se determinó la masa de nanohilos de plata presentes en una cantidad conocida de dispersión de la muestra, para diferenciarla del PVP presente en la muestra.

El método utilizado fue diferente según el solvente usado:

- Para muestras de nanohilos dispersadas en etanol, se realizó un calentamiento de 25°C a 50°C con una rampa de temperatura de 0,1°C/ minuto y una isoterma de 50°C durante 30 minutos con un caudal de 20 mL/minuto de aire.
- Para dispersiones de nanohilos en agua (o en medio de cultivo), se hizo un calentamiento de 30°C a 500°C con una rampa de temperatura de 30°C/ minuto y una isoterma de 500°C durante 40 minutos con un caudal de 20 mL/ minuto de aire.

De esta manera, se eliminó el solvente y el PVP y se obtuvo la masa de sólido, en este caso, de nanohilos de plata. Mediante esta técnica se determinó la masa de nanohilos de plata utilizada en los análisis microbiológicos. La masa de dichos hilos en sus correspondientes dispersiones se determinó mediante termogravimetría.

- **Se determinó el efecto bactericida de los nanohilos de plata embebidos en una espuma de carbón vítreo reticulado comercial y evaluar simultáneamente si dicha espuma actuaba como un soporte eficiente para retener los nanohilos de plata depositados sobre ella.** Para ello, tras el lavado de la síntesis, se dispersaron los nanohilos de plata en etanol y se añadieron 100 ó 200 µL de una dispersión de concentración conocida a cada espuma de carbón.
- **Se estudió el poder bactericida de los nanohilos de plata en dispersión en cultivo estacionario desarrollado en medio de cultivo líquido (TSB).** Tras la purificación de la síntesis, los nanohilos de plata se dispersaron en el medio de cultivo estacionario y se añadieron 1,5 mL de esta dispersión a 3,5 mL de cultivo estacionario. En este caso, mediante termogravimetría, se conoció la masa de nanohilos de plata.

Para el caso de los nanohilos de plata dispersos en etanol, la masa de nanohilos de plata fue de 0,96 mg en 150 µL de volumen de etanol, por tanto si a la espuma de carbón se le añadieron 200 µL de la dispersión, esta espuma contenía 1,28 mg de nanohilos. En otro caso, se obtuvieron 0,707 mg de nanohilos en 150 µL de etanol. En este caso a la espuma de carbón se le añadieron 100 µL de la dispersión y por tanto, tenía 0,471 mg de nanohilos. Finalmente, se midieron 0,426 mg de nanohilos en 150 µL de etanol. También se añadieron 100 µL de la dispersión a las espumas de carbono y por tanto, estas tenían 0,284 mg de nanohilos. Por lo tanto la masa final de nanohilos de plata en la espuma de carbón vítreo reticulado comercial que se utilizó en los análisis microbiológicos fue la suma de los tres valores anteriores, es decir, **2,035 mg**.

Esta cantidad de nanohilos de plata se pondría posteriormente en 5 mL de cultivo estacionario para hacer los ensayos bactericidas, por lo tanto habría **0,407 mg de plata/mL de cultivo estacionario**. Finalmente, no se muestran los datos para otras espumas porque se obtuvieron de la misma forma, pero se obtuvo otro valor de **0,21 mg de plata/mL de cultivo estacionario**.

A continuación se realizó TGA de la dispersión de nanohilos de plata en cultivo estacionario (datos no mostrados), y se pudo calcular que en los posteriores ensayos bactericidas habría **0,5 mg de nanohilos de plata dispersos/mL de cultivo estacionario**.

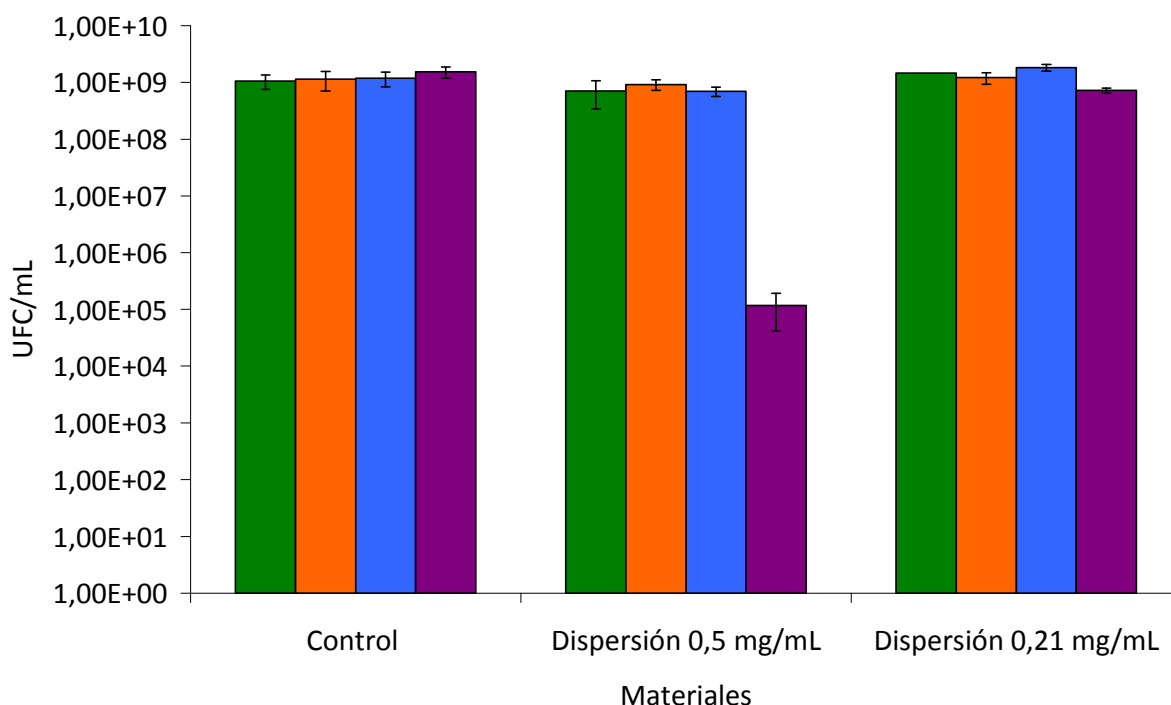
### 4.5.3 Ensayos bactericidas

En este apartado se comentan los diferentes ensayos bactericidas realizados con los diferentes nanohilos de plata, por si solos o embebidos en diferentes soportes.

Los ensayos bactericidas se hicieron a tiempos de 10, 20 y 30 minutos, y 24 horas a 37°C.

#### ▪ NANOHILOS DISPERSOS

A continuación en la Figura 4.27, aparecen los resultados de los nanohilos dispersos en un cultivo estacionario. Se usaron dos concentraciones 0,21 mg/mL de cultivo estacionario y 0,5 mg/mL de cultivo estacionario. Los tiempos evaluados fueron de 10, 20 y 30 minutos, y de 24 horas.



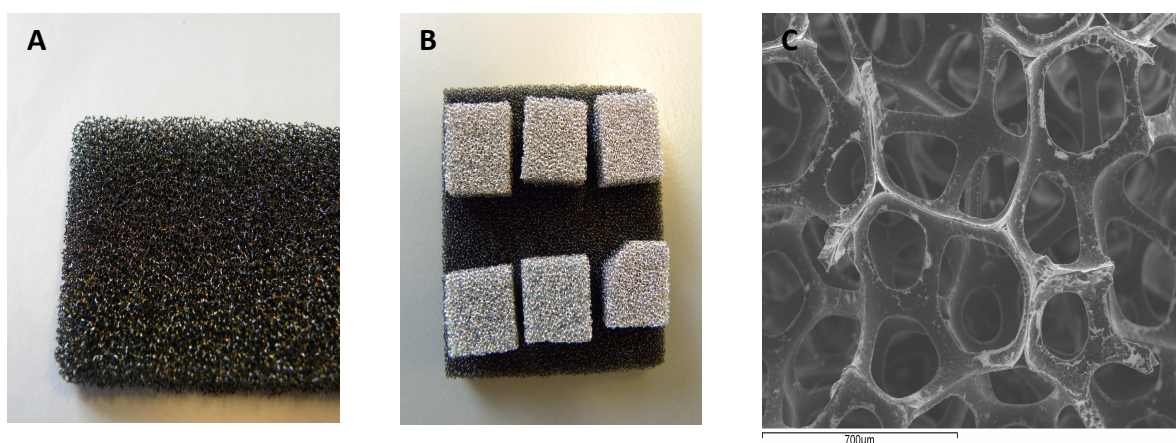
**Figura 4.27.** Estudios bactericidas nanohilos dispersión. 10 minutos (verde), 20 minutos (naranja), 30 minutos (azul), 24 horas (morado)

Se pudo observar, que el único material que tuvo poder bactericida fueron los nanohilos dispersos a una concentración de 0,5 mg/mL de cultivo estacionario al tiempo más largo de incubación (24 horas), con una disminución de cuatro unidades logarítmicas. El poder bactericida, no fue debido a la internalización de los nanohilos *per se* ya que al ser mayores de 10 micras, no podían entrar en la célula. Dicho poder biocida fue atribuido a la oxidación de los nanohilos y la consecuente liberación de iones plata.

▪ **NANOHILOS Y PLATA DESPOSITADA POR CVD EN ESPUMAS DE CARBÓN VÍTREO RETICULADO**

En este apartado, se muestran los ensayos bactericidas utilizando como soporte las espumas de carbón. Los ensayos que se realizaron fueron los siguientes:

- Cinta de carbono. Los ensayos bactericidas se realizaron en vasos de precipitados, y para que la espuma de carbono no flotara en el cultivo estacionario, se fijo a la base del vaso con cinta de carbono. Se quiso comprobar si esta tenía poder bactericida por si sola.
- Cinta de carbono + espuma de carbono (Figura 4.28.A). Se quería comprobar que estas espumas no tenían poder bactericida y por tanto, se podían usar como soporte inerte.
- Cinta de carbono+espuma de carbono+plata depositada por CVD (Figura 4.28.B). Se evaporó un precursor de plata con el evaporador *BOC Edwards Auto 500 E-beam*, en las espumas hasta que hubiera una concentración en el cultivo estacionario de 0,2 mg/mL. Algunas de estas espumas se calcinaron a 300°C en presencia de oxígeno para examinar el posible cambio de estado de la plata a óxido de plata (II).
- Cinta de carbono+espuma de carbono+nanohilos de plata (Figura 4.28.C). El proceso de deposición de los nanohilos de plata fue explicado en el apartado anterior 4.5.2 en el apartado TGA. La concentración ensayada en el cultivo estacionario fue de 0,407 mg/mL.



**Figura 4.28.** **A)** Espumas de carbón vítreo reticulado sola. **B)** Plata depositada por CVD en las espumas de carbón vítreo reticulado **C)** Microfotografía de SEM mostrándose los nanohilos impregnados en una espuma de carbón vítreo reticulado. Los nanohilos corresponden a la zona más clara y brillante de la microfotografía

Con los ensayos bactericidas realizados en estas espumas, no se pudo observar ningún efecto antimicrobiano. Solamente con los nanohilos de plata impregnados en las espumas, se observó una ligera disminución de carga bacteriana respecto al control hasta llegar a  $6,47 \times 10^8$  UFC/mL, tal y como se muestra en la Tabla 4.8, marcado en rojo. Además se demostró, que ni la cinta de carbono ni las espumas de carbón vítreo reticulado eran tóxicas para las bacterias.

**Tabla 4.8.** Ensayos bactericidas con espumas de carbón. 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 24 horas

NOTA: NH= Nanohilos

TIEMPOS	10 minutos		20 minutos		30 minutos		24 horas	
	Media (UFC/mL)	SD	Media (UFC/mL)	SD	Media (UFC/mL)	SD	Media (UFC/mL)	SD
Control	1,06x10 <sup>9</sup>	299302506	1,13x10 <sup>9</sup>	431589629	1,18x10 <sup>9</sup>	342390301	1,54x10 <sup>9</sup>	339836562
Espuma 0,407 mg NH/mL de cultivo estacionario	-	-	-	-	1,62x10 <sup>9</sup>	155563492	6,47x10 <sup>8</sup>	37712361,7
Espuma 0,2 mg Ag depositada /mL de cultivo estacionario	-	-	-	-	1,42x10 <sup>9</sup>	61282587,7	9,73x10 <sup>9</sup>	942809042
Espuma 0,2 mg Ag depositada calcinada /mL de cultivo estacionario	-	-	-	-	2,49x10 <sup>9</sup>	1565063009	9,33x10 <sup>8</sup>	188561808
Cinta de Carbono	1,06x10 <sup>9</sup>	61282587,7	1,47x10 <sup>9</sup>	117851130	1,30x10 <sup>9</sup>	150849447	1,12x10 <sup>9</sup>	166183216
Cinta de Carbono.Espuma de carbón vítreo reticulado	1,01x10 <sup>9</sup>	42426406,9	9,45x10 <sup>8</sup>	162634560	1,12x10 <sup>9</sup>	153206469	9,73x10 <sup>8</sup>	175188397

En esta misma Tabla 4.8, se puede observar que no se evaluó el efecto antimicrobiano para tiempos cortos (10 y 20 minutos) en los ensayos de las espumas de carbón vítreo reticulado con plata tanto depositada por CVD como con plata en forma de nanohilos. Esto fue así debido a que, primero se evaluó el efecto bactericida a tiempos largos y al comprobar su nulo efecto, se decidió no ensayar los tiempos más cortos.

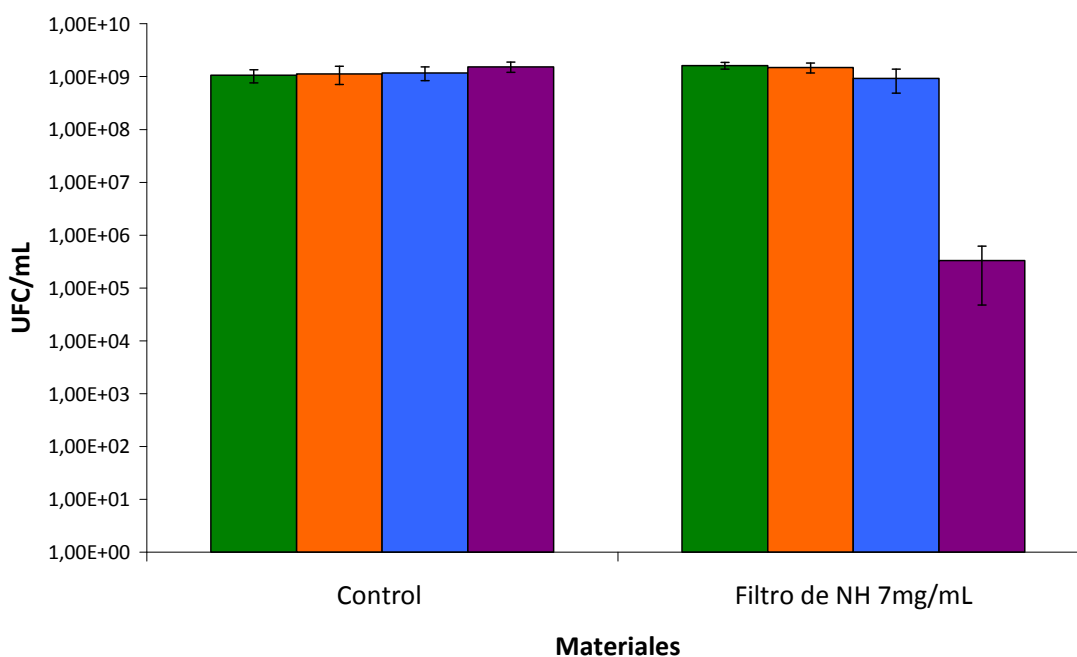
▪ **NANOHILOS AUTOSOPORTADOS EN FILTROS DE CELULOSA**

Para obtener estos nanohilos autosoportados se filtraron 3 mL de síntesis de nanohilos de plata, usando unos filtros de celulosa de 25 mm de diámetro y de 200 nm de tamaño de poro (ALBET LabScience).

La cantidad de nanohilos autosoportados obtenidos, se obtuvo por diferencia de pesada antes y después de filtrar la síntesis y una vez estos estuvieran secos. La cantidad que se obtuvo fue de 7 mg/mL de cultivo estacionario para la realización de los ensayos bactericidas. Estos filtros con los nanohilos de plata se dispusieron en el cultivo estacionario y se realizaron ensayos bactericidas a 10, 20 y 30 minutos y a 24 horas.

En el capítulo siguiente, se estudiará la aplicación de la corriente eléctrica sobre los nanohilos de plata para facilitar y acelerar la obtención de plata iónica [364], que como se ha demostrado en los capítulos previos, es la forma que presenta poder bactericida generándose a partir de la plata metálica que forma los nanohilos de plata. Con estos filtros de celulosa, no se hicieron ensayos bactericidas posteriores con corriente continua por la dificultad de aplicación de la corriente eléctrica sobre estos filtros de celulosa ya que no es conductora eléctricamente, y la dificultad experimental.





**Figura 4.29.** Ensayos bacteridias con filtros autoportados de nanohilos. 10 minutos (verde), 20 minutos (naranja) 30 minutos (azul), 24 horas (morado)  
 NOTA: NH=Nanohilos

Se observó en la Figura 4.29, una disminución de cuatro unidades logarítmicas a tiempo de 24 horas usando estos nanohilos autoportados.

Por medio de estos experimentos se demostró que los nanohilos de plata, que son plata metálica, no tienen poder bactericida a tiempos cortos. Es conocido que si las nanoestructuras son superiores a 10 nm no tienen poder bactericida [183]. Se ha observado una reducción de cuatro unidades logarítmica con los nanohilos autoportados con una concentración de 7mg/mL de cultivo a las 24 horas y la misma reducción con los nanohilos dispersos en el medio de cultivo con una concentración de 0,5mg/mL de cultivo. Por lo tanto como la concentración global es menor cuando se usan nanohilos dispersos y la reducción de la carga bacteriana es la misma que la obtenida cuando se usan nanohilos autoportados, la primera situación sería preferible: Nanohilos dispersos a una concentración de 0,5mg/mL de cultivo a un tiempo de 24 horas.

## Capítulo 5

### Combinación de los nanohilos de plata con campo eléctrico

#### **5.1 INTRODUCCIÓN A LA COMBINACIÓN CON CAMPO ELÉCTRICO**

#### **5.2 CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA REALIZAR LA APLICACIÓN DE CAMPO ELÉCTRICO.**

#### **CARACTERIZACIÓN**

##### **5.2.1 Espectroscopía de Absorción Atómica**

#### **5.3 ENSAYOS BACTERICIDAS**

##### **5.3.1 Elección del voltaje**

##### **5.3.2 Nanohilos dispersos**

##### **5.3.3 Nanohilos y plata evaporada en espumas de carbón vítreo**

##### **5.3.4 Estudio a 9 V 30 minutos y 24 horas de incubación a 37°C**



## 5. COMBINACIÓN DE LOS NANOHILOS DE PLATA CON CAMPO ELÉCTRICO

En este apartado se describe la combinación con campo eléctrico de las diferentes estructuras y condiciones que llevan nanohilos de plata.

### 5.1 INTRODUCCIÓN A LA COMBINACIÓN CON CAMPO ELÉCTRICO

El proceso que tiene lugar al combinar los nanohilos con campo eléctrico consiste en una oxidación anódica y una reducción catódica de forma no espontánea.

Tal y como se mostró en el apartado 2.6 el sistema experimental esta formado por dos electrodos conectados a una fuente de alimentación eléctrica, e inmersos en una solución conductora, de modo que cada electrodo atrae a los iones de carga opuesta:

- El ánodo atrae a los aniones.
- El cátodo a los cationes.

Es decir, se produce una transferencia de electrones entre los electrodos y los iones:

- Los aniones ceden electrones al ánodo. Se produce la REDUCCIÓN.
- Los cationes captan los electrones del cátodo. Se produce la OXIDACIÓN.

Este proceso únicamente se pudo llevar a cabo mediante corriente eléctrica continua. De esta manera, los iones son llevados en una sola dirección al electrodo correspondiente para que se produzca la transferencia de electrones. En cambio, la corriente alterna con una frecuencia, por ejemplo de 50 Hz, indicaría que cambiaría el sentido del movimiento de los iones 50 veces por segundo. Esto impediría que la mayor parte de los iones alcancen los electrodos para que la transferencia electrónica necesaria tenga lugar, consiguiendo sólo un aumento de la temperatura del electrolito y por ello fue descartado.

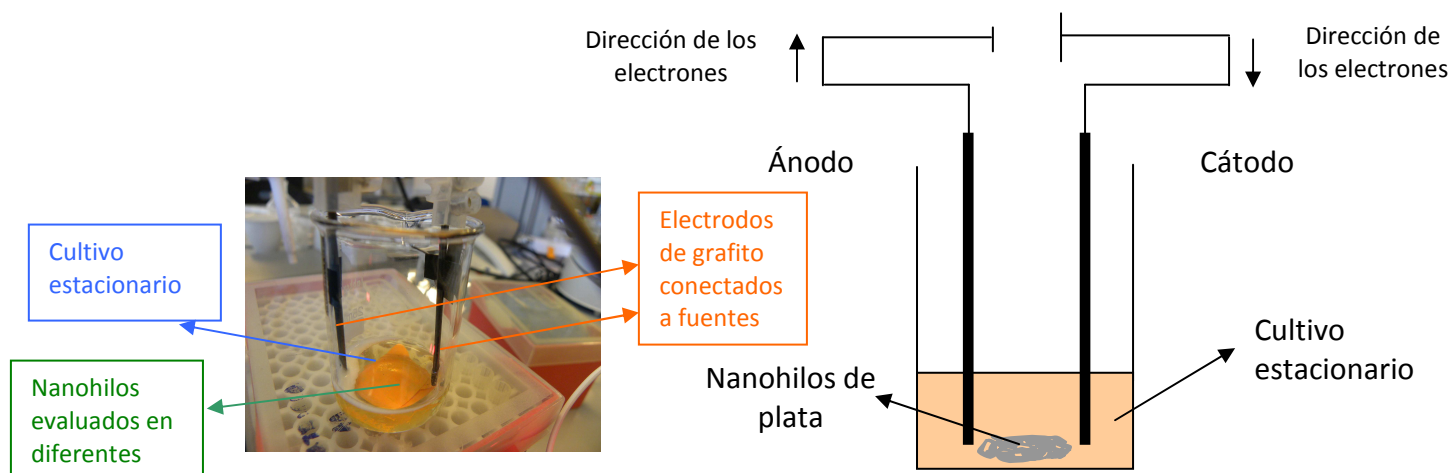
En este apartado se evaluaron las propiedades bactericidas de los nanohilos de plata en presencia de corriente eléctrica, para poder comparar los resultados con el apartado anterior en el que los nanohilos no se combinaban con corriente eléctrica. La hipótesis de trabajo es que la aplicación de campo eléctrico favorece la oxidación de los nanohilos de plata metálica (un proceso muy lento en otras condiciones) aumentando por tanto su poder biocida.

### 5.2 CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA REALIZAR LA APLICACIÓN DE CAMPO ELÉCTRICO. CARACTERIZACIÓN

Para realizar los experimentos como se comenta en el apartado 2.6, se han utilizado unas fuentes de voltaje (HQ Power, Alimentador Multitensión modelo 2A):

- Conectadas a electros inertes de grafito.

- Los electrodos estuvieron inmersos en 5 mL de Cultivo Estacionario



**Figura 5.1.** Sistema experimental. La primera imagen corresponde a una fotografía óptica del sistema experimental. La segunda imagen corresponde a un esquema de éste

Se analizaron las siguientes condiciones con el cultivo estacionario:

- 3 voltajes 6 V, 9 V y 12 V aplicados durante 10, 20 y 30 minutos cada uno.
- Con el voltaje de 9 V durante 30 minutos y dejando actuar sin voltaje durante 24 horas a 37°C.

### 5.2.1 Espectroscopía de Absorción Atómica

Se realizaron estos experimentos para evaluar la cantidad de plata procedente de los nanohilos que se liberaba al medio (agua corriente o TSB), cuando se aplicaba corriente eléctrica en las diferentes condiciones:

- 10, 20 y 30 minutos a 9 V.
- 30 minutos a 9 V y seguidamente 24 horas a 37°C sin corriente eléctrica.

Además, los ensayos se realizaron en el mismo volumen en el que se llevan a cabo los ensayos bactericidas, es decir, 5 mL, siendo:

- 4,7 mL de TSB o de agua.
- 300 µL de una dispersión de nanohilos 0,5 mg/mL.

Las muestras, una vez obtenidas a los tiempos indicados, fueron centrifugadas con tubos que poseen un filtro de tamaño de poro inferior a 5 nm (Amicon® Ultra centrifugal filter units, Millipore®) y fue el sobrenadante lo que se midió en AAS.

Como se señala en la Tabla 5.1, se comprobó que el proceso de aplicación de campo eléctrico fue efectivo para la liberación de iones de plata y que a mayor tiempo de exposición a la corriente se obtendría mayor concentración de iones plata. Además, se observó que si tras la aplicación de corriente eléctrica durante 30 minutos, se producía una incubación a 37°C durante 24 horas la concentración de plata se duplicaba, demostrando que tras la eliminación de voltaje, la oxidación de los nanohilos de plata continuaba pero de una manera más lenta.

Por otro lado, se estudió la posible formación de AgCl en el filtro del tubo de Amicon® tras de 10 minutos de aplicación de campo eléctrico (denominado en la Tabla 5.1 AgCl retenido). Para ello se añadió 5 mL de ácido nítrico a los filtros. Este es capaz de disolver este compuesto pero no de disolver los nanohilos de plata ya que para esto, es necesario agua regia [365].

**Tabla 5.1.** AAS de la plata procedente de la oxidación de los nanohilos de plata bajo aplicación de campo eléctrico

Muestra		Tiempo de aplicación de campo eléctrico (minutos)	Tiempo de contacto (horas)	Concentración Ag <sup>+</sup> (ppm)
TSB	Sobrenadante	10	-	1,663
TSB	AgCl retenido	10	-	0,746
TSB	Sobrenadante	20	-	3,212
TSB	Sobrenadante	30	-	4,064
TSB	Sobrenadante	30	24	8,864
Agua	Sobrenadante	10	-	0,277
Agua	AgCl retenido	10	-	0,613
Agua	Sobrenadante	20	-	0,537
Agua	Sobrenadante	30	-	0,633
Agua	Sobrenadante	30	24	0,96

Tal y como aparece en la Tabla 5.1, se demostró que la liberación de plata fue superior en TSB que en agua en todas las condiciones ensayadas. Además se corroboró la formación de AgCl (AgCl retenido) en ambos medios, aunque, proporcionalmente, fue mayor en los ensayos que se realizaron con agua.

### 5.3 ENSAYOS BACTERICIDAS

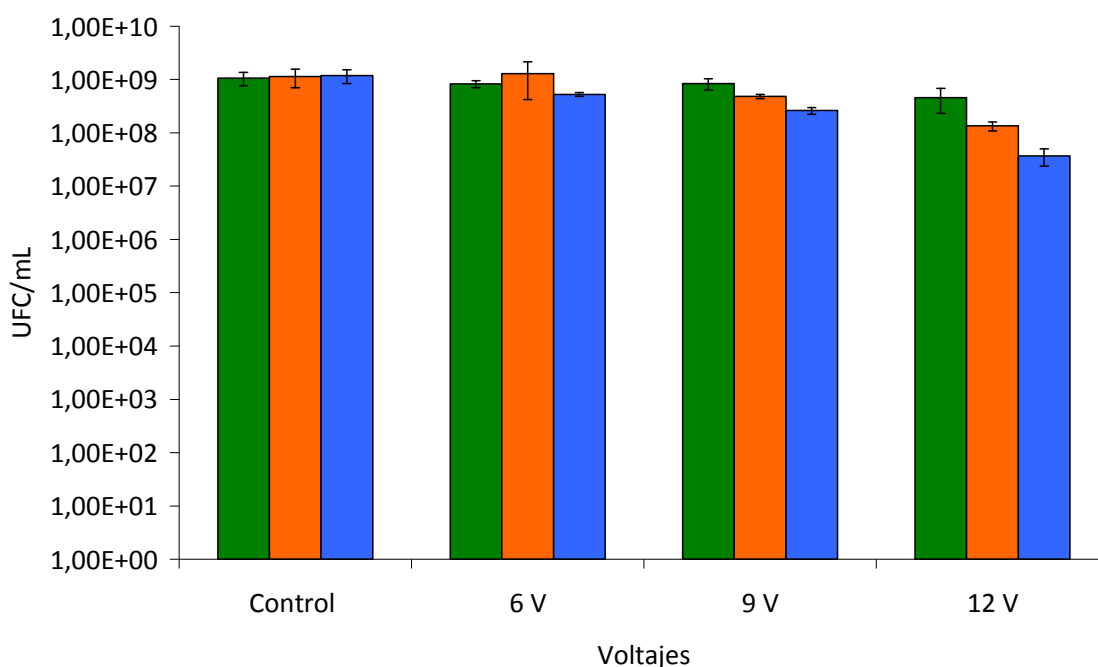
En este apartado se muestran los diferentes ensayos bactericidas realizados mediante aplicación de campo eléctrico con los diferentes soportes y comparados con los mismos ensayos con nanohilos pero sin corriente eléctrica.

#### 5.3.1 Elección del voltaje

Durante el paso de corriente eléctrica se puede producir un cambio de pH en el medio debido a la formación de nuevas especies, por ejemplo, se puede formar cloro *in situ* por la oxidación de los iones cloro de la solución y, además, puede tener lugar un proceso de electroporación. Estos efectos pueden influir en la viabilidad del *S. aureus* [306].

La electroporación se produce cuando se aplica una corriente eléctrica. Si este voltaje excede la rigidez dieléctrica de la membrana se forman poros, que pueden ser reversibles. Sin embargo, una exposición excesiva de los microorganismos a campos eléctricos puede causar un daño extenso en la membrana, dando lugar a apoptosis o necrosis, y por tanto, a la muerte bacteriana [306].

A la vista de estos resultados y puesto que lo que pretendía era evaluar la acción bactericida de la corriente eléctrica debido a la liberación de iones plata y no por otras causas, resultaba necesario elegir el voltaje adecuado (es decir, que por si solo no influyese en la viabilidad celular) para desarrollar este trabajo. Dado que las fuentes de las que se disponía podían dar unos voltajes de 6V, 9V y 12V, se probaron estos tres voltajes a 10, 20 y 30 minutos.



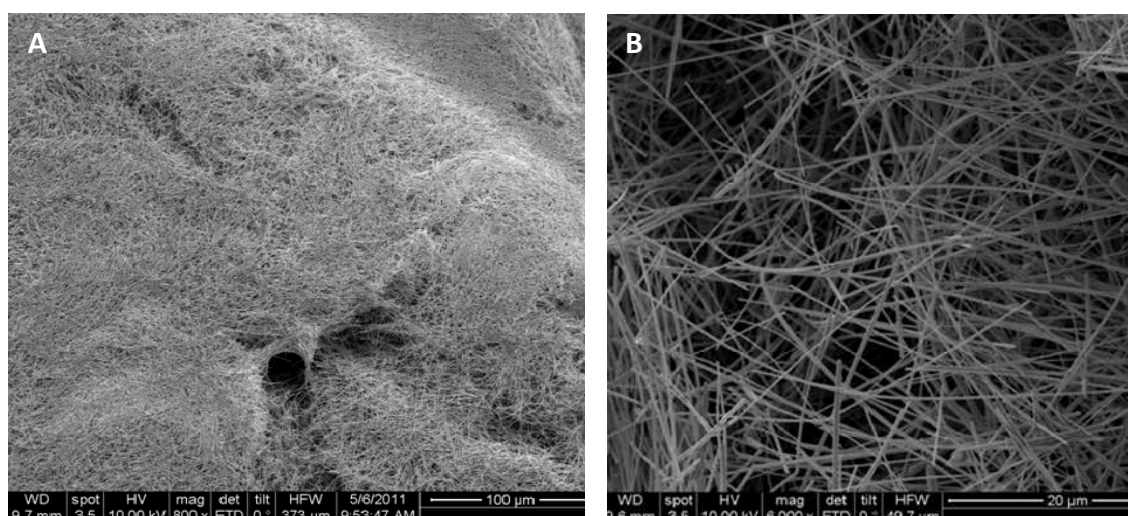
**Figura 5.2.** Ensayos bactericidas con diferentes voltajes: 6V, 9V y 12 V. Tiempos: 10 minutos (verde), 20 minutos (naranja) 30 minutos (azul)

Tal y como se muestra en la Figura 5.2, el voltaje que se eligió para realizar los análisis antimicrobianos con los nanohilos de plata fue de 9 V, el mayor voltaje que no tiene poder antiséptico por sí solo ya que si se compara con el control no se observa una disminución significativa, es decir, superior a media unidad logarítmica.

A este voltaje de 9 V, la intensidad que circuló fue aproximadamente 27 mA y fue aumentando hasta 38,5 mA en 30 minutos. Según la Ley de Ohm esto se debe a una disminución de la resistencia (ya que el voltaje fue constante de 9 V durante todo el experimento) en el medio de cultivo, que podría ser debido a un aumento de la permeabilidad de la membrana de las células [366, 367], aunque en este caso no afectaría a la viabilidad bacteriana como se muestra en la Figura 5.2. Otro aspecto a tener en cuenta en este trabajo, fue la variación del pH del medio [367], pero en este caso se midió tras el proceso y se verificó que no cambiaba para ningún valor de voltaje (pH=7,3).

### 5.3.2 Nanohilos dispersos

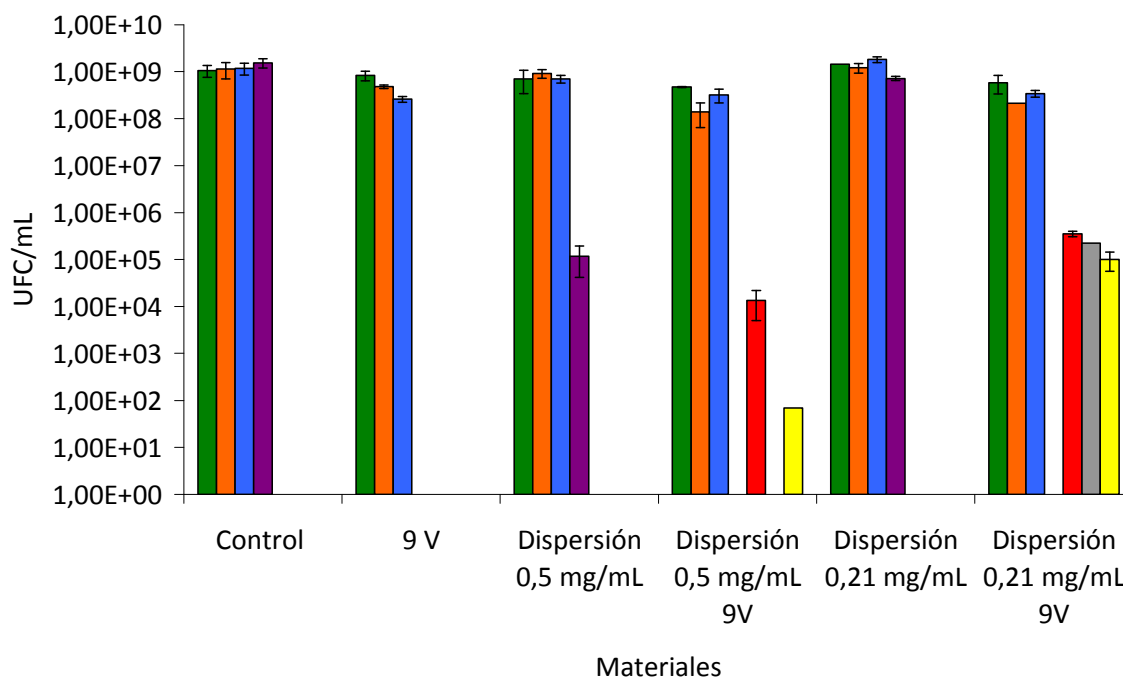
En ese apartado, se muestran los resultados de los ensayos bactericidas realizados con los nanohilos dispersos (Figura 5.3) en el cultivo estacionario a 9 V a diferentes tiempos, y comparados con los nanohilos dispersos en ausencia de voltaje. Estos resultados se muestran en la Figura 5.4.



**Figura 5.3.** Microfotografía de SEM de nanohilos de plata. En **A)** se muestra un área cubierta por los nanohilos. En **B)** se puede observar en detalle la morfología regular de estas estructuras

Como ya se comprobó en el capítulo anterior, sin voltaje solo se observa poder bactericida con los nanohilos dispersos a partir de una concentración de 0,5 mg/mL de cultivo bacteriano con una disminución de cuatro unidades logarítmicas.

Cuando se aplicó el voltaje de 9 V a tiempos cortos de 10, 20 y 30 minutos, la disminución fue muy baja, una unidad logarítmica, por lo que se considero no significativo el poder bactericida.



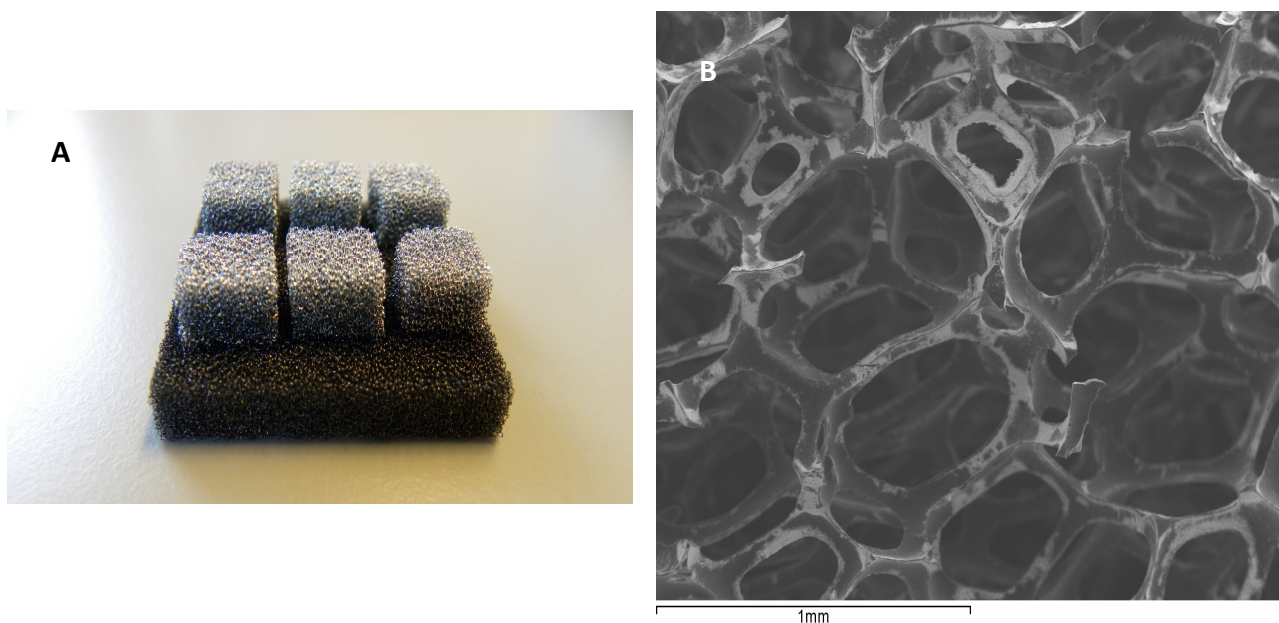
**Figura 5.4.** Ensayos bacterias dispersión de nanohilos sin y con diferencia de potencial 9 V. Tiempos: 10 minutos (verde), 20 minutos (naranja) 30 minutos (azul), 24 horas (morado), 9 V 10 minutos + 24 horas (rojo), 9 V 20 minutos + 24 horas (gris), 9 V 30 minutos + 24 horas (amarillo)

Sin embargo, si después de aplicación de voltaje se dejaba 24 horas de actuación a 37 °C, se obtenían muy buenos resultados bactericidas, con una disminución a 68 UFC/mL a una concentración de 0,5 mg/mL de cultivo bacteriano con el máximo tiempo de aplicación de corriente eléctrica y tras 24 horas de incubación. Además, con otras concentraciones (0,21 mg/mL de cultivo bacteriano) y otros tiempos (10 y 20 minutos, más 24 horas de incubación) se obtuvieron disminuciones de hasta cuatro y cinco unidades logarítmicas. Se consideró que esto era debido al tiempo de actuación de los iones plata, es decir, una vez producida la plata iónica por la corriente eléctrica aplicada a los nanohilos de plata, estos iones de plata tenían tiempo de actuar durante 24 horas produciendo diferentes efectos sobre el ADN, enzimas y proteínas bacterianas [182, 185] que, finalmente, producirían su muerte. Sin embargo, si una vez aplicada la corriente eléctrica, no se daba tiempo a la actuación de la plata iónica formada sobre las bacterias, se obtenían resultados de un descenso solamente de en torno a una unidad logarítmica. Por otro lado, como muestran los resultados de AAS de la Tabla 5.1, si se dejaba la muestra de nanohilos en TSB 24 horas incubando después de la aplicación de 9 V, la concentración de plata que se obtenía era mucho mayor, pasando de 4,064 ppm tras 9 V sin incubación a 8,864 ppm con incubación debido a una lenta pero continua oxidación de los nanohilos de plata. Por lo que, tanto el aumento de la concentración de plata y el aumento de tiempo de actuación producirían esta disminución de la población bacteriana.



### 5.3.3 Nanohilos y plata evaporada en espumas de carbón vítreo

En este apartado se muestran los resultados en los que se han implicado las espumas de carbón vítreo, por un lado con nanohilos embebidos y por otro lado con plata evaporada (calcinada y no calcinada), que aparecen en la Figura 5.5.

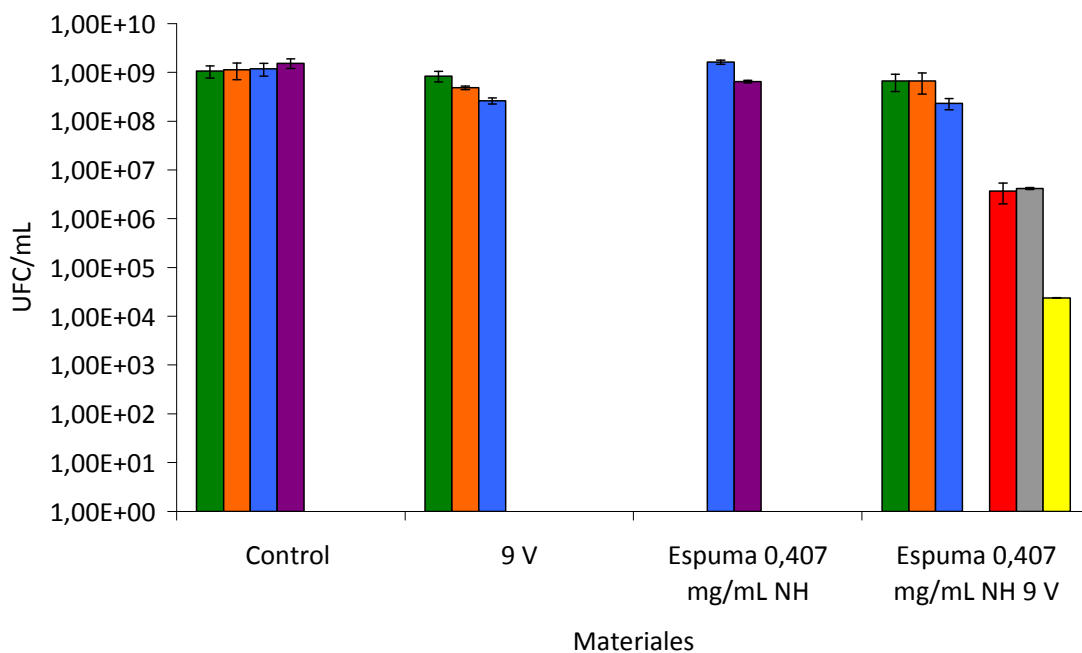


**Figura 5.5.** **A)** Fotografía de las espumas de carbón vítreo con plata depositada por CVD, en ellas se puede observar como solamente las primeras capas de este material quedaban cubiertas por la plata. **B)** Microfotografía de SEM mostrándose la espuma de carbón vítreo con los nanohilos embebidos, que corresponden a la parte más clara de la microfotografía

#### ▪ NANOHILOS EMBEBIDOS A CONCENTRACIÓN DE 0,407 mg/mL DE CULTIVO BACTERIANO

Tal y como se mostró en el apartado 4.5.2 sobre la caracterización de los nanohilos de plata por análisis termogravimétrico, se indicó que esta técnica se había utilizado para determinar la masa y concentración de los nanohilos de plata ante la dificultad que entrañaba el pesado de estos en una balanza de precisión. Por lo que la concentración de nanohilos de plata que aparece en este apartado se determinó de esta manera comentada.

La colocación de las espumas respecto a los electrodos y el medio de cultivo, fue la misma que se realizó para todos los soportes tal y como viene indicado en la Figura 5.1 de la primera parte del apartado 5.2.



**Figura 5.6.** Ensayos bacterias de nanohilos embebidos en espumas de carbono vítreo sin y con voltaje 9 V. Tiempos: 10 minutos (verde), 20 minutos (naranja) 30 minutos (azul), 24 horas (morado), 9 V 10 minutos + 24 horas (rojo), 9 V 20 minutos + 24 horas (gris), 9 V 30 minutos + 24 horas (amarillo). En “espuma 0,407 mg/mL NH”, no hay estudio a tiempo de 10 minutos, ya que se decidió no hacerlo viendo que a 20 minutos no se producía ningún efecto bactericida

Como se puede observar en la Figura 5.6, para obtener efecto antimicrobiano fue necesario aplicar voltaje de 9 V y después dejar incubar durante 24 horas a 37°C, de este modo se consiguió una reducción de tres unidades logarítmicas aplicando 9 V durante 10 y 20 minutos, y se disminuyó hasta  $2,38 \times 10^4$  UFC/mL cuando los 9 V se aplican durante 30 minutos. De nuevo se demuestra que la aplicación de 9 V durante 10, 20 ó 30 minutos por si solo no produce ningún efecto bactericida. También se demostró que las espumas de carbón vítreo embebidas con los nanohilos de plata incubadas hasta un tiempo máximo de 24 horas en ausencia de corriente eléctrica tampoco producían ningún efecto sobre las bacterias a la concentración de nanohilos de plata ensayada. Por lo que se concluyó que, nuevamente, para la disminución de la población bacteriana era necesaria la combinación de varios factores: la aplicación de voltaje para favorecer la oxidación de los nanohilos de plata y la incubación durante 24 horas para facilitar la actuación de los iones plata.

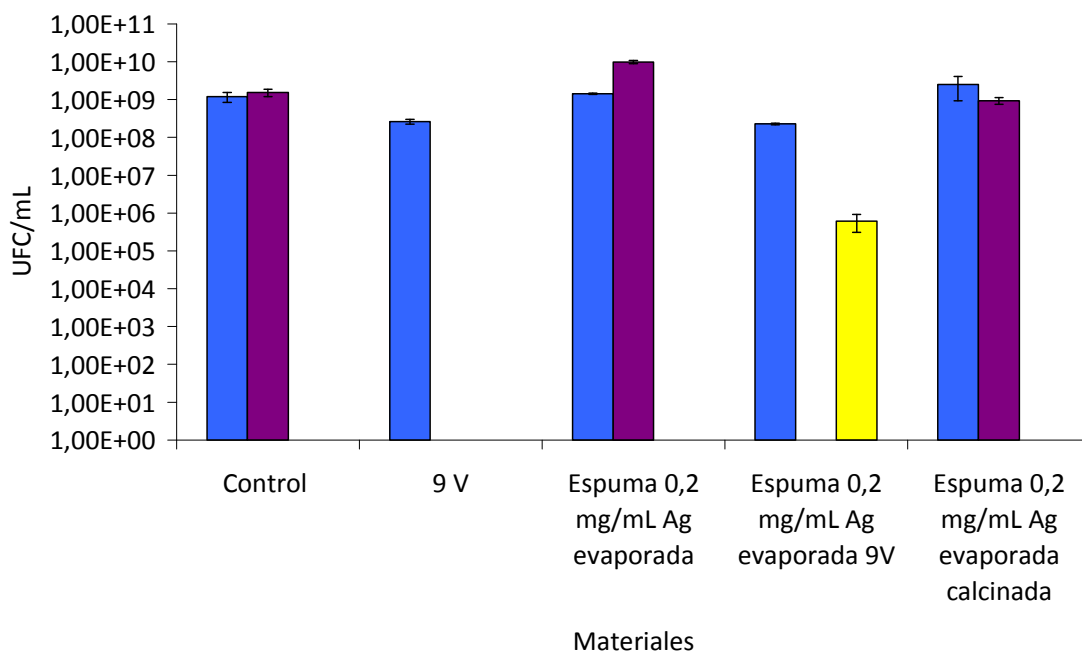
#### ■ PLATA DEPOSITADA POR CVD A UNA CONCENTRACIÓN 0,2 mg/mL DE MEDIO DE CULTIVO

En este apartado se decidió suministrar plata en una forma diferente a los nanohilos debido a que, aunque los nanohilos de plata embebidos en las espumas producían una disminución de la población bacteriana en torno a cinco unidades logarítmicas, no se producía una eliminación total. Por ello, se depositó por CVD 1 mg de plata en cada



espuma que se pusieron en 5 mL de cultivo estacionario dando lugar a una concentración de plata de 0,2 mg de plata/mL de cultivo estacionario.

Algunas de estas espumas se calcinaron en oxígeno para cambiar el estado de oxidación de la plata y así, estudiar si esta variación producía algún efecto sobre las bacterias.



**Figura 5.7.** Ensayos bactericidas con plata depositada por CVD sobre espumas de carbono vítreo sin y con voltaje 9 V. Tiempos: 30 minutos (azul), 24 horas (morado), 9 V 30 minutos + 24 horas (amarillo)

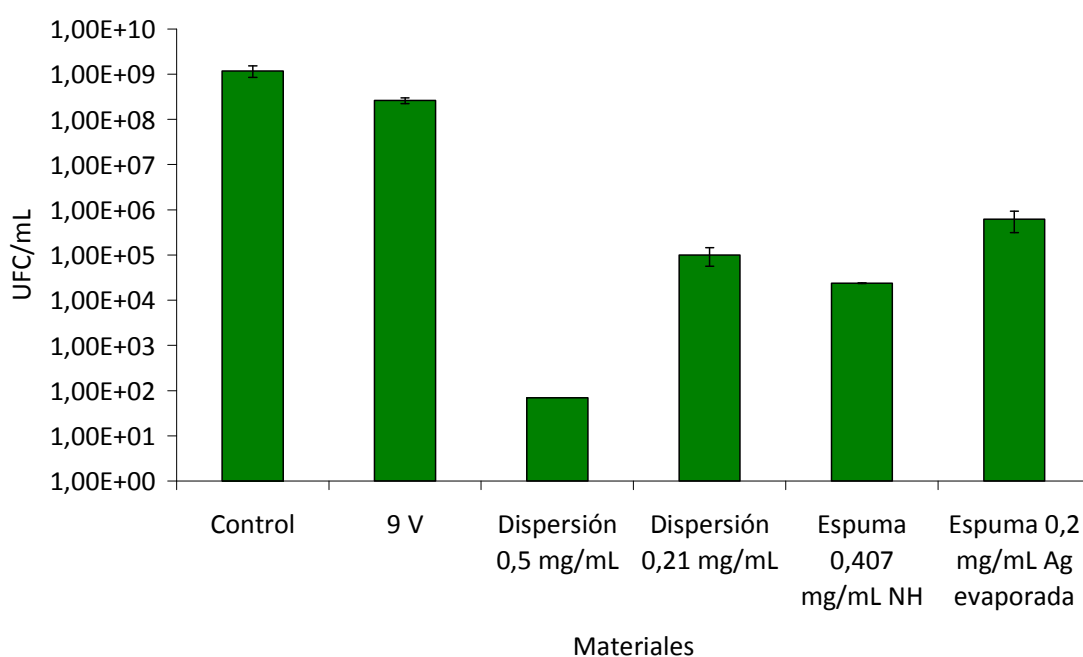
Se observa en la Figura 5.7, que de nuevo fue necesario un periodo de incubación de 24 horas a 37°C tras la aplicación de voltaje durante 30 minutos, para obtener el mayor efecto antimicrobiano obteniendo valores de  $6,17 \times 10^5$  UFC/mL. De nuevo se demuestra que es necesaria la aplicación de corriente eléctrica a los soportes con plata, y que es esta combinación la que tiene efectos bactericidas, ya que ni el voltaje ni la plata depositada por CVD producen una disminución de la población bacteriana significativa. Por otro lado, la calcinación de las espumas con la plata depositada para cambiar su estado oxidación no tuvo ningún efecto destacable sobre las bacterias, en el ensayo que se hizo sin aplicar voltaje.

De este modo, se pudo observar que los nanohilos de plata embebidos en las espumas de carbón vítreo (Figura 5.6) tenían un poder bactericida ligeramente superior a cuando las espumas cubiertas de plata por CVD (Figura 5.7) (pasando de  $2,38 \times 10^4$  UFC/mL a  $6,17 \times 10^5$  UFC/mL), aunque los resultados no son comparables porque para los nanohilos de plata embebidos en espumas de carbón vítreo se tenía una concentración de 0,407mg/mL de cultivo, mientras que se partía 0,2 mg/mL de cultivo para el caso de las espumas depositadas con plata por CVD. En ambos casos en las mejores condiciones de efecto antimicrobiano fueron de nuevo la combinación de los

dos efectos, corriente eléctrica a 9 V durante 30 minutos y posterior incubación durante 24 horas a 37°C.

### 5.3.4 Estudio a 9 V 30 minutos y 24 horas de incubación a 37°C

Finalmente en la Figura 5.8, se representan todas las variantes de nanohilos (y plata depositada por CVD) en las condiciones que más efecto antimicrobiano se obtuvo, 30 minutos con 9 V y 24 horas de incubación a 37°C, es decir una combinación de una aceleración inicial de la oxidación de los nanohilos de plata debido a la aplicación de corriente, y una oxidación en el medio por el paso del tiempo. En todos los casos, se comprobó un efecto microbiano elevado con una disminución de entre cuatro y cinco unidades logarítmicas.



**Figura 5.8.** Ensayos bactericidas en las condiciones de 30 minutos con 9 V y 24 horas de incubación a 37°C

Como se observa en la Figura 5.8, la mejor condición, para la eliminación bacteriana, de los nanohilos consistió en utilizar una concentración de 0,5 mg/mL y cuando se encontraban dispersos en el cultivo estacionario. Por un lado vemos que es la mayor concentración de plata aplicada en los ensayos de este apartado, por lo que es lógico pensar que produjera un mayor efecto bactericida. Por otro lado, cuando los nanohilos se dispersan en el cultivo bacteriano, estos quedan distribuidos por los 5 mL de cultivo estacionario y no solo al fondo, por lo que se favorece el paso de la corriente eléctrica por todos los nanohilos y por tanto la oxidación de la plata. Sin embargo, la plata, tanto en forma de nanohilos como depositada por CVD, en las espumas de carbono queda al fondo de cultivo bacteriano, sin que esta plata este bien distribuida por el cultivo bacteriano, por lo que el paso de la corriente por esta no se ve facilitado y

habría una menor oxidación y por tanto, menos formación de iones plata para producir una disminución de la población bacteriana.

## Capítulo 6

### Combinación con peróxidos

#### 6.1 ADSORCIÓN CON ÁCIDO PEROXIACÉTICO

#### 6.2 CARACTERIZACIÓN

6.2.1 Microscopía electrónica de transmisión

6.2.2 Análisis termogravimétrico

6.2.3 Adsorción de nitrógeno

6.2.4 Difracción de rayos X

6.2.5 Espectroscopía de absorción atómica

#### 6.3 ENSAYOS BACTERICIDAS

6.3.1. Compuestos individuales

6.3.2. Zeolitas

#### 6.4 MCM41 SINTETIZADA EN EL LABORATORIO Y MCM41-MagNPs

6.4.1. MCM 41 sintetizada en el laboratorio. Conservación en el tiempo del PAA

6.4.2. Ensayos bactericidas de la MCM 41-MagNPs con y sin AgNPs; con y sin PAA

#### 6.5 SBA15-APTES CON AgNPs A ELEVADA Y BAJA CONCENTRACIÓN CON PAA

#### 6.6 EFECTO DEL ÁCIDO PEROXIACÉTICO

6.6.1 Medición de las especies reactivas de oxígeno

6.6.2 Observación del *biofilm* bacteriano

#### 6.7 COMPARACIÓN DE LOS MATERIALES

## 6. COMBINACIÓN CON PERÓXIDOS

En este capítulo, se describen las combinaciones de las zeolitas comerciales en forma de pellet y la zeolita ZSM5 sintetizada en nuestro laboratorio, así como de los materiales mesoporosos MCM 41 y SBA 15, con y sin plata, con peróxidos, más concretamente con el ácido peroxiacético (o peracético) (PAA).

Se decidió combinar estos materiales con el ácido peracético porque es un buen agente antimicrobiano debido a su alto poder oxidante usado contra un amplio número de microorganismos como se ha mencionado anteriormente. Además tiene diversas aplicaciones industriales, ya que se utiliza en torres de refrigeración, en la industria alimentaria para la desinfección de superficies y en el tratamiento de aguas residuales [74]. Por otro lado, al ser una molécula de pequeño tamaño, puede ser adsorbida en los poros de diferentes materiales nanoestructurados como son las zeolitas y en los materiales mesoporosos.

### 6.1 ADSORCIÓN CON ÁCIDO PEROXIACÉTICO

El ácido peroxiacético que se utilizó, fue una solución comercial con 36-40 % en peso de ácido peroxiacético en ácido acético (Sigma-Aldrich®). Se vende en disolución con ácido acético y peróxido de hidrógeno para así mantener el equilibrio y estabilidad de los compuestos químicos como se ha dicho anteriormente.

Las cantidades de materiales y de ácido peracético usadas en el proceso de adsorción se detallan en la Tabla 6.1.

**Tabla 6.1.** Adsorción de PAA. Relación de gramos de material y mililitros de solución de PAA

Método	Cantidad material (g)	PAA (mL)
H <sup>+</sup> -ZSM5	5	20
Ag-ZSM5	3	12
AgNPs-ZSM5	0,3	2,4
Ag-ZSM5 (con NaNO <sub>3</sub> )	2	8
Zeolita comercial en forma de pellets	3	12
SBA15	0,5	4
SBA15-APTES	0,5	4
SBA15-APTES-Ag-A	0,25	2
SBA15-APTES-Ag-B	0,5	4
MCM41(laboratorio)	3	12
MCM41-MagNPs	0,25	2
MCM41-MagNPs-AgNPs	0,5	4

El procedimiento que se eligió fue añadir la cantidad determinada del material y del ácido peroxiacético y ponerlo bajo agitación magnética (excepto en la MCM41-MagNPs y MCM41-MagNPs-AgNPs que se usó agitación en orbital) durante 24 horas.

La solución estuvo tapada, a temperatura ambiente y en ausencia de luz. Pasado este tiempo, se filtró por gravedad y se dejó secar en ausencia de luz y tapando el material. Una vez el material estuvo seco, se guardó en viales sellados de forma hermética, para evitar la pérdida del ácido peroxiacético, debido a su elevada presión de vapor (20 mm de Hg a temperatura ambiente [368]).



**Figura 6.1.** Blanqueamiento de los materiales al adsorberse PAA. **A)** Ag-ZSM5, AgNPs-ZSM5 y AgNPs-ZSM5-PAA. **B)** Zeolita comercial en forma de pellets y Zeolita comercial en forma de pellets con PAA. **C)** MCM 41-MagNPs, MCM41-MagNPs-AgNPs y MCM41-MagNPs-AgNPs-PAA. **D)** SBA 15-APTES, SBA 15-APTES-Ag-B y SBA 15-APTES-Ag-B-PAA. **E)** SBA 15-APTES-Ag-A y SBA 15-APTES-Ag-A-PAA

Además en la Figura 6.1, se puede observar como todos los materiales después de ser expuestos al ácido peroxiacético, recuperan su color blanco anterior al haberles incorporado AgNPs (excepto en el caso de la MCM41-MagNPs, que en su forma inicial era anaranjado por la nanopartículas magnéticas, y por tanto recuperó este color). Esto indicaría una oxidación de las AgNPs, pasando de plata metálica a plata iónica. Mediante microscopía electrónica de transmisión (apartado siguiente) se observó que las AgNPs no se pierden, aunque se reducen de tamaño.

Por otro lado, en los materiales H-ZSM5 y Ag-ZSM5 se adsorbió peróxido de hidrógeno para comparar su efecto con el del ácido peroxiacético. En este caso la adsorción se hizo por el método de humedad incipiente, siendo el volumen total de poros aproximado de la zeolita ZSM5 de aproximadamente  $1 \text{ cm}^3/\text{g}$  (dato obtenido de su isoterma de adsorción de  $\text{N}_2$ ).

Otras de las modificaciones llevadas a cabo, consistieron en eliminar la plata de la Ag-ZSM5. Para ello, se pusieron 0,3 g de material con una concentración de 50mM de  $\text{NaNO}_3$  en un volumen de 50 mL. El medio se renovó a las 8, 24, 32, 48, 56 y 72 horas, para forzar el intercambio entre la plata y el sodio. Una vez el material había perdido la práctica totalidad de los iones plata, se filtró y se secó y se puso en contacto con ácido peroxiacético, con el objeto de comparar el efecto bactericida entre H-ZSM5-PAA y la Ag-ZSM5 a la que se le ha quitado la plata y se le ha adsorbido el ácido peroxiacético.

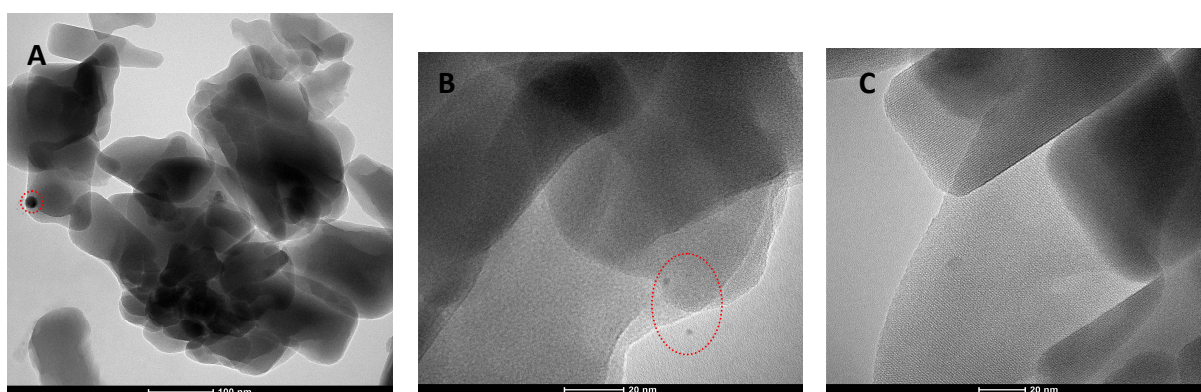
## 6.2 CARACTERIZACIÓN

A continuación en este capítulo se muestran los resultados de caracterización de los materiales estudiados en este apartado.

### 6.2.1 Microscopía electrónica de transmisión

#### ■ DIFERENCIA ENTRE Ag-ZSM5 Y LA Ag-ZSM5-PAA

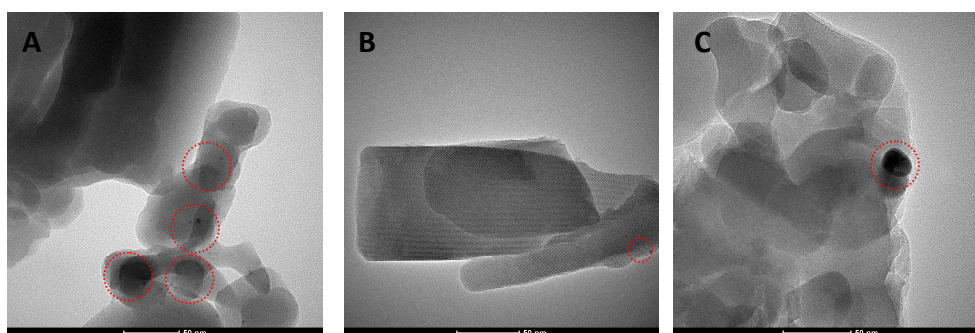
En la Figura 6.2, podemos observar que en ambos materiales se detectan pequeños agrupamientos de plata metálica que ya observamos anteriormente en la Ag-ZSM5. Estos agrupamientos de plata, no se encuentran uniformemente repartidos y existen en muy poca cantidad debido al bajo contenido en plata de la muestra (0,2% en peso de plata). Sin embargo, se puede observar como el PAA en algunos casos los reduce de aproximadamente 15 nm a tamaños de 5 nm aproximadamente. Por otro lado, en algunas microfotografías de la Ag-ZSM5-PAA no se observó ningún agrupamiento.



**Figura 6.2.** Imágenes de TEM mostrándose la **A)** Ag-ZSM5 y **B)** y **C)** Ag-ZSM5-PAA. Se puede observar como el PAA reduce los pequeños agrupamientos de plata (**B**), o los elimina (**C**)

#### ■ DIFERENCIA ENTRE AgNPs-ZSM5 Y LA AgNPs-ZSM5-PAA

Las fotografías de la Figura 6.3, demostraron que la adsorción con ácido peroxiacético disminuye el tamaño y cantidad de las AgNPs. Sin embargo, todavía se siguen observando agrupamientos de plata metálica. En la AgNPs-ZSM5 se observan varios agrupamientos, que corresponden a plata, de un tamaño diverso. Unos agrupamientos entorno a 25-30 nm y otros más pequeños de 1-3 nm. Sin embargo, en la AgNPs-ZSM5-PAA, el número de agrupamientos se reduce, y los más grandes tienen un tamaño de 20 nm aproximadamente.

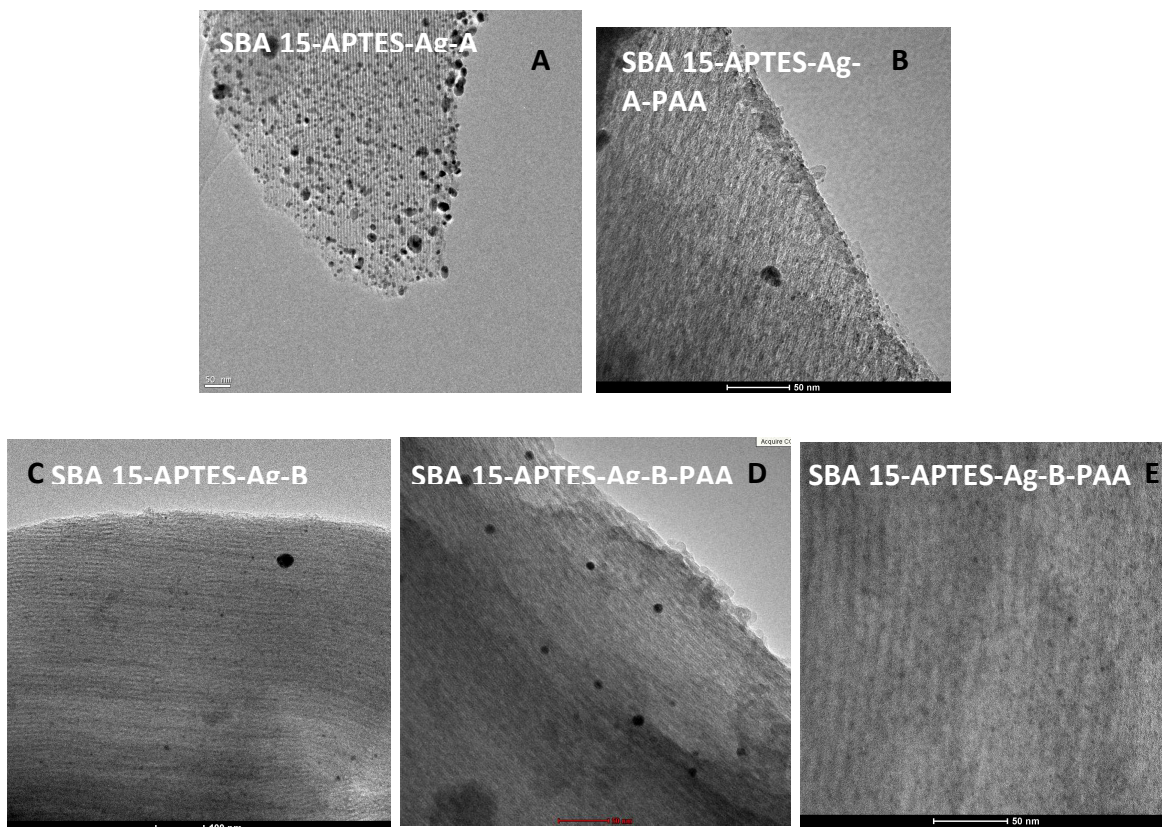


**Figura 6.3.** Imágenes de TEM donde se muestran los diversos agrupamientos de plata metálica en **A)** AgNPs-ZSM5 y en **B)** y **C)** AgNPs-ZSM5-PAA



▪ DIFERENCIA ENTRE LA SBA15 APTES CON ELEVADA Y BAJA CONCENTRACIÓN DE AgNPs, CON Y SIN PAA

En la Figura 6.4, aparecen fotografías de las diferentes variantes realizadas con la SBA 15 APTES.

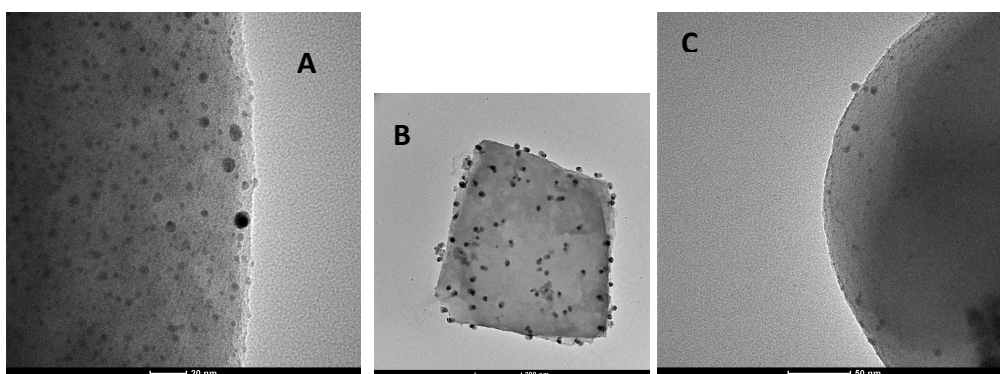


**Figura 6.4.** Imágenes de TEM donde aparecen AgNPs en **A)** SBA 15-APTES-Ag-A, **B)** SBA 15-APTES-Ag-A-PAA, **C)** SBA 15-APTES-Ag-B, **D)** y **E)** SBA 15-APTES-Ag-B-PAA

Se pudo observar en ambos casos, una disminución de la cantidad y del tamaño de las AgNPs y de los grandes acumulamientos de plata tras la adsorción del ácido peroxiacético. Las AgNPs decrecen de un tamaño medio de 7,5 nm antes del ácido peroxiacético, a un tamaño medio de 4,9 nm (valores medios obtenidos tras medir el tamaño de al menos 15 AgNPs de diferentes microfotografías del mismo material). Muchos de los agrupamientos de plata de un tamaño superior a 20 nm disminuyen a un tamaño comprendido entre 10-15 nm.

▪ DIFERENCIA ENTRE LA MCM41-MagNPs-AgNPs Y MCM41-MagNPs-AgNPs-PAA.

Las fotografías correspondientes a este material, aparecen en la Figura 6.5.

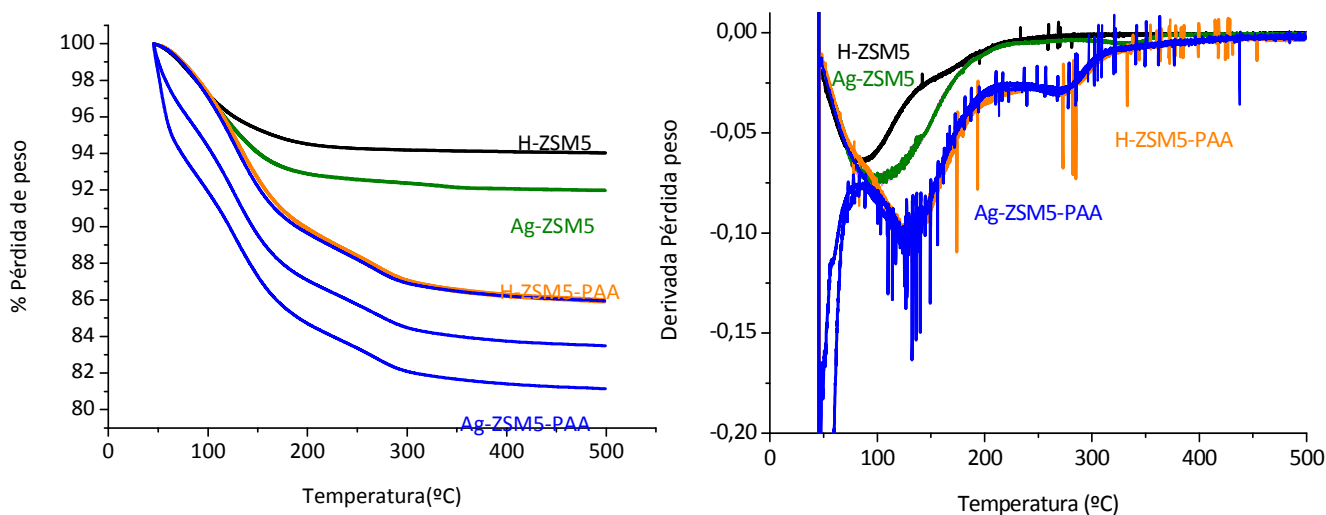


**Figura 6.5.** Imágenes de TEM donde se pueden observar las AgNPs y las MagNPs de: **A)** MCM 41-MagNPs-AgNPs y **B)** y **C)** MCM 41-MagNPs-AgNPs con PAA

En este caso, aunque se observó una disminución de las AgNPs, no se pudo ver una disminución significativa de su tamaño, así como, se ha mostrado en el apartado 4.2.3 tampoco se pudo diferenciar entre AgNPs y nanopartículas magnéticas.

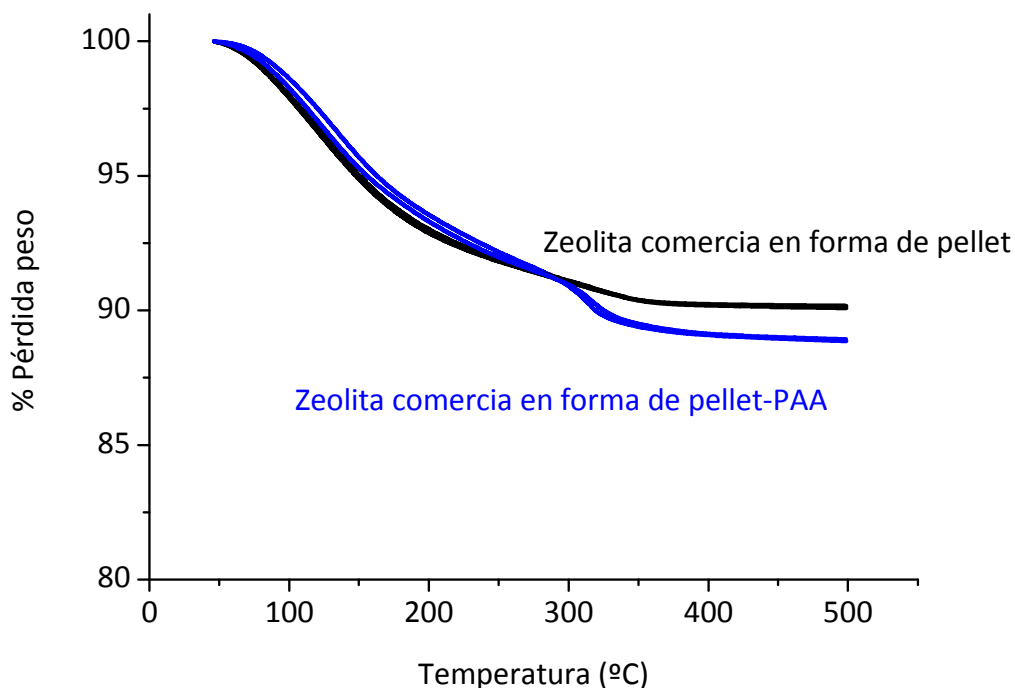
### 6.2.2 Análisis termogravimétrico

Gracias a esta técnica, se pudo cuantificar el ácido peroxiacético adsorbido en los poros de los materiales. Las representaciones de los análisis termogravimétricos (TGA) de los diferentes materiales se pueden observar en las Figuras 6.6.



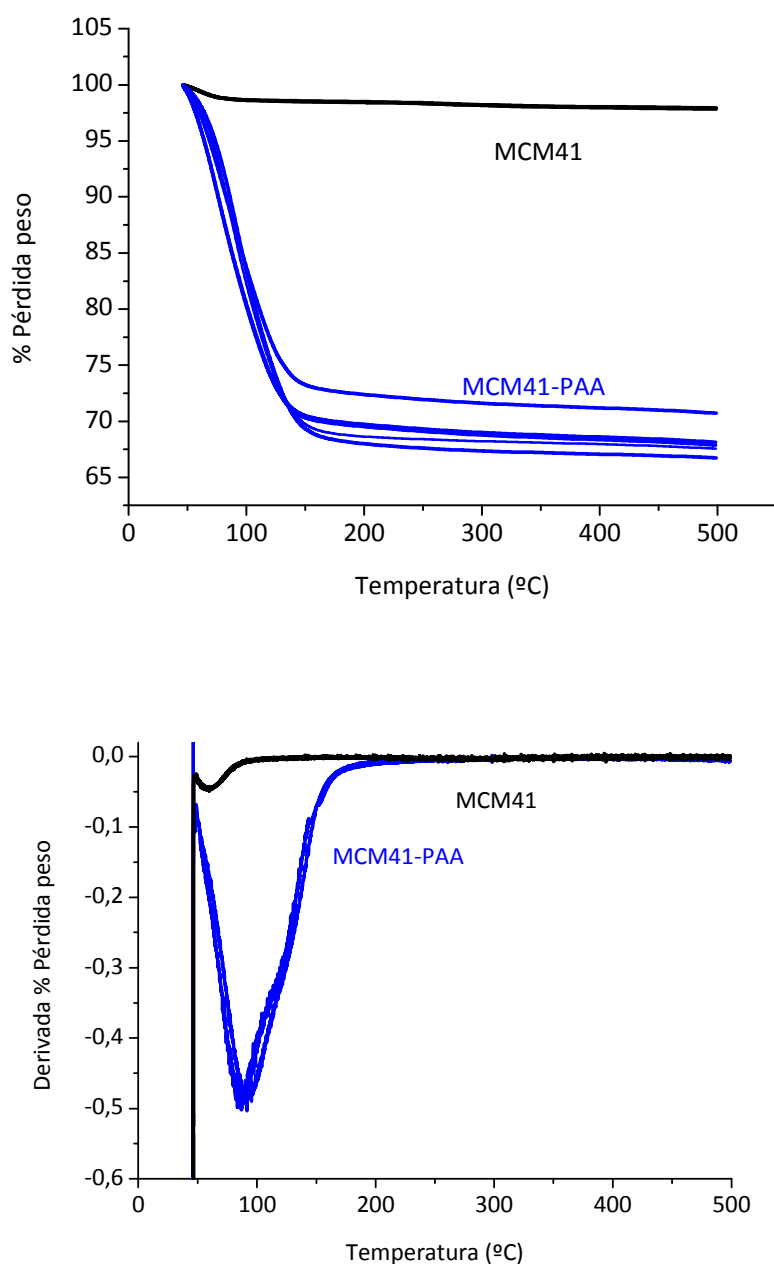
**Figura 6.6.A.** Diagrama de TGA H-ZSM5 (negro), Ag-ZSM5 (verde), H-ZSM5-PAA (naranja), Ag-ZSM5-PAA (azul) y derivada de la pérdida de peso de los mismos materiales donde se muestran los mínimos uno en torno a 100°C y el otro a 270-300°C. La variación de adsorción del 4% de PAA en Ag-ZSM5-PAA se debió al hecho de que unos análisis se realizaron inmediatamente después de su adsorción y otros al cabo de 20 días y mes y medio

La Figura 6.6.A nos muestra que adsorbió un 8 % en peso de PAA en la HZSM5 y un 9 % en peso en la Ag-ZSM5 (media de 8,5%). Para calcular la carga de PAA en todas las gráficas de este apartado, se realizó la diferencia entre el porcentaje de la pérdida de peso de un material sin PAA (por ejemplo, H-ZSM5) y su correspondiente con PAA (por ejemplo, H-ZSM-PAA) asumiendo que ambos materiales adsorben la misma cantidad de agua. Según la derivada del porcentaje de pérdida de peso, hay una pérdida de peso alrededor de 100°C que correspondería al agua en los materiales sin PAA, y en los muestras con PAA a 100°C que sería una mezcla de agua y PAA y a 270°-300°C que sería PAA.



**Figura 6.6.B.** Diagrama de TGA de la zeolita comercial en forma de pellet (negro) y de la zeolita comercial en forma de pellet-PAA (azul)

La zeolita comercial en forma de pellet viene representada en la Figura 6.6.B, y presenta una adsorción de 1,2 % en peso de PAA. Las temperaturas a las que se perdió peso fueron muy similares a las de la zeolita ZSM5. La diferencia de carga de PAA entre la zeolita ZSM5 y la zeolita comercial en forma de pellet se atribuyó al empaquetamiento del material. Mientras que en la ZSM5 el material está en forma de polvo disperso, el material comercial se presenta como pellets de 1,6 mm por lo que el acceso del PAA al interior de los poros que estaban en la parte interna de los pellets es menor.

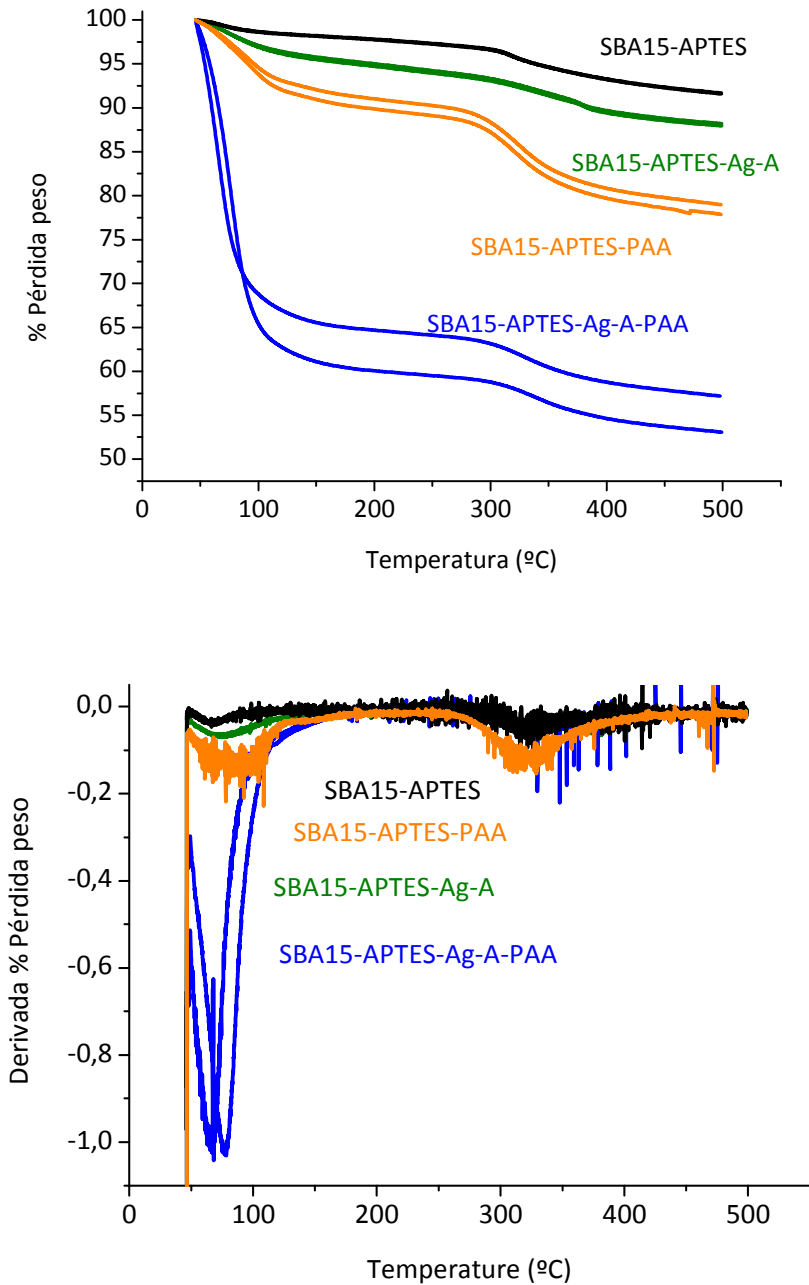


**Figura 6.6.C.** Diagrama de TGA y de la derivada de la pérdida de peso de MCM41 (negro) y MCM41-PAA (azul).

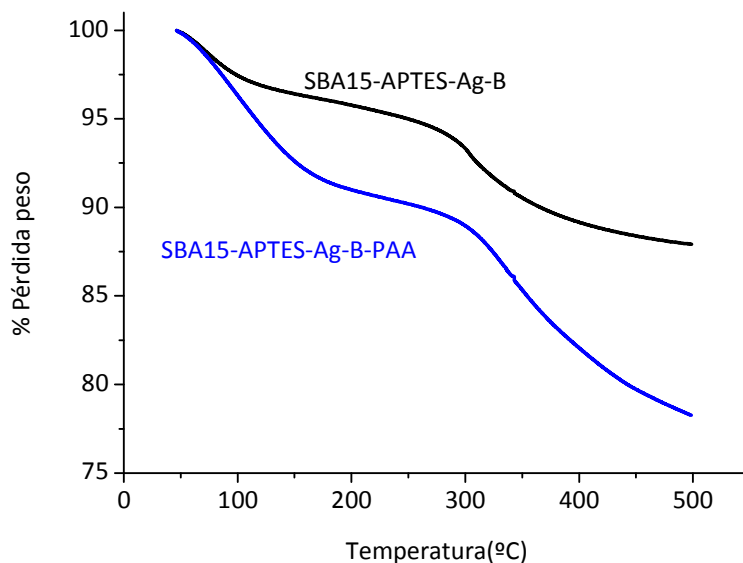
*Las diferentes curvas correspondientes a MCM-41 provienen de análisis realizados al día siguiente de la adsorción, al mes y a los dos meses*

Respecto a la MCM41 sintetizada en el laboratorio, se pueden observar los resultados en la Gráfica 6.6.C. Se produjo un 30 % en peso de adsorción de PAA. En la MCM41, se observó a 60°C un pequeño pico de pérdida de peso según la gráfica de la derivada del porcentaje de pérdida de peso que se atribuiría al agua. Sin embargo, con la MCM41-PAA el picó se observó a 80°C, el cual fue mucho más pronunciado. Cabe destacar, que las gráficas que aparecen de MCM41-PAA corresponden a análisis hechos al día

siguiente de la adsorción, al mes y a los dos meses, y se pudo comprobar que bajo buen almacenamiento hermético del material, el PAA se mantenía en la estructura.



**Figura 6.6.D.** Diagrama de TGA y derivada del porcentaje de la pérdida de peso de SBA15-APTES (negro), SBA 15-APTES-Ag-A (verde), SBA15-APTES-PAA (naranja), SBA15-APTES-Ag-A-PAA (azul)



**Figura 6.6.E.** Diagrama de TGA de SBA15-APTES-Ag-B (negro), SBA15-APTES-Ag-B-PAA (azul)

Seguidamente, en las Figura 6.6.D y en la Figura 6.6.E, se observó una adsorción de 14% en peso de PAA en la SBA15-APTES-PAA (comparada con la SBA15-APTES), de 24 % en peso en la SBA15-APTES-Ag-A-PAA (comparada con la SBA15-APTES-Ag-A), y de 13% en la SBA15-APTES-Ag-B-PAA (comparada con SBA15-APTES-Ag-B). En estos materiales se observó dos temperaturas de pérdida de peso que fueron sobre 70°C y entre 270°C-300°C. En el caso de los materiales sin PAA, se pensó que corresponderían al agua y al APTES (punto de ebullición 217°C), y los picos fueron muy pequeños. En el caso de los materiales con PAA los puntos fueron muchos más pronunciados, ya que además de agua y APTES se perdía PAA.

Gracias a estos análisis, se pudo observar que los materiales mesoporosos, eran capaces de adsorber más ácido peroxiacético, ya que sus poros y sus superficies específicas son más mayores. La SBA15, a pesar de tener los poros más grandes que la MCM 41, 9-10 nm y 3-5 nm respectivamente, adsorbió menos PAA, lo cual puede ser debido a que la SBA15 estaba funcionalizada con APTES y por tanto este compuesto cambia la adsorción en los poros que impedía la carga de más PAA. A pesar de esto, se obtenía un 24% de adsorción del PAA en SBA15-APTES-Ag-A.

### 6.2.3 Adsorción de nitrógeno

Mediante la adsorción de nitrógeno, se determinó la superficie específica y la distribución de tamaño de poro en el material SBA15-APTES con elevada concentración de AgNPs con y sin PAA.

**Tabla 6.2.** Caracterización superficial mediante adsorción de nitrógeno

Material	Área superficial BET (m <sup>2</sup> /g)	Tamaño de poro (nm)
SBA15-APTES elevada concentración AgNPs	351,47	7,41
S15APTES elevada concentración AgNPs-PAA	180,38	6,84

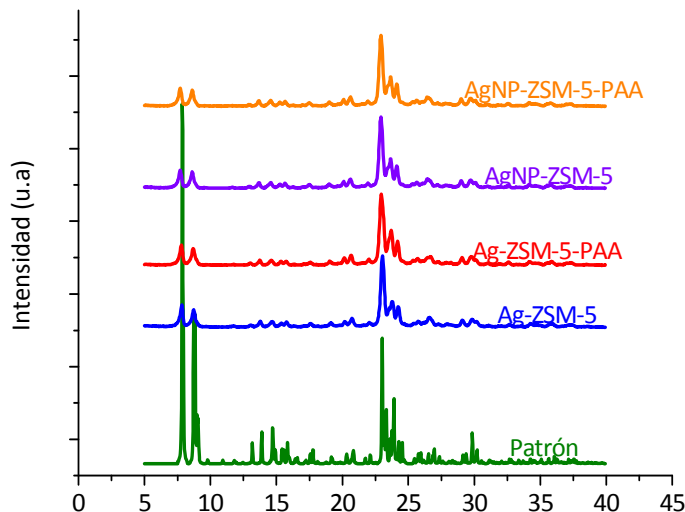
Como se muestra en la Tabla 6.2, se produjo una disminución aparente del área superficial y el tamaño de poro en el material con PAA adsorbido respecto al material que no lo llevaba. Esto es lo que se esperaba, ya que el PAA ocupa volumen dentro de los poros.

### 6.2.4 Difracción de rayos X

Mediante esta técnica se caracterizaron varios materiales:

- XRD DE LA ZSM5 CON SUS VARIANTES

En la Figura 6.7 se muestra el XRD de todas las variantes de la ZSM5 realizadas en este trabajo.



**Figura 6.7.** Diagrama de XRD de las variantes de la ZSM5 con sus diferentes variantes

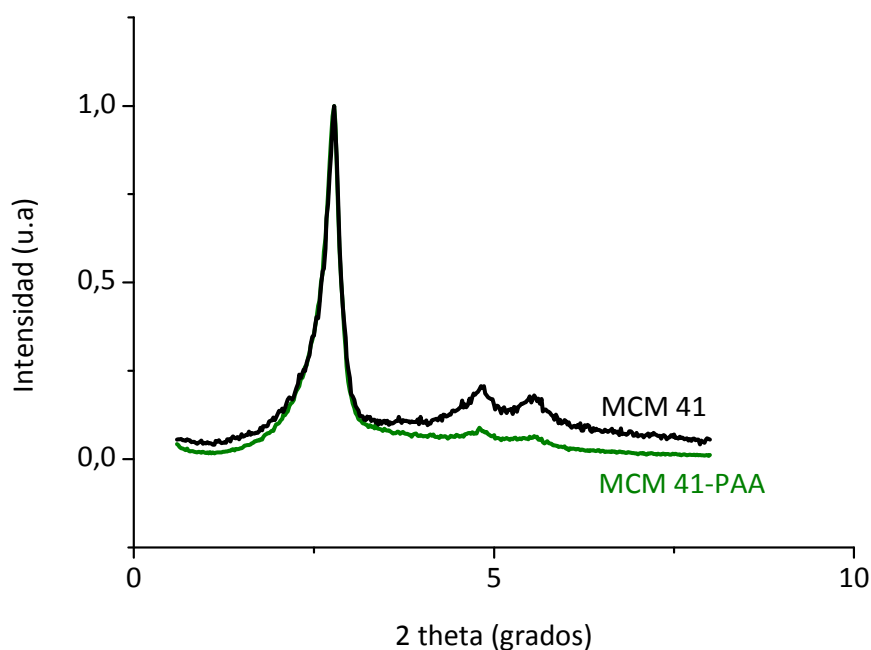
Gracias a esta técnica se pudo corroborar que la estructura cristalina de la ZSM5, tanto en las muestras intercambiadas con plata como con AgNPs, se mantiene y por tanto resiste el tratamiento con el ácido peroxiacético. No se observaron cambios en la cristalinidad ni nuevos picos provenientes de las AgNPs o de la plata intercambiada, ya que, la concentración y tamaño de las AgNPs no alcanza los valores mínimos para producir difracción mediante XRD. Tampoco se produjo un ensanchamiento o



desaparición de los picos característicos de la ZSM5, por lo que, se determinó que el PAA no producía distorsión de la estructura cristalina microporosa de la zeolita.

▪ **SAXRD DE LA MCM41 Y MCM41-PAA**

Los datos de SAXRD de la MCM41 sintetizada en el laboratorio y la MCM41-PAA se muestran en la Figura 6.8.

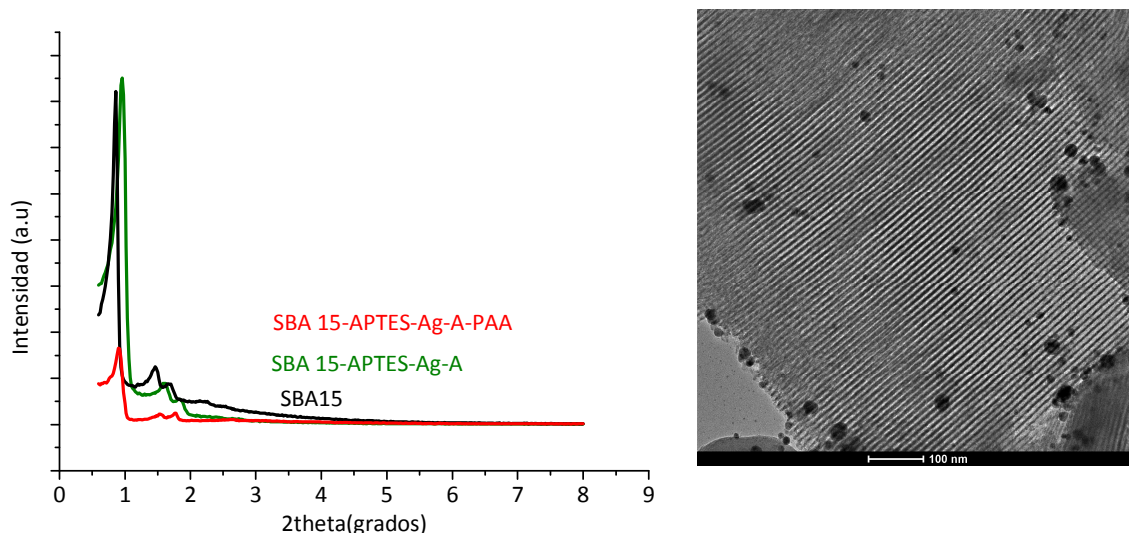


**Figura 6.8.** Diagrama de SAXRD de la MCM41 y MCM41-PAA

Se pudo observar que en la MCM41-PAA se mantenían los tres picos característicos de la MCM41 por lo que esto demostró que se mantenía la estructura de este material. Sin embargo, se produce un ensanchamiento de la base de los dos últimos picos que corresponden a ángulos mayores, por lo que la adsorción de PAA afectaría a la estructura de los poros de este material.

▪ **SAXRD DE LA SBA15 Y DIFERENTES VARIANTES**

En la Figura 6.9, se muestran los resultados obtenidos para las diferentes variantes de la SBA15.



**Figura 6.9.** Diagrama de SAXRD de la SBA15, SBA15-APTES-Ag-A y, SBA15-APTES-Ag-A-PAA. Microfotografía de TEM mostrando la estructura de planos de SBA15-APTES-Ag-A-PAA

Se observan todos los picos característicos de la SBA15, en SBA15-APTES-Ag-A y en SBA15-APTES-Ag-A-PAA por lo que esto demostró que se mantenía la estructura de este material. Pero, tanto para SBA15-APTES-Ag-A como para SBA15-APTES-Ag-A-PAA se produce un desplazamiento de los picos hacia valores mayores, lo que corresponde a distancias menores entre planos. De nuevo, igual que en el caso de la MCM41-PAA, en el material con PAA se produce un ensanchamiento de la base de los dos últimos picos por lo que la estructura de los poros se vería afectada por este compuesto. Sin embargo cuando se muestra las microfotografías de TEM no se observa ningún tipo de afección a los planos y poros de este material.

### 6.2.5 Espectroscopía de absorción atómica

Con esta técnica se pudieran observar los siguientes parámetros.

- DIFERENCIA ENTRE LA CANTIDAD DE PLATA DE LA SBA15-APTES-Ag-A Y SBA15-APTES-Ag-B CON Y SIN PAA

Mediante esta técnica se pudo conocer la cantidad de plata que había en la SBA15-APTES con AgNPs a alta y baja concentración con y sin PAA, tal y como se muestra en la Tabla 6.3.

**Tabla 6.3.** AAS del porcentaje en peso de plata de la SBA15 con sus variantes

Material	% en peso de plata
SBA15-APTES-Ag-A	1,98%
SBA15-APTES-Ag-A -PAA	1,21%
SBA15-APTES-Ag-B	0,34%
SBA15-APTES-Ag-B -PAA	0,21%

Para saber la cantidad de plata existente en este material, se utilizó el proceso de digestión con agua regia previamente descrito en el apartado 4.1.5. Para ello, se dispersaron 20 mg de la muestra a digerir en 20 mL agua regia y se sometieron a tratamiento hidrotermal a 200°C durante 25 minutos en un horno de microondas (Milestone®, Ethos plus). Una vez terminada esta primera digestión se sacó la muestra y se añadieron 10 mL de ácido fluorhídrico (Panreac®) que se dejó actuar durante toda una noche. Al día siguiente las muestras se traspasaron a un matraz donde se aforaron a 50 mL con agua destilada.

Se pudo observar en ambos casos, que el proceso de adsorción con PAA conllevó una pérdida de plata significativa, que también se puede comprobar en el TEM (apartado 6.2.1), ya que en aquellas muestras que llevaban PAA se observó una disminución en el número y tamaño de AgNPs respecto a aquellas que no llevaban PAA. Este comportamiento se atribuye a que la naturaleza ácida del PAA producía una disolución de las AgNPs y por tanto, esto comportaba una pérdida de plata del material o a una reducción de su tamaño.

▪ **DIFERENCIA ENTRE LA CANTIDAD DE PLATA DE LA Ag-ZSM5 CON Y SIN PAA**

Por medio de esta técnica también se pudo vislumbrar la diferencia de cantidad de plata existente entre la Ag-ZSM5 con y sin PAA.

Para obtener estos resultados, se hizo un intercambio de la Ag-ZSM5 con NaNO<sub>3</sub> renovando el medio a 8, 24, 32, 48, 56 y 72 horas y guardando el sobrenadante obtenido tras la centrifugación del material en cada tiempo para ser analizado por AAS. El protocolo se realizó de acuerdo al método explicado en el apartado 3.1.4.

En la Tabla 6.4, aparece la media de los valores obtenidos con dos concentraciones diferentes. Se realizaron los ensayos con dos concentraciones diferentes, ya que se pensó que probando una concentración mayor se podría obtener una mayor extracción de plata. Sin embargo, los resultados fueron muy similares con ambas concentraciones, debido a que con la concentración menor ya se producía toda la posible extracción de la plata y por ello en la Tabla 6.4 aparece una media de los resultados obtenidos con ambas concentraciones:

- 50 mM de NaNO<sub>3</sub> en 50 mL con 0,3 g de material
- 0,1 M de NaNO<sub>3</sub> en 50 mL con 0,3 g de material

También en la Tabla 6.4, se muestra la comparación con los datos obtenidos por XPS. Se observó que existía una buena concordancia entre los resultados obtenidos por ambas técnicas

**Tabla 6.4.** Resultados de AAS y XPS del porcentaje en peso de plata de la Ag-ZSM5 y Ag-ZSM5-PAA

Material	% en peso de plata por AAS	% en peso de plata por XPS
Ag-ZSM5	0,1%	0,15%
Ag-ZSM5-PAA	0,075%	0,08%

De nuevo se observó una disminución en el porcentaje de plata cuando se incorpora PAA. Para comprobar si en el proceso de adsorción del PAA se perdía plata se midió por esta técnica la cantidad de plata que quedaba en la solución de PAA que se separaba por filtración después de la adsorción. Se hizo lo mismo con la zeolita comercial en forma de pellet para tener una referencia de comparación. Esto se muestra en la Tabla 6.5:

**Tabla 6.5.** Resultados de AAS del PAA después de la adsorción

PAA después de adsorción en	Volumen adsorción (mL)	mg/L (ppm)
Ag-ZSM5	8	0,59
Zeolita Pellet	12	0,65

Con este análisis se pudo observar como durante este proceso de adsorción se perdía parte de la plata, tal y como se mostró en las diferentes microfotografías de TEM en el apartado 6.2.1, donde los diferentes materiales con plata reducían el tamaño y el número de AgNPs tras la adsorción de PAA.

▪ **DIFERENCIA DE LA LIBERACIÓN DE PLATA ENTRE Ag-ZSM5 CON Y SIN PAA**

Gracias a esa técnica, se pudo averiguar la cantidad de plata que liberaba al medio la Ag-ZSM5 con y sin PAA. Para ello, se hicieron dos tipos de experimentos, uno con centrifugación normal del material, y otro usando los tubos con filtro de tamaño de corte de 5 nm. Los experimentos de liberación fueron análogos a los realizados en apartados anteriores. Los resultados se muestran en la Tabla 6.6.A y Tabla 6.6.B:

**Tabla 6.6.A.** AAS de Liberación de plata expresada en ppms con tubos de centrifugación normales

Tiempo (h) / material (ppm)	Ag-ZSM5	Ag-ZSM5-PAA
4	17,565	14,08
6	22,81	13,86
24	22,555	16,015

**Tabla 6.6.B.** AAS de Liberación de plata expresada en ppms con tubos de centrifugación con filtro tamaño corte 5 nm

Tiempo (h) / material (ppm)	Ag-ZSM5	Ag-ZSM5-PAA
24	6,337	2,407

En ambos casos, se observó una disminución significativa en la liberación de plata desde la zeolita Ag-ZSM5 adsorbida con PAA. En el apartado anterior, se demostró, que en el proceso de adsorción se liberaba plata y por tanto, en el PAA sobrante de la adsorción quedaba de plata (0,59 ppm). La diferencia en la velocidad de liberación es considerable. Ello es debido a que el material sin el PAA tiene plata iónica en superficie

que se libera inmediatamente al medio pero al introducir el PAA durante el proceso de carga de dicho PAA se produce esa liberación inicial de plata y por eso se observaría una cinética distinta.

También se observó una gran disminución en la liberación de plata cuando se utilizaron aquellos tubos con filtro de tamaño de corte de 5 nm. Este fenómeno ya se había observado en capítulos anteriores (apartado 3.1.3) y se debe, a que estos filtros son capaces de retener los complejos de plata superiores a 5 nm que no quedan en el precipitado después de la centrifugación y por tanto darían señal en AAS.

▪ **DIFERENCIA DE LA LIBERACIÓN DE PLATA ENTRE Ag-ZSM5-PAA Y Ag-ZSM5-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Como se comentó en el apartado 6.1, la zeolita Ag-ZSM5 se puso en contacto con peróxido de hidrógeno, para posteriormente comprobar su efecto bactericida y compararlo con la Ag-ZSM5-PAA. En este caso, la adsorción se hizo por humedad incipiente, por lo que la pérdida de plata en este proceso se redujo, y por tanto la liberación de plata posterior fue mayor que la procedente de la Ag-ZSM5-PAA, tal y como se muestra en la Tabla 6.7:

**Tabla 6.7.** AAS de Liberación de plata con tubos de centrifugación con filtro tamaño corte 5 nm

Tiempo (h) / material (ppm)	Ag-ZSM5-PAA	Ag-ZSM5- H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
24	2,407	4,487

▪ **DIFERENCIA DE LA LIBERACIÓN DE PLATA ENTRE AgNPs COMERCIALES Y H-ZSM5 CON AgNPs COMERCIALES**

En este experimento, se pusieron en el medio de liberación 300 mg de AgNPs comerciales, misma cantidad que en todos los experimentos, y los resultados de velocidad de liberación se compararon con los de otro experimento donde se añadían 300 mg de H-ZSM5-PAA. Con esto se quería comprobar si el PAA oxidaba las AgNPs y por tanto se producía una mayor liberación de plata. Los tubos empleados para la centrifugación son aquellos que tienen un filtro de tamaño de corte de 5 nm. Los resultados se muestran en la Tabla 6.8.

**Tabla 6.8.** AAS de Liberación de plata con tubos de centrifugación con filtro tamaño corte 5 nm

Tiempo (h) / material (ppm)	AgNPs comerciales	AgNPs comerciales H-ZSM5-PAA
4	3,04	1,524
6	4,131	1,461
24	3,168	1,57

En lugar de observar una mayor liberación de cationes plata, a todos los tiempos, se detectó, una menor concentración de plata en las muestras con H-ZSM5-PAA. Una posible explicación que no descartaría una mayor oxidación de las AgNPs comerciales,

sería que la plata iónica liberada, al haber una zeolita protonada, se intercambiaba y se formaría Ag-ZSM5, por lo que parte de la plata sería “secuestrada” por la zeolita y por tanto no se podía detectar por espectroscopía de absorción atómica.

▪ **DIFERENCIA DE LA LIBERACIÓN DE PLATA ENTRE LA ZEOLITA COMERCIAL EN FORMA DE PELLET CON Y SIN PAA ADSORBIDO**

Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla 6.9.A y Tabla 6.9.B

**Tabla 6.9.A.** AAS de Liberación de plata con tubos de centrifugación normales (ppms)

Tiempo (h) / material	Pellet	Pellet-PAA
4	36,878	27,08
6	45,078	29,78
24	46,128	38,815

**Tabla 6.9.B.** AAS de Liberación de plata con tubos de centrifugación con filtros de tamaño de corte de 5 nm (ppm)

Tiempo (h) / material	Pellet	Pellet-PAA
4	5,649	19,08
6	5,609	19,515
24	5,28	24,81

Se puede observar una disminución en la liberación de plata en las muestras en las que se ha usado los tubos que incorporan el filtro.

Con los tubos normales, disminuye la liberación de plata cuando la zeolita comercial en forma de pellet se puso en contacto con PAA, pero la disminución no fue muy elevada (de aproximadamente de 8ppm a las 24 horas), debido probablemente a que durante la adsorción del PAA, este compuesto fue capaz de disolver parte de aquellos grandes agrupamientos de plata metálica que se mostraron en las microfotografías de TEM que aparecía en el apartado 3.1.4. Muchos de estos agrupamientos se oxidarían en el proceso de adsorción de PAA, reducirían su tamaño y número y, por tanto no darían tanta señal a la hora de ser analizados. Además, como se ha mostrado en el número dos de este apartado durante el contacto con la solución del PAA, los materiales perdían plata. Esta reducción del número de agrupamientos de plata y, principalmente, del aumento de oxidación de estos, se pudo comprobar cuando se utilizaron los tubos con filtro, ya que se retuvieron los complejos grandes de plata y se pudo observar mejor el aumento de oxidación de la plata, cuya liberación en este caso fue de casi 5 veces mayor en la presencia de PAA.

En el apartado anterior, igual que en la Ag-ZSM5-PAA, se demostró que en el proceso de adsorción se liberaba plata y por tanto, en el PAA sobrante de la adsorción quedaba una pequeña cantidad de plata.

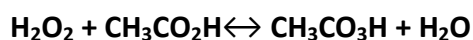
### 6.3 ENSAYOS BACTERICIDAS

A continuación se muestran los diferentes ensayos bactericidas realizados con los diferentes materiales con PAA.

#### 6.3.1. Compuestos individuales

- TOXICIDAD DEL ÁCIDO PEROXIACÉTICO (PAA), ÁCIDO ACÉTICO (AA), PERÓXIDO DE HIDRÓGENO (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

El PAA se suministró como una mezcla donde está en equilibrio con el ácido acético y con el peróxido de hidrógeno:



Por ello que se consideró oportuno medir el poder bactericida de todos estos componentes del equilibrio individualmente, sin estar adsorbidos a ningún material, tanto en un cultivo en fase estacionaria como con un cultivo en fase exponencial.

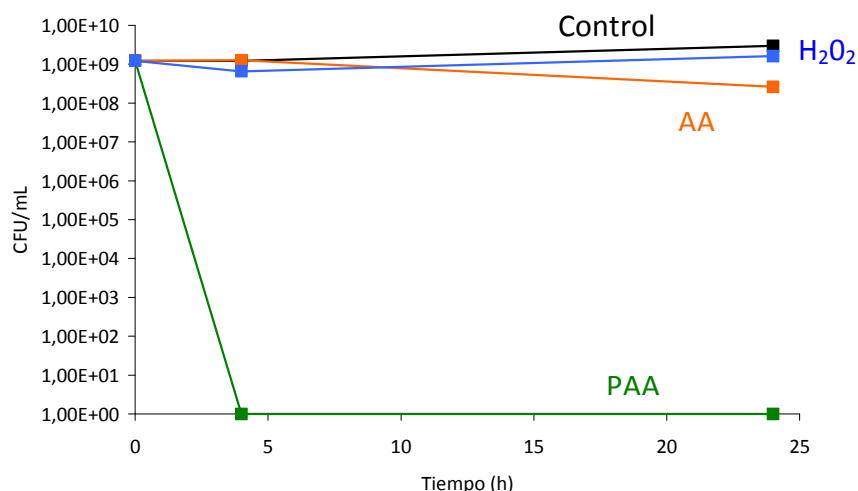
Para 2 mL de cultivo, se añadieron:

- 4,51 µL de PAA
- 2,14 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- 1,38 µL de AA

Estos valores corresponden aproximadamente a los valores obtenidos a partir de la pérdida de peso mediante análisis termogravimétrico de la Ag-ZSM5-PAA, H-ZSM5-PAA, H-ZSM5 y Ag-ZSM5, tal y como se ha mostrado anteriormente, dando un 8,5 % en peso de adsorción del PAA.

Las cantidades correspondientes se ajustaron a los 60 mg de material que se ponían en 2 mL de cultivo, usando los pesos moleculares, la concentración de los compuestos y las densidades que indicaba el fabricante.

En la Figura 6.9, se muestran los ensayos bactericidas obtenidos con cultivo en fase estacionaria.



**Figura 6.9.** Ensayos bactericidas en cultivo estacionario del PAA (verde), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (azul) y AA (naranja). Control (negro)

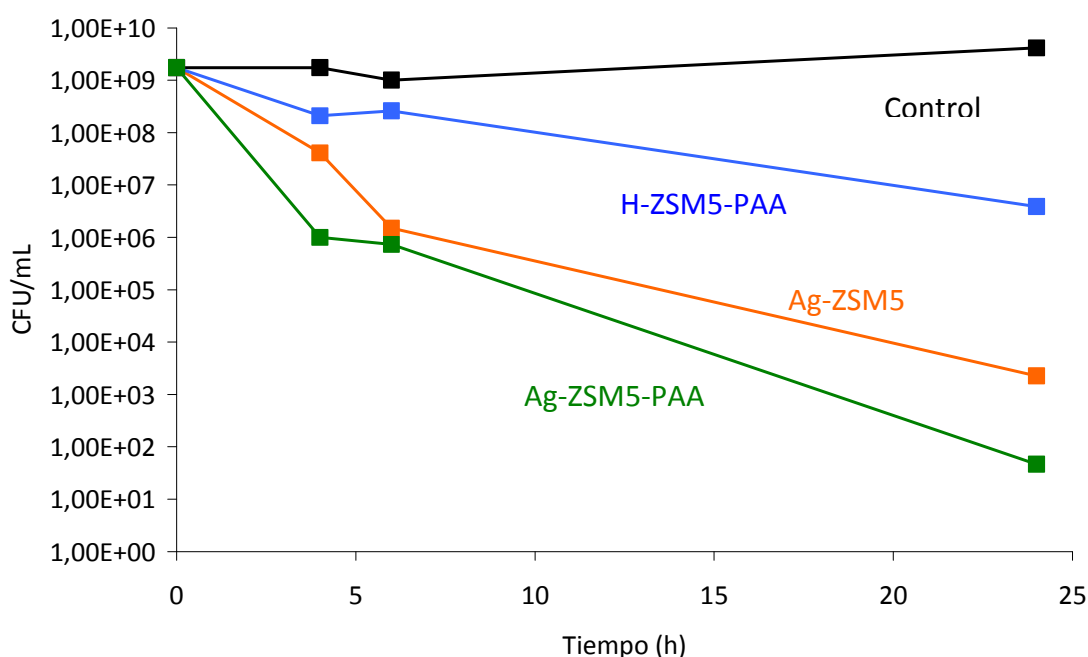


Los resultados de la gráfica permiten comprobar que el efecto antimicrobiano se debe fundamentalmente al PAA. En el ensayo con PAA a las 4 horas eliminaron todas las bacterias, mientras que el AA tuvo un ligero poder bactericida a tiempos largos, con una disminución de una unidad logarítmica respecto al control. Por el contrario, con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no se observó ningún efecto antimicrobiano. Se pensó, que esto podría ser debido a la pequeña concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que se añadió al ensayo, pero principalmente, al hecho de que esta bacteria es catalasa positiva y por tanto, es capaz de degradar la pequeña concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para así evitar el efecto tóxico de este compuesto.

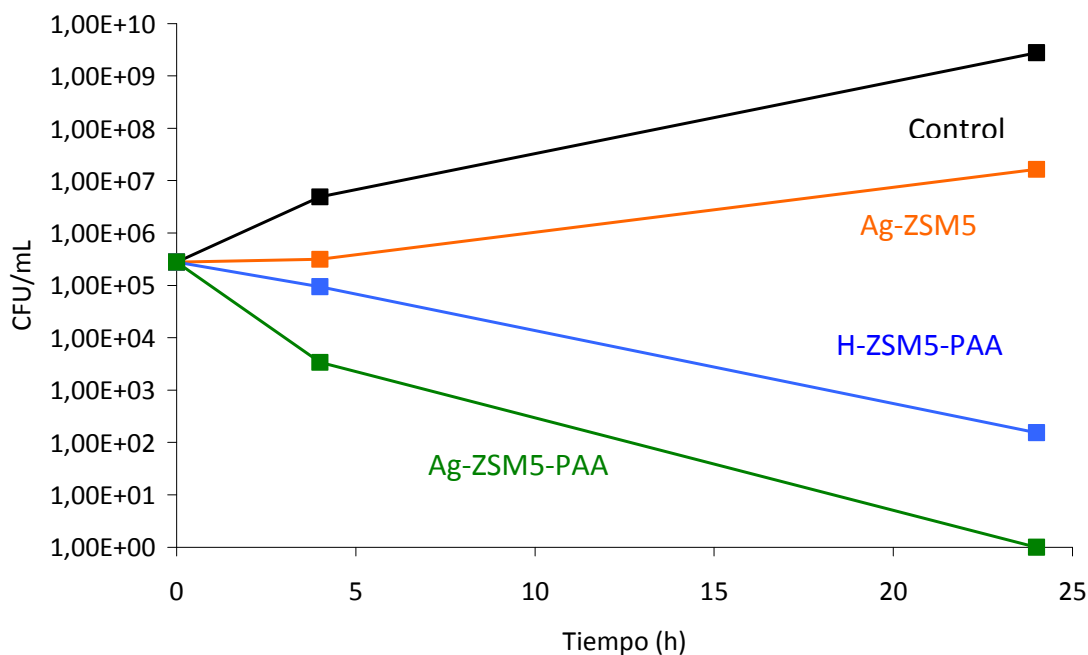
### 6.3.2. Zeolitas

#### ▪ PODER BACTERICIDA DE Ag-ZSM5, H-ZSM5, Ag-ZSM5-PAA EN CULTIVO EN FASE EXPONENCIAL Y FASE ESTACIONARIA

Mediante este experimento se quería comprobar si había alguna diferencia de comportamiento en cuanto al poder bactericida relativo de los diferentes materiales, estando las bacterias en dos fases diferentes de crecimiento. Los resultados se pueden observar en la Figura 6.10.A y 6.10.B.



**Figura 6.10.A.** Ensayos bactericidas con cultivo en fase estacionaria del Ag-ZSM5-PAA (verde), H-ZSM5-PAA (azul) y Ag-ZSM5 (naranja). Control (negro)



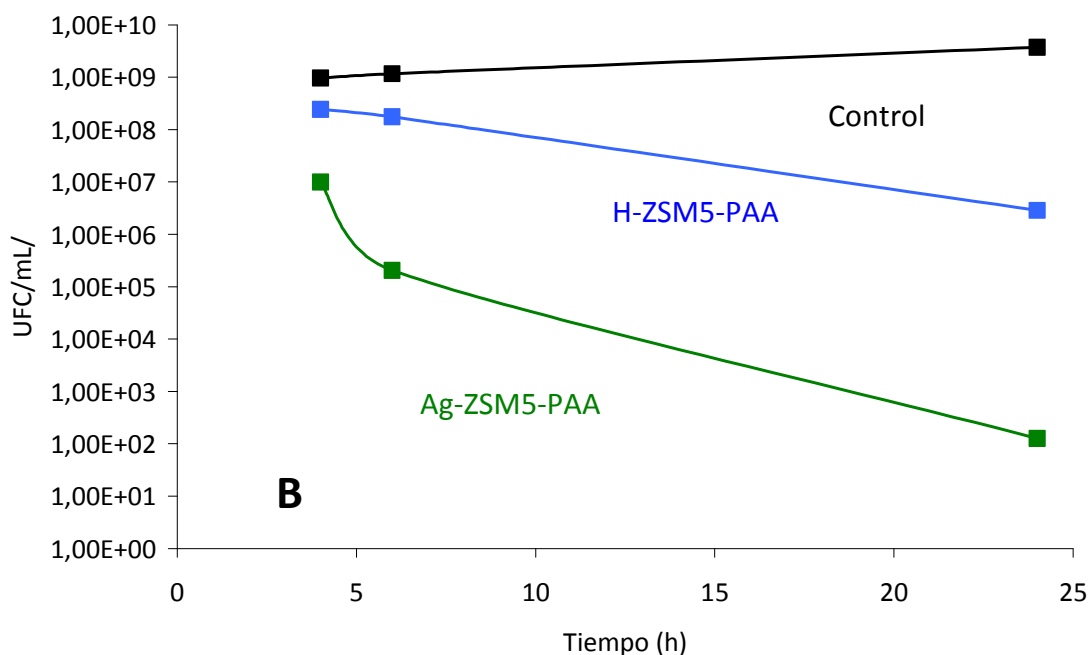
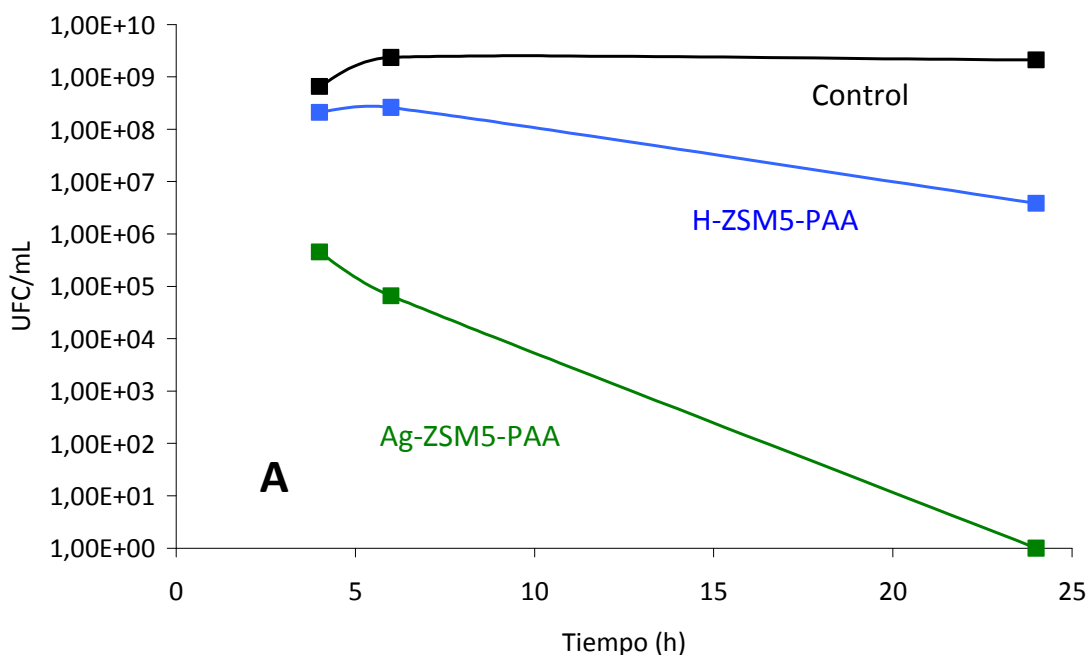
**Figura 6.10.B.** Ensayos bactericidas con cultivo en fase exponencial del Ag-ZSM5-PAA (verde), H-ZSM5-PAA (azul) y Ag-ZSM5 (naranja). Control (negro)

En ambas fases de crecimiento se observó el mayor poder bactericida con la Ag-ZSM5-PAA, obteniéndose la eliminación total de las bacterias en la fase exponencial a las 24 horas. Con la H-ZSM5-PAA se consiguió una disminución de la carga bacteriana en ambas fases. Con la Ag-ZSM5 se consigue una disminución en la fase estacionaria de 6 unidades logarítmica. Sin embargo, con este material en la fase exponencial la concentración bacteriana aumenta, pero sin llegar a la concentración máxima de  $10^9$  UFC/mL. Por lo tanto, estos resultados muestran que en ambos casos la combinación del PAA y la plata es efectiva para la eliminación o la disminución significativa de la población bacteriana. Sin embargo, aunque la acción de la plata en Ag-ZSM5 por sí sola es capaz de producir una disminución bacteriana en fase estacionaria, no produce el mismo efecto en la fase exponencial. Esto puede ser debido a que el efecto de la plata no llega a todas las bacterias de esta población, y aquellas que permanecen vivas, en esta fase, tienen suficientes nutrientes para seguir dividiéndose e ir formando el *biofilm* para evitar el efecto tóxico de la plata, y por tanto, aumentar la población bacteriana. Por otro lado, con la H-ZSM5-PAA, en ambos casos se produce una disminución de la concentración de bacterias. El PAA, como se mostrará en el apartado 6.4, tiene un papel crucial en la eliminación y el impedimento en la formación de *biofilm*. En la fase estacionaria el *biofilm* está ya bien sintetizado, mientras que en la exponencial se está formando, por lo que, al desaparecer éste, las bacterias estarían más expuestas a la propia toxicidad del PAA.

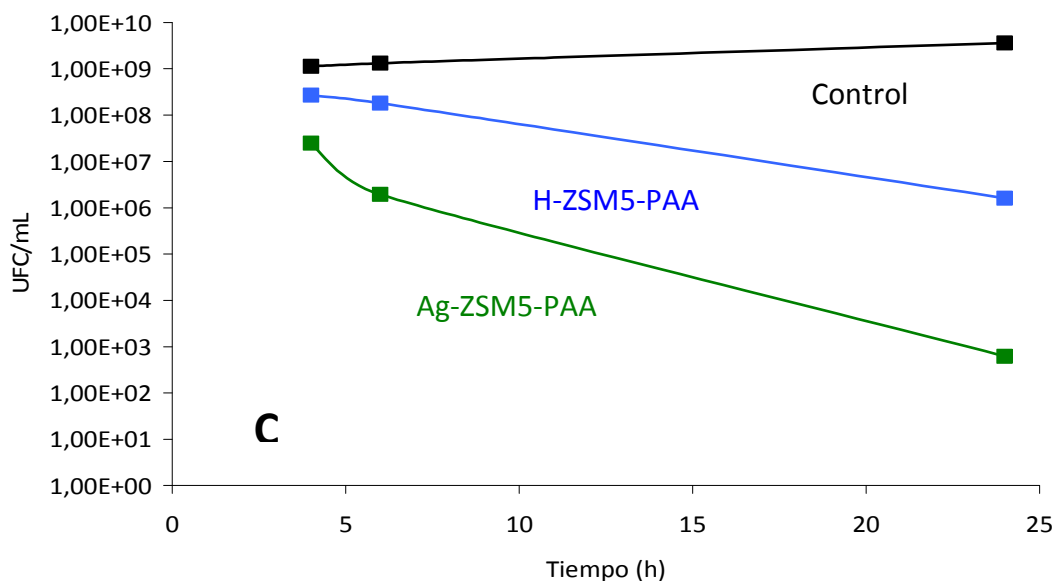
▪ EVOLUCIÓN EN EL TIEMPO DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DE H-ZSM5-PAA, Ag-ZSM5-PAA EN CULTIVO DE FASE ESTACIONARIA

Con este experimento se pretendía demostrar que los materiales con PAA, mantiene su poder bactericida a lo largo del tiempo, estando los materiales almacenados adecuadamente de forma hermética y en ausencia de luz. Los tiempos fueron:

- Tiempo 0: Materiales recién sintetizados.
- Tiempo 1: Materiales con 20 días.
- Tiempo 2: Materiales con 1 mes y medio.



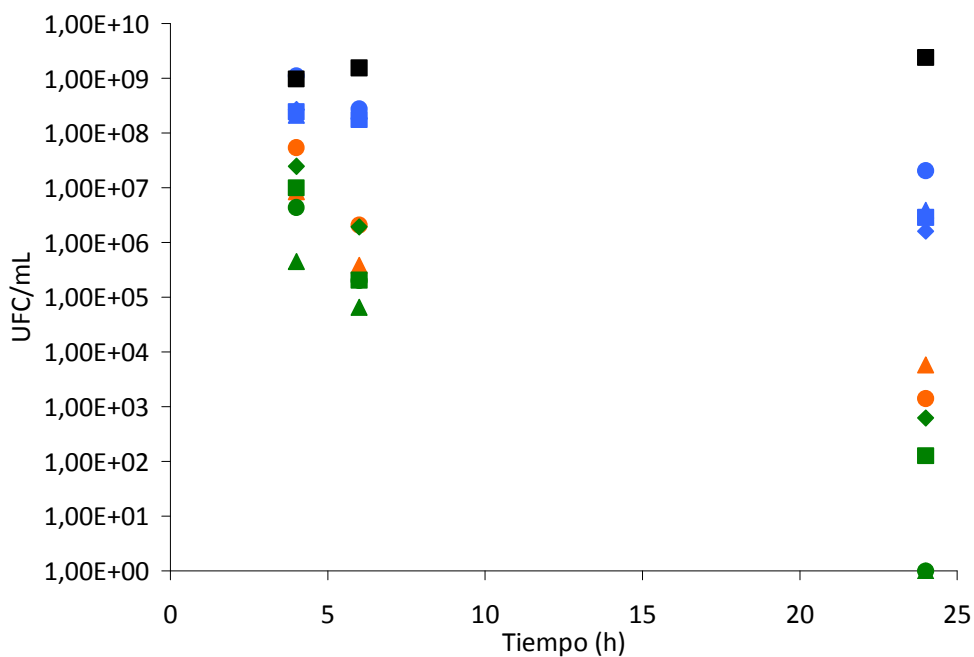
Continuación siguiente página



**Figura 6.11.** Evolución en el tiempo en fase estacionaria de la Ag-ZSM5-PAA (verde), H-ZSM5-PAA (azul). Control (negro). **A)** Tiempo 0. **B)** Tiempo 1. **C)** Tiempo 2

Por medio de este experimento cuyos resultados se representan en la Figura 6.11, se pudo observar que la H-ZSM5-PAA mantiene su poder bactericida a lo largo del tiempo, con una disminución en todos los tiempos de tres unidades logarítmicas en todos los casos.

En cuanto a la Ag-ZSM-5-PAA, se observó que hubo una ligera disminución del poder bactericida en 20 días (pasando de una eliminación total a  $3,27 \times 10^2$  UFC/mL a tiempo de 24 horas). Pero esta disminución no aumentó, ya que al mes y medio obtuvimos valores muy similares al tiempo de 24 horas ( $6,2 \times 10^2$  UFC/mL).



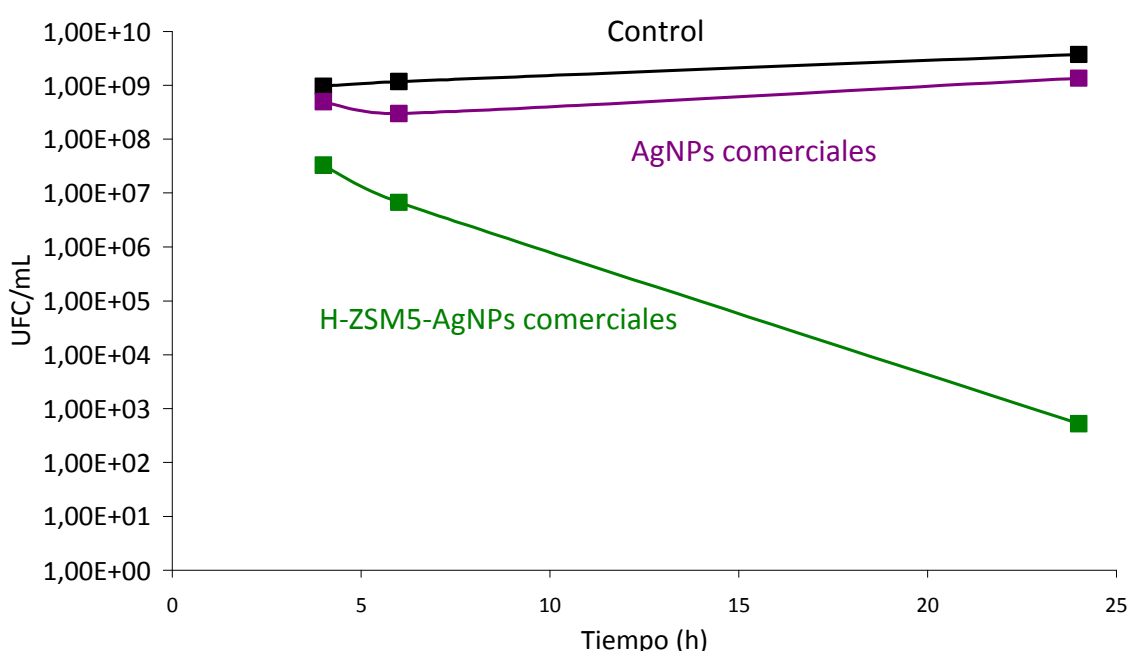
**Figura 6.12.** Ensayos bactericidas en fase estacionaria de la Ag-ZSM5-PAA (verde), H<sup>+</sup>-ZSM5-PAA (azul) y Ag-ZSM5 (naranja). Control (negro)

En la Figura 6.12, se resume el comportamiento de los distintos materiales y de diferentes lotes de materiales realizados. Se observó como la combinación de los dos compuestos (plata y PAA) producía un aumento del poder bactericida.

▪ **COMBINACIÓN DE H-ZSM5-PAA CON AgNPs COMERCIALES**

Como se ha visto en el apartado anterior 6.2, una de las hipótesis de trabajo era que el PAA podría oxidar a las AgNPs comerciales y de este modo proporcionarles el poder bactericida que no tenían.

Para comprobarlo se optó por la misma concentración de material que se ponía normalmente (30 mg/mL de H-ZSM5-PAA). Por otro lado, se añadió una concentración muy baja de AgNPs comerciales (2mg/mL), una concentración que se podía pesar de forma reproducible y era suficientemente baja.



**Figura 6.13.** Ensayos bactericidas en fase estacionaria de la AgNPs comerciales (morado), H-ZSM5-PAA-AgNPs comerciales (verde). Control (negro)

En la Figura 6.13, vemos como aumenta en gran medida en poder bactericida, pasando de un inexistente efecto antimicrobiano de las AgNPs ( $1,35 \times 10^9$  UFC/mL) a una intensa eliminación de la carga bacteriana ( $5,23 \times 10^2$  UFC/mL). Claramente, el efecto es debido a la combinación de los dos compuestos: AgNPs y PAA, ya que con el H-ZSM5-PAA, como se mostró en apartados anteriores, la disminución alcanza tres unidades logarítmicas.

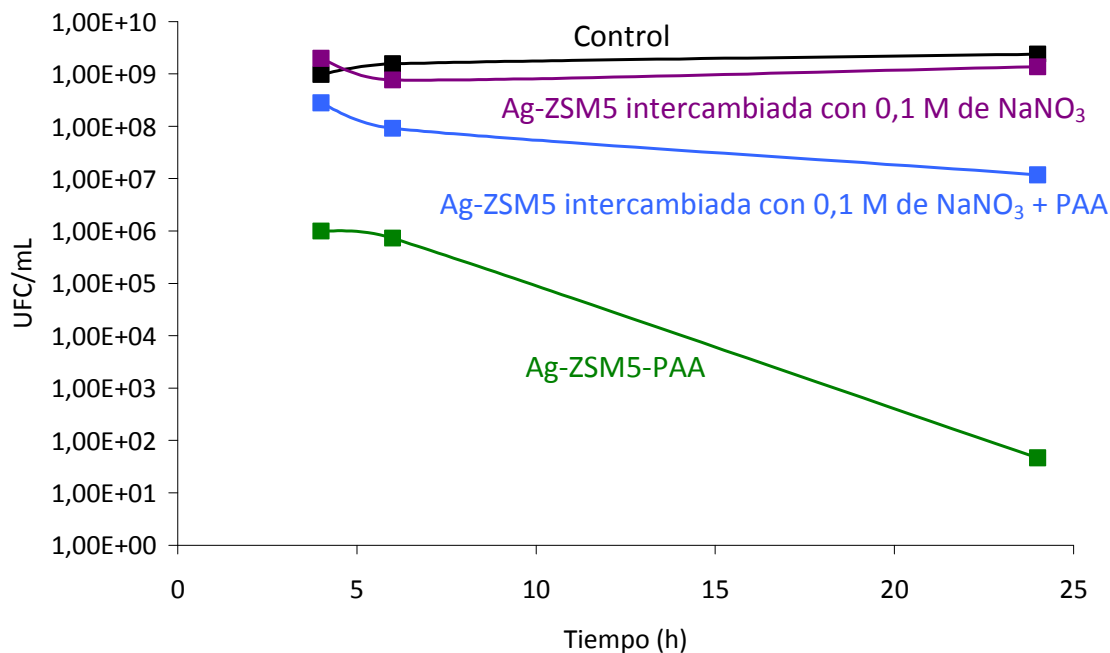
▪ **RE-INTERCAMBIO DE Ag-ZSM5 CON NaNO<sub>3</sub> Y POSTERIOR ADSORCIÓN CON PAA**

Para corroborar que el efecto microbiano era debido a la combinación de los dos compuestos (plata y PAA), se eliminó la plata de la Ag-ZSM5 mediante intercambio con 50 mL de 0,1 M de NaNO<sub>3</sub> para 1 g de material de Ag-ZSM5 renovando el medio a 8, 24, 32, 48, 56 y 72 horas.

Posteriormente, parte de este material se puso en contacto con PAA, y parte se guardó para realizar ensayos bactericidas comparados con Ag-ZSM5-PAA. Por lo tanto los materiales testados fueron:

- Ag-ZSM5-PAA
- Ag-ZSM5 intercambiada con 0,1 M de NaNO<sub>3</sub>
- Ag-ZSM5 intercambiada con 0,1 M de NaNO<sub>3</sub> seguido por adsorción de PAA

Los resultados se muestran en la Figura 6.14.



**Figura 6.14.** Ensayos bactericidas en fase estacionaria de la Ag-ZSM5 intercambiada con 0,1 M de NaNO<sub>3</sub> (morado), Ag-ZSM5-PAA (verde), Ag-ZSM5 intercambiada con 0,1 M de NaNO<sub>3</sub> y adsorbida con PAA (azul). Control (negro)

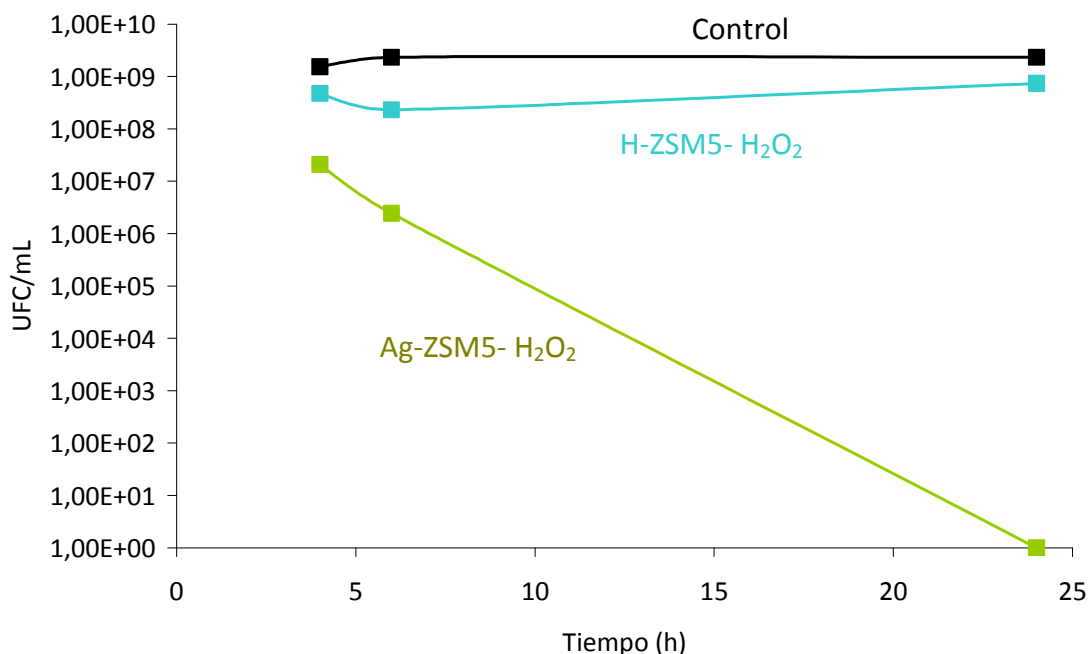
Como se puede observar, si a la Ag-ZSM5 se elimina la plata no se obtuvo ningún poder bactericida, seguidamente si se le añade PAA, se obtienen valores similares a H-ZSM5-PAA. Por tanto, una vez más se concluye que es la combinación de ambos compuestos en la Ag-ZSM5-PAA, responsable del mayor poder bactericida obteniendo 46 UFC/mL.

#### ▪ OXIDACIÓN DE LOS PEQUEÑOS AGRUPAMIENTOS DE PLATA DE Ag-ZSM5

A las cargas de plata utilizadas (inferiores al 0,2% en peso de plata) la mayor parte de la plata en la Ag-ZSM5 se encuentra como plata iónica en la estructura zeolítica y, como ya se ha señalado, la observación mediante TEM revela la existencia, tan solo, de muy escasos agrupamientos de plata metálica en las muestras de Ag-ZSM5. Sin embargo, a la vista de los resultados ya expuestos sobre el efecto del PAA en las AgNPs comerciales, cabría esperar que en las zeolitas Ag-ZSM5 con PAA adsorbido se produjese un efecto semejante. Sin embargo, dado que el PAA tiene un efecto

bactericida significativo por si mismo resulta difícil separar en experimentos bactericidas, la posible contribución debido al aumento en la concentración de iones plata para comprobar que el PAA producía una oxidación de los pocos agrupamientos de plata que había en la Ag-ZSM5 para proporcionar plata iónica y por tanto contribuiría a aumentar el poder bactericida, se decidió adsorber otro peróxido, el peróxido de hidrógeno, cuyo bajo efecto antimicrobiano se había comprobado anteriormente.

La adsorción se hizo por humedad incipiente teniendo en cuenta que el volumen de poro de esta zeolita es aproximadamente de  $1 \text{ cm}^3/\text{g}$ .



**Figura 6.15.** Ensayos bactericidas en fase estacionaria de la H-ZSM5- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (azul), Ag-ZSM5-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (verde). Control (negro)

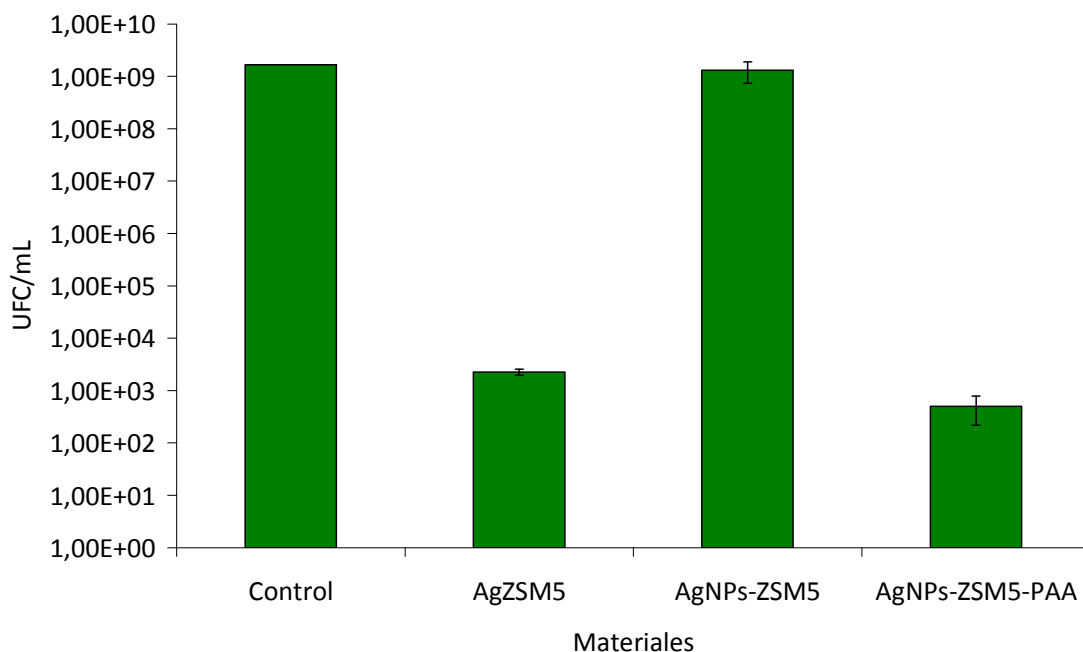
Como se observa en la Figura 6.15, la H-ZSM5-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apenas tiene poder bactericida ( $7,38 \times 10^8$  UFC/mL a tiempo de 24 horas), en cambio la combinación de la plata y el peróxido de hidrógeno produce una eliminación total de las bacterias a las 24 horas, mientras que la muestra de Ag-ZSM5 sin adición de peróxido de hidrógeno hubiese producido una disminución de entre 4 y 9 unidades logarítmicas en 24 horas (según el lote ensayado apartado 3.1.5) en las condiciones ensayadas. Por lo tanto, se comprueba la sinergia existente entre la plata y el peróxido, en cuanto al aumento del poder bactericida producido por la oxidación de los agrupamientos de plata metálica. En el apartado 6.2.1 de la Ag-ZSM5 y de la Ag-ZSM5-PAA (sección 1), se podía observar la disminución de tamaño de los agrupamientos de plata metálica asociado a la oxidación de los peróxidos como es el PAA.



▪ **OXIDACIÓN DE LAS AgNPs DE AgNPs-ZSM5 POR EL PAA ADSORBIDO**

En la misma línea de los estudios que se acaban de comentar en este apartado, se muestran los resultados bactericidas obtenidos con las AgNPs sintetizadas *in situ* en la ZSM5, debido a la reducción de la plata iónica de la Ag-ZSM5 a AgNPs por el borohidruro de sodio, ya explicada en el apartado 4.3.2, y los resultados obtenidos cuando a este material AgNPs-ZSM5 se le adsorbió PAA.

Estos resultados se muestran en la Figura 6.16.



**Figura 6.16.** Ensayos bactericidas en fase estacionaria a tiempo de 24 horas de AgZSM5, AgNPs-ZSM5 y AgNPs-ZSM5-PAA

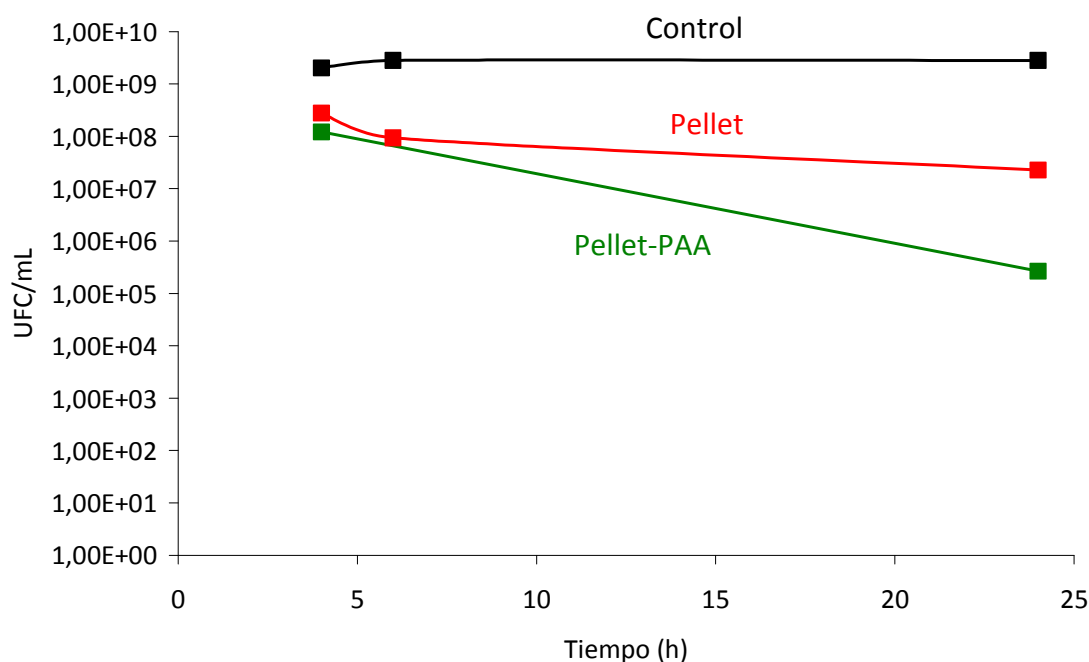
Como se esperaba, los resultados indican que el borohidruro sódico redujo la plata iónica intercambiada dentro de la red zeolítica a su forma metálica, formando las nanopartículas de plata y que no aportaron efecto bactericida apreciable ( $1,32 \times 10^9$  UFC / mL). Sin embargo, el PAA oxidó los grupos metálicos dando lugar a plata iónica y que, junto con el PAA, mostraron un gran poder bactericida sinérgico, con una disminución de siete unidades logarítmicas

Tal y como se muestra en el apartado 6.2.1 sobre la caracterización mediante TEM de la AgNPs-ZSM5 y de la AgNPs-ZSM5-PAA, se observa la presencia de agrupamientos de plata de 25-30 nm y de 1-3 nm en AgNPs-ZSM5, mientras que la acción del PAA para obtener AgNPs-ZSM5-PAA producía una disminución del número de agrupamientos, siendo los más grandes de 20 nm aproximadamente.

▪ **OXIDACIÓN DE LOS AGRUPAMIENTOS DE PLATA DE LA ZEOLITA COMERCIAL EN FORMA DE PELLET TRAS LA ADSORCIÓN CON PAA**

Al igual que en los experimentos anteriores, lo que se hizo fue adsorber PAA a esta zeolita comercial y evaluar su poder bactericida.

Tal y como cabía esperar por los resultados del apartado anterior, como se muestra en la Figura 6.17, se observó un aumento del poder bactericida, pasando de  $2,26 \times 10^7$  UFC/mL con la zeolita pellet, a  $2,64 \times 10^5$  UFC/mL con la zeolita pellet con el PAA adsorbido, y por tanto atribuyendo, de nuevo, la oxidación de la plata al PAA. Esta oxidación y por tanto mayor liberación de plata quedó demostrada en el apartado 6.2.5 de caracterización por espectroscopía de absorción atómica.

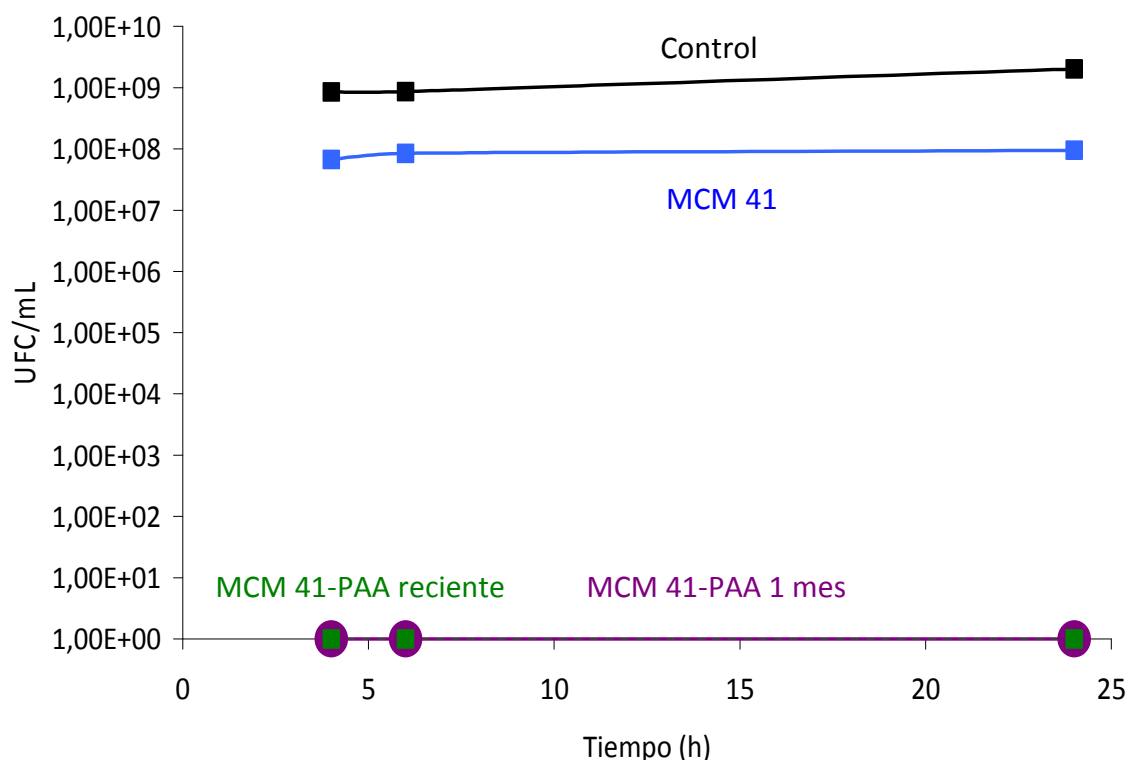


**Figura 6.17.** Ensayos bactericidas en fase estacionaria a tiempo de 4, 6 y 24 horas de zeolita comercial en forma de pellet (rojo), zeolita comercial en forma de pellet-PAA (verde). Control (negro)

**6.4 MCM41 SINTETIZADA EN EL LABORATORIO Y MCM41-MagNPs**

**6.4.1 MCM41 sintetizada en el laboratorio. Conservación en el tiempo del PAA**

Para confirmar, la buena conservación del PAA en los poros de la MCM41 se hicieron ensayos bactericidas, con el material recién adsorbido y después de un mes de almacenamiento. En ambos casos, como muestra la Figura 6.18, se observó una eliminación total de la carga bacteriana.



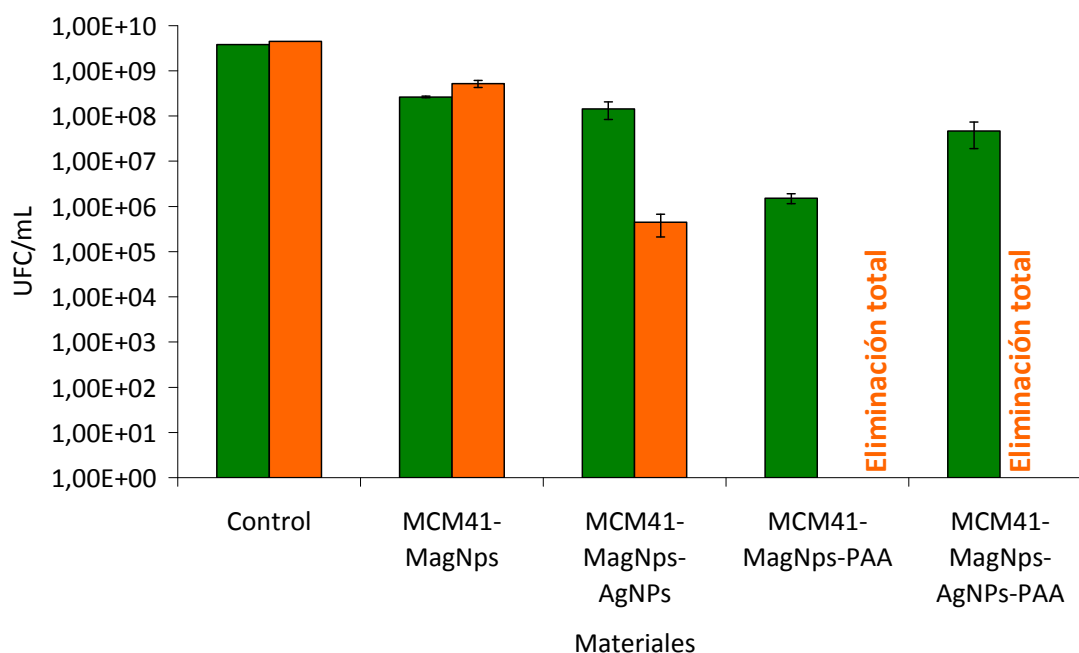
**Figura 6.18.** Ensayos bactericidas en fase estacionaria a tiempo de 4, 6 y 24 horas de MCM 41 (azul), MCM 41-PAA recién sintetizada (verde). MCM 41-PAA 1 mes almacenamiento (morada). Control (negro).

*NOTA: La gráfica morada y verde se encuentra superpuestas ya que en ambos ensayos se produce la eliminación total de las bacterias y, por tanto, los mismos valores*

En el apartado 6.2.2 de caracterización por análisis termogravimétrico (Figura 6.6.C), se demostró que el PAA se mantenía en los poros del material MCM 41 con el paso del tiempo. Por otro lado, su contenido en PAA era mayor (40%) que en otros materiales con mayor volumen de poro como es la SBA 15. Esto se explicaba por el hecho de que la MCM 41 no estaba funcionalizada mientras que las SBA 15, se encontraba en forma de SBA 15-APTES, SBA 15-APTES-Ag-A, y SBA 15-APTES-Ag-B, y por tanto, parte de sus poros ya estarían ocupados para estos compuestos (APTES y AgNPs) y podrían impedir la absorción de más cantidad de PAA. De esta manera, la cantidad de PAA que aportaba el cultivo bacteriano era mayor y por tanto producía un efecto bactericida mayor.

#### 6.4.2 Ensayos bactericidas de la MCM41-MagNPs con y sin AgNPs; con y sin PAA

En este experimento, se evaluó el poder bactericida de las diferentes variantes de la MCM41 con nanopartículas magnéticas, tal y como se muestra en la Figura 6.19.



**Figura 6.19.** Ensayos bactericidas en fase estacionaria a tiempo de 4 (verde) y 24 (naranja) horas de MCM 41-MagNPs, MCM 41-MagNPs-AgNPs, MCM 41-MagNPs-PAA, MCM 41-MagNPs-AgNPs-PAA.

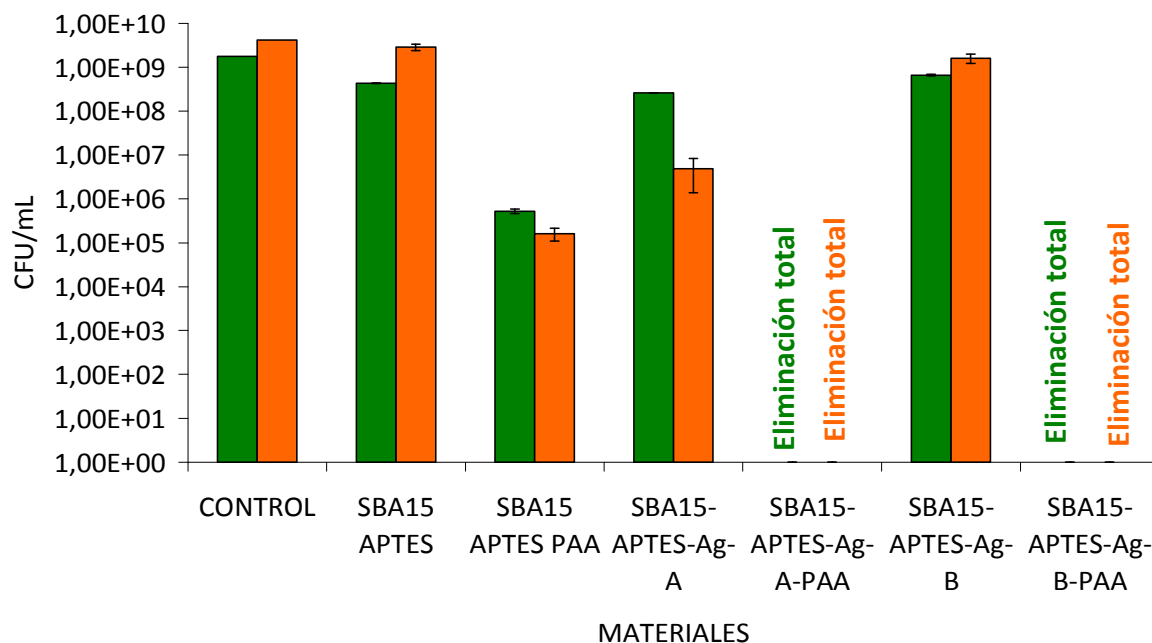
NOTA: En MCM 41-MagNPs-PAA, MCM 41-MagNPs-AgNPs-PAA los valores a 24 horas son 0. Eliminación total de las bacterias

Se puede observar como la combinación de los dos materiales produjo una eliminación total de las bacterias a las 24 horas, al igual que el PAA solo, como ocurría con el MCM 41-PAA sintetizada en el laboratorio. Si se comparan estos resultados con los obtenidos en el apartado anterior de la Figura 6.16 denominada ensayos bactericidas en fase estacionaria a tiempo de 24 horas de AgZSM5, AgNPs-ZSM5 y AgNPs-ZSM5-PAA, se puede observar como estos materiales logran una reducción bacteriana de siete unidades logarítmicas, es decir, sin eliminación total de la población bacteriana como si alcanzaban MCM 41-MagNPs-PAA y MCM 41-MagNPs-AgNPs-PAA. La explicación se basaría en el hecho de que, en la AgNPs-ZSM5-PAA, la presencia de AgNPs mostradas en las imágenes de TEM (apartado 6.2 TEM sección 2) era menor que en el resto de los materiales y, además, la carga de PAA según los análisis termogravimétricos (apartado 6.2 TGA), era del 8,5%. Por lo tanto, los materiales ensayados en este apartado, tienen un mayor número de AgNPs y de contenido en PAA, lo que produce una eliminación total de las bacterias.

Además, la MCM 41-MagNPs-AgNPs produjo una disminución bacteriana elevada (4 unidades logarítmicas) comparada con otros materiales con AgNPs que no tenían tanto efecto bactericidas (AgNPs-ZSM5, AgNPs-SBA15). Ya en la bibliografía se han reportado efectos combinatorios y sinérgicos entre diferentes metales como el cobre [256] y el zinc [257], que explicaría el efecto bactericida de la MCM 41-MagNPs-AgNPs.

### 6.5 SBA 15-APTES CON AgNPs A ELEVADA Y BAJA CONCENTRACIÓN CON PAA

Análogamente que en el apartado anterior, a continuación, en la Figura 6.20 se muestran los resultados de las diferentes variantes de la SBA 15 APTES.



**Figura 6.20.** Ensayos bactericidas en fase estacionaria a tiempo de 4 horas (verde) y 24 horas (naranja)

En ambos casos, con la SBA15-APTES con elevada y baja concentración de AgNPs, la adsorción del PAA produjo una eliminación bacteriana total tanto a tiempos cortos como a tiempos largos, por lo que se vuelve a demostrar el efecto sinérgico de la plata y el PAA.

Por otro lado, la SBA15-APTES-PAA produjo una disminución de 4 unidades logarítmicas debido a una carga significativa del 14% mostrado en los análisis termogravimétricos mostrados en las Figuras 6.6.D y 6.6.E del apartado 6.2. Como se ha comentado anteriormente, la MCM41-PAA no estaba funcionalizada, contenía más PAA (30%) y producía la eliminación total de las bacterias. Este mayor contenido en PAA, explicaría la diferencia de poder bactericida entre los dos materiales mesoporosos. Además, mientras que la SBA15-APTES-Ag-A disminuye la carga bacteriana hasta  $4,87 \times 10^6$  UFC/mL, la SBA15-APTES-Ag-B no produce ningún efecto antimicrobiano. Esto demuestra de nuevo que el efecto bactericida aparece en los materiales donde la plata se encuentra en forma iónica tal y como se mostraba en los ensayos bactericidas con Ag-ZSM5 del apartado 3.1.5. Sin embargo, se comprueba que una elevada concentración de plata metálica nanoparticulada de tamaño reducido (7,5 nm), como en el caso de SBA 15-APTES-Ag-A produce un moderado efecto bactericida.

## 6.6 EFECTO DEL ÁCIDO PEROXIACÉTICO

Observando los experimentos del apartado anterior, se observó que había un efecto bactericida sinérgico claro entre el PAA y la plata. Para explicar este efecto se plantearon tres hipótesis:

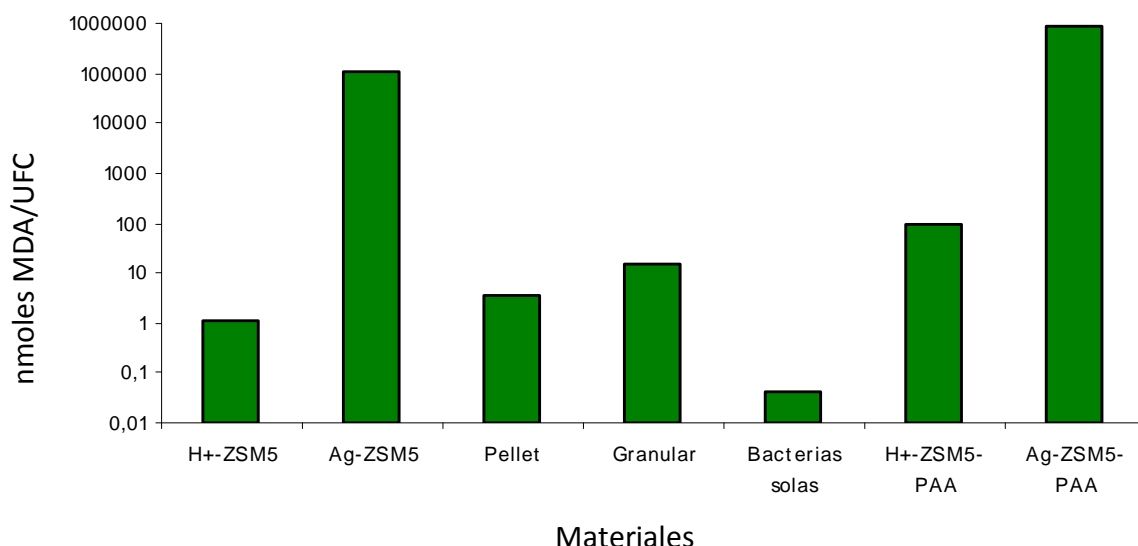
- Un efecto independiente del PAA, que debilitase las bacterias, haciéndolas más susceptibles a la acción de los iones plata.
- Un efecto secundario del PAA no tanto sobre las bacterias en si mismas sino sobre el *biofilm* bacteriano.
- Una combinación de los dos efectos explicados anteriormente.

Por ello, para el PAA se realizaron dos tipos de estudios para poder averiguar cómo afectaba a la bacteria:

- Medir las Especies Reactivas de Oxígenos (ROS) que el PAA pudiera hacer que las bacterias generaran.
- Observa como el PAA actuaba sobre el *biofilm* bacteriano

### 6.6.1 Medición de las especies reactivas de oxígeno

Como se ha indicado en el apartado 2.7 las especies reactivas de oxígeno se determinaron mediante peroxidación lipídica por la formación de malonil dialdehído (MDA). En la Figura 6.21, se pueden observar los valores que se obtuvieron en este experimento.



**Figura 6.21.** MDA detectado para *S.aureus* y normalizado por UFC/mL que se detectaron por cada material

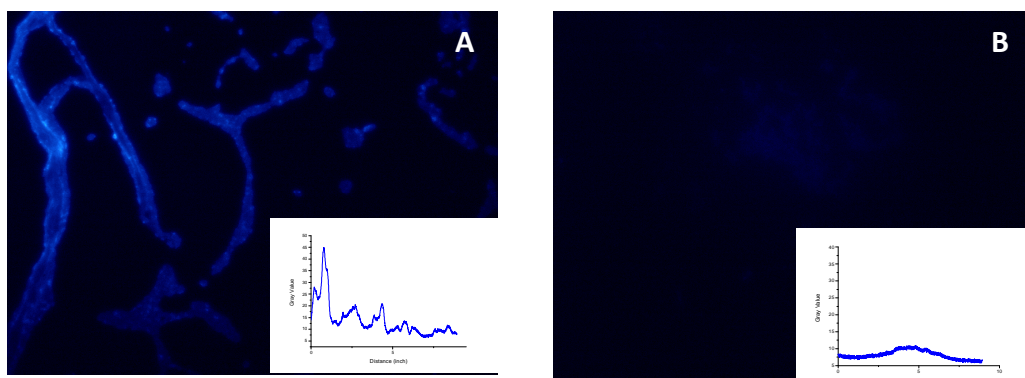
Los valores que se obtuvieron analíticamente se normalizaron respecto al valor de UFC/mL obtenido por cada material. De esta manera se observó que todos los materiales producían más ROS que el control, que eran las bacterias sin adición de materiales. También se mostró que la combinación de los materiales con el PAA (H-ZSM5-PAA y Ag-ZSM5-PAA), produjo más ROS que por ellos mismos solos, siendo el que más ROS produjo, la combinación de ambos materiales, Ag-ZSM5-PAA.

Además, la Ag-ZSM5, produjo más ROS que las zeolitas comerciales pellets y granular. Por lo tanto, se podría decir, que la plata y en especial, la combinación de la plata con el PAA indujeron la producción de especies reactivas de oxígeno.

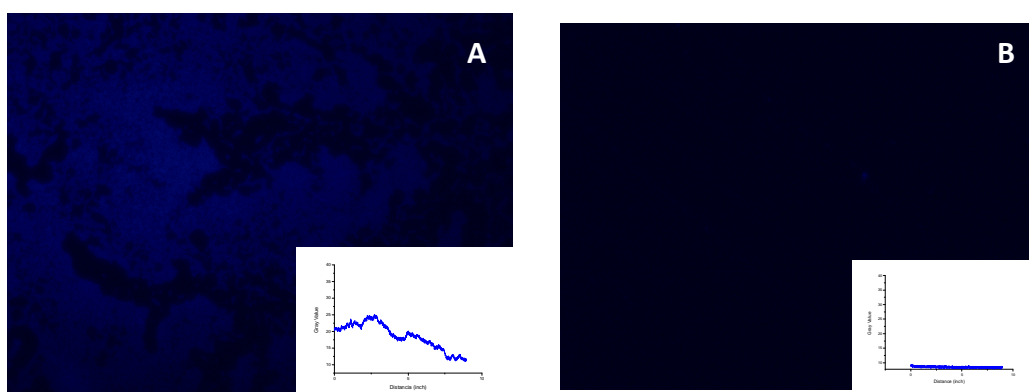
### 6.6.2 Observación del *biofilm* bacteriano

Se realizó esta técnica, en base a la hipótesis de que el PAA podría contribuir a inhibir la formación de *biofilm* o a eliminar el *biofilm* formado, es decir, que el PAA actuara sobre la matriz del exopolisacárido que forma la red del *biofilm*. Por lo tanto se hicieron dos tipos de pruebas cuyos resultados se muestran en la Figura 6.22 y Figura 6.23.

- Prueba 1: Como el PAA impide la formación de *biofilm* de un Cultivo Estacionario sobre un portaobjetos en un tiempo de 3 horas.
- Prueba 2: Como el PAA rompe un *biofilm* formado sobre un portaobjetos lavando éste con 10 mL de una concentración de 2,25  $\mu\text{L/mL}$  de PAA.



**Figura 6.22.** Prueba 1 impide formación de *biofilm*. **A)** Control con PBS. **B)** con PAA



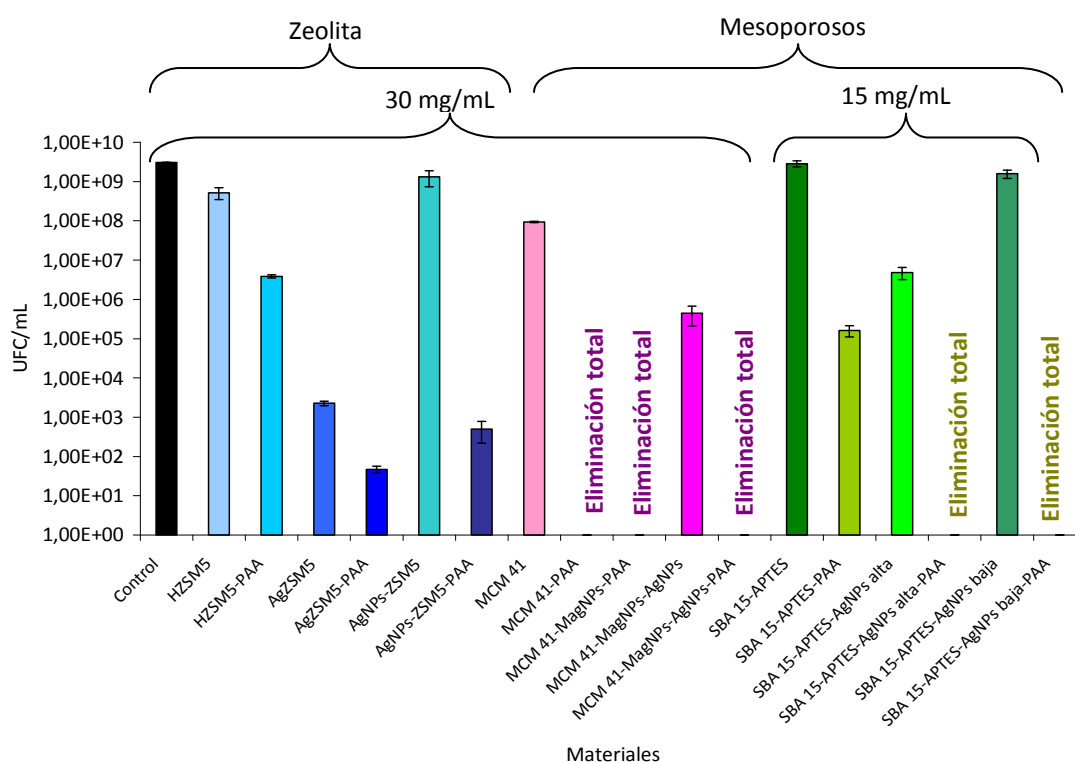
**Figura 6.23.** Prueba 2 destrucción del *biofilm*. **A)** Control con PBS. **B)** con PAA

En ambos casos se observó, que en la presencia de PAA no hay *biofilm* o está muy poco representado, en la prueba número uno porque el PAA impide que se forme y en la prueba número dos porque el PAA destruye el *biofilm* existente.

Como se explicó en el apartado 2.9 se ha usado el *Calcofluor White Stain* (Sigma-Aldrich®). Este fluorocromo interactúa con el exopolisacárido segregado por las bacterias para formar la matriz del exopolisacárido, y por tanto la visualización de este fluorocromo, demuestra la existencia de *biofilm* [31]. De esta manera, se visualiza la eliminación del *biofilm* ya formado, así como, el impedimento de su formación por parte del PAA.

### 6.7 COMPARACIÓN DE LOS MATERIALES

En la Figura 6.24, se muestran todos los ensayos bactericidas realizados a tiempo de 24 horas con todos los materiales en los que se ha adsorbido PAA en este trabajo.



**Figura 6.24.** Efecto bactericida de los materiales (zeolitas y mesoporosos) con PAA

Los materiales mesoporosos se observó que tenían mayor poder bactericida que las zeolitas.

Aunque ambos tipos de materiales mostraron un gran efecto sinérgico cuando se combinaba la plata y el PAA, en el caso de los mesoporosos, al tener un tamaño de poro mayor, siendo de 9-10 nm en la SBA 15 y de 3-5 nm MCM, tenían más capacidad de almacenar este compuesto, y por tanto por unidad de masa administrada, había más PAA que podía actuar inhibiendo y rompiendo el *biofilm*, y en los materiales con plata, más PAA que oxidaba las AgNPs, liberando iones plata, que podían actuar más



fácilmente sobre las bacterias, ya que ahora estaban más desprotegidas e individualizadas tras la rotura del *biofilm*.

Dentro de los materiales mesoporosos se observó que la MCM41 sintetizada en el laboratorio, era un buen material para almacenar PAA, ya que al mes de su síntesis, seguía manteniendo su poder bactericida eliminando totalmente la carga bacteriana. A diferencia de la zeolita Ag-ZSM5-PAA, para lo que se observó que hubo una ligera disminución del poder bactericida en 20 días (pasando de una eliminación total a  $3,27 \times 10^2$  UFC/mL a tiempo de 24 horas), pero manteniéndose al mes y 20 días.

Respecto a la SBA 15 APTES, sería más interesante aquel material con baja concentración de AgNPs, ya que aún con poca plata (0,34% y 0,21% en peso de plata, sin y con PAA respectivamente) cuando se combinó con el PAA se observó un enorme poder bactericida, produciendo la eliminación de toda la carga bacteriana.

Es muy importante también el efecto obtenido con la zeolita, por su baja cantidad de plata. Además, al tener una estructura cristalina podría actuar como buen abrasivo ayudando a desprender adherencias típicas de los *biofilms* bacterianos al aplicarse en flujo. Pero, sobre todo se consideró muy buen material, ya que con muy poca cantidad de plata (0,15% en peso con plata intercambiada) cuando se combinó con el PAA (0,08% en peso con plata intercambiada y PAA) tiene un gran poder bactericida con el compuesto recién adsorbido (eliminación total), el cual disminuye solo ligeramente más adelante.

## 7. CONCLUSIONES

A continuación, se exponen las conclusiones más importantes obtenidas en este trabajo.

Sobre la plata iónica:

- La zeolita ZSM5 intercambiada con plata (Ag-ZSM5), incluso con muy bajo porcentaje en peso de plata (entorno al 0,2 % en peso de plata) tienen un gran efecto antimicrobiano, superior al de otras zeolitas comerciales en forma de pellet y granular, que poseían un porcentaje en peso de plata muy superior debido a que la forma en que la plata está disponible en las distintas estructuras es diferente (bien iónica o bien como plata metálica).
- Este efecto antimicrobiano se debe principalmente a la plata iónica presente en la red zeolítica como catión de intercambio. En las otras zeolitas comerciales la plata está presente principalmente como agrupaciones de nanopartículas de plata metálica de elevado tamaño que contribuyen muy poco al poder biocida. Por lo tanto el poder biocida se atribuye principalmente a la plata iónica intercambiada en la red y la presencia de grandes aglomerados de plata metálica no tiene por qué ser sinónimo de elevado poder bactericida.
- A tiempos cortos de contacto Ag-ZSM5 bacterias se observó una gran correlación entre plata iónica liberada al medio y la actividad bactericida. Sin embargo, a tiempos largos, aunque se comprobó un gran efecto antimicrobiano, se observó una mayor dispersión en cuanto a la correlación plata liberada-poder bactericida, lo cual se atribuyó a al metabolismo bacteriano y a la formación de *biofilm*. Por lo tanto la presencia de *biofilm* bacteriano hace que la difusión y liberación del ión plata desde la zeolita dificulta el acceso de los iones plata a las bacterias y reduce la reproducibilidad de los datos debido a la inherente estructura de dicho *biofilm*.

Sobre la plata metálica:

- Es posible llevar a cabo la síntesis *in situ* de nanopartículas de plata en zeolitas y en materiales mesoporosos, principalmente efectiva en estos últimos, ya que además de que estas nanopartículas pueden introducirse en los poros del material aumentando su contenido en plata total y actuando como reservorio de plata para una acción prolongada. Alguno de estos materiales se han funcionalizado para favorecer la fijación de estas nanopartículas de plata a la estructura silíceas utilizando el enlace nitrógeno-plata. Dicho enlace hace que los materiales sean muy estables y de elevado poder biocida. Por otro lado, aquellas nanopartículas de plata comerciales de alrededor de 100 nm no mostraron ningún efecto biocida indicativo de la necesidad de un tamaño crítico por encima del cual la disolución y liberación de plata iónica a partir de nanopartículas de plata metálica transcurre demasiado lentamente como para poder tener un efecto bactericida significativo.
- Es posible realizar una síntesis reproducible de nanohilos de plata modificando las condiciones de síntesis y utilizando un polímero que dirige el crecimiento anisotrópico de dicho materiales. Dichos hilos muestran un poder biocida reducido

debido a que su relación superficie/volumen es baja (menor que la de las nanopartículas esféricas) por lo que su capacidad de disolverse y liberar iones plata es reducida.

- Hay que tener en cuenta diferentes parámetros para dilucidar el efecto bactericida de la plata durante el contacto con las bacterias, como el estado de la plata (iónica, metálica, la combinación de ambos, los complejos, sales parcialmente solubles o insolubles, etc.), los medios de cultivo, la presencia o ausencia de bacterias, tamaño de partícula, cristalinidad, geometría, etc. Todas estas variables afectan al poder bactericida observado y, probablemente, contribuyen de manera importante a la dispersión observada en la bibliografía en cuanto a resultados antimicrobianos de la plata.
- Se observó que era necesaria una concentración de nanopartículas de plata elevada para los tamaños de partícula analizados, y un tiempo de contacto bacterias-nanohilos de plata largo, para que se produjera un ligero efecto bactericida debido al efecto anteriormente citado de una baja relación superficie volumen susceptible de oxidación. Favorecer la oxidación de la plata metálica para favorecer la generación de iones plata produce un mayor efecto bactericida: en los nanohilos se puede favorecer dicha oxidación combinándolos con campo eléctrico, y con las nanopartículas de plata creando un efecto sinérgico con el ácido peroxiacético contenido dentro de una misma estructura. Es decir, aquellas técnicas que favorecen la oxidación de la plata metálica y la consecuente liberación de plata iónica favorecen el poder biocida.

Sobre la combinación de los nanohilos de plata con campo eléctrico:

- Se determinó un voltaje a corriente eléctrica continua, con la que poder realizar ensayos bactericidas sin dañar las bacterias y por tanto, sin disminuir su concentración. Voltajes superiores a 9V producen efectos bactericidas cuando se usa corriente continua sobre cultivos estacionarios de *S. aureus*.
- Se concluyó que el ligero poder bactericida de los nanohilos de plata puede atribuirse a su limitada oxidación en el medio con el paso del tiempo debido a su baja relación superficie expuesta/volumen. La corriente eléctrica continua durante un breve periodo de tiempo de exposición acelera la oxidación, favoreciendo la liberación de los iones plata e incrementado en gran medida el efecto antimicrobiano.
- Es posible embeber nanohilos de plata en espumas de carbón vítreo conductoras, manipularlas y aplicarles campo eléctrico de una manera sencilla y de este modo obtener una disminución de la carga bacteriana. Sin embargo, la mayor disminución se obtuvo con los nanohilos dispersos en el cultivo estacionario donde la oxidación por el paso de corriente está favorecida ya que hay una mayor superficie expuesta al paso de corriente y la consecuente oxidación.

Sobre la combinación de las nanopartículas de plata con ácido peroxiacético:

- Los materiales mesoporosos al tener los poros más grandes que las zeolitas son capaces de almacenar mayor cantidad de ácido peroxiacético y conservarlo con el paso del tiempo en mayor medida que las zeolitas analizadas.

- La combinación de nanopartículas de plata y del ácido peroxiacético en los materiales mesoporosos y zeolitas aumenta en gran medida el efecto antimicrobiano, con respecto al caso de estos materiales por separado. Se observó un efecto sinérgico ya que el efecto obtenido no responde la mera suma de ambos efectos por separado.
- Este efecto sinérgico se debe, principalmente, a la disgregación de la matriz del *biofilm* y al impedimento de su consolidación cuando todavía no se ha formado por parte del ácido peroxiacético, facilitando la llegada y acción de los iones plata (procedentes de la oxidación de las nanopartículas de plata que resulta acelerada por parte del ácido peroxiacético) directamente sobre la bacteria. Este hecho no había sido descrito anteriormente en la bibliografía.
- La combinación de plata y un biocida como el ácido peroxiacético en materiales mesoporosos y principalmente, en materiales cristalinos porosos como la ZSM5, permitiría una aplicación potencial en aquellos sistemas en los que se necesitan una liberación controlada y una abrasión mecánica para evitar la formación de *biofilms*.

## Capítulo 8

### Anexo

#### **8.1 EQUIPOS UTILIZADOS PARA EL TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS**

8.1.1 Campana de Flujo Laminar

8.1.2 Esterilización

#### **8.2 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LOS MATERIALES LIBERADORES DE PLATA**

8.2.1 Difracción de rayos X y de dispersión de Rayos X de ángulo bajo

8.2.2 Espectrofotometría ultravioleta-visible-infrarrojo cercano

8.2.3 Microscopio electrónico de barrido

8.2.4 Microscopio electrónico de transmisión

8.2.5 Análisis termogravimétrico

8.2.6 Espectroscopía de absorción atómica

8.2.7 Espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X

8.2.8 Adsorción de nitrógeno

8.2.9 Espectrofotometría de infrarrojo con transformada de Fourier

#### **8.3 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS CEFUROXIMA, CEFAZOLINA Y LINEZOLID**

## 8. ANEXO

### 8.1 EQUIPOS UTILIZADOS PARA EL TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS

En este apéndice, se describen los diferentes equipos usados para el tratamiento de las muestras biológicas y de aquellos materiales que se tenían que preservar en condiciones de esterilidad.

#### 8.1.1 Campana de Flujo Laminar

Todos los cultivos bacterianos se han llevado a cabo en una campana de flujo laminar (Telstar AV 30-70) en condiciones de esterilidad. Esta campana de seguridad biológica contiene sistemas de filtración HEPA, y está de acuerdo con la normativa existente sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con los agentes biológicos.

La campana de flujo laminar es una cámara donde se establece un flujo de aire vertical, a modo de cortina, que evita que las micropartículas y aerosoles que se puedan crear salgan al exterior y no contaminen al manipulador y al ambiente, creando una barrera entre la zona donde se está trabajando y donde se sitúa el trabajador. Mediante un sistema de aspiración se recoge el aire contaminado y después de pasarlo por unos filtros, devuelve una parte al medio y otra la expulsa al exterior.



**Figura 8.1.** Campana de flujo laminar

Para una mayor seguridad de las muestras, y así evitar al máximo su contaminación con otros microorganismos, se trabajó en el interior de la campana de flujo laminar con un mechero *Bunsen* de butano. Además, se asegura la desinfección del instrumental introducido: micropipetas, puntas, asas de siembra etc., vaporizándolo con etanol 70% (v/v).

### 8.1.2 Esterilización

Para la realización de los experimentos, todo el material ha sido previamente esterilizado. Se esterilizan los tubos de ensayo, pinzas, medios de cultivo, y cualquier material a ensayar que no sea susceptible a la humedad y temperatura. La esterilización se lleva a cabo en un autoclave (Modelo STERICLAV-S AES-75. Raypa®) cuya capacidad es de 75 litros. Consiste en calentar agua con una resistencia y mantener el vapor de agua formado a 121°C durante 20 minutos.



**Figura 8.2.** Autoclave para esterilización

Aquellos materiales cuyas características pudieran ser afectadas por la humedad y la temperatura, como son aquellos que contienen plata, se esterilizan con vapores de etanol 96 % (v/v) durante una noche en una cámara cerrada.

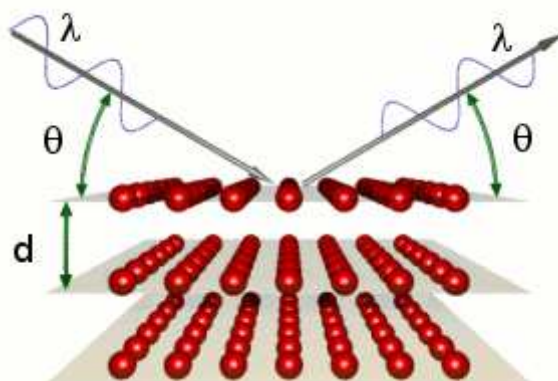
## 8.2 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LOS MATERIALES LIBERADORES DE PLATA

En este apéndice, se describen los diferentes equipos usados para la caracterización de los diversos materiales y se señala que equipo se ha usado para cada material.

### 8.2.1 Difracción de rayos X y de dispersión de Rayos X de ángulo bajo

Los Rayos X tienen longitudes de onda de Angstroms (5-100 Å), del mismo orden que las distancias interatómicas de los componentes de las redes cristalinas. Al ser irradiados sobre la muestra a analizar, los rayos X se difractan con ángulos que dependen de las distancias interatómicas. El método analítico del polvo depositado al azar, que es el que se ha utilizado con los materiales caracterizados, consiste en irradiar con rayos X sobre una muestra formada por multitud de cristales colocados al azar en todas las direcciones posibles. Para ello es aplicable la Ley de Bragg, que

predice la dirección en la que se produce una interferencia constructiva entre haces de rayos X dispersados coherentemente por un cristal:



**Figura 8.3.** Esquema descriptor de la Ley de Bragg [369]

$d$  = es la distancia entre los planos interatómicos que producen la difracción.

$\lambda$  = longitud de onda de los rayos X

$\theta$  = ángulo entre los rayos incidentes y los planos de dispersión.

Los rayos X proporcionan información sobre la estructura cristalina de un material, elementos que lo componen, posición y distancia entre los átomos. Las técnicas de rayos X son no destructivas, y permiten la caracterización de los materiales y su recuperación sin sufrir ningún deterioro.

Las medidas de difracción de rayos X se han realizado a temperatura ambiente usando un equipo D-Max Rigaku® provisto de un ánodo rotatorio. El difractómetro funciona a 40Kv y 80 mA con un ánodo de cobre y se utiliza un monocromador de grafito para seleccionar la radiación  $\text{CuK}\alpha_{1,2}$ . Las condiciones de medida fueron de  $2\theta$  con un rango de  $5^\circ$  a  $40^\circ$ , paso= $0.03^\circ$  y  $t=1\text{s/paso}$ . Este equipo se encuentra en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza, en el Servicio de Apoyo a la Investigación: Difracción de Rayos X y análisis por fluorescencia.

Este equipo se ha utilizado para caracterizar la zeolita ZSM5, la ZSM5 intercambiada con plata y/o la absorbida con ácido peroxiacético.

En el caso de difracción de rayos X para ángulos bajos (SAXRD, *Small Angle X Ray Difraccion*), se utiliza la radiación que se dispersa a ángulos entre  $0,1$  y  $10^\circ$ . Este rango de ángulos se usa para conocer las distancias características en materiales ordenados mesoporosos y tamaños de poro en estructuras de rango micrométrico y nanométrico.

El equipo utilizado para la caracterización de los materiales sintetizados mediante SAXRD es un difractómetro X'Pert PRO de PANalytical® (PANalytical B.V., Almelo, Holanda) que se localiza en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

Este equipo se ha utilizado para caracterizar las muestras del material MCM41 con y sin ácido peroxiacético absorbido. También se ha caracterizado el material mesoporoso SBA15, SBA15 funcionalizada con 3-Aminopropiltrióxido de silano (Sigma-

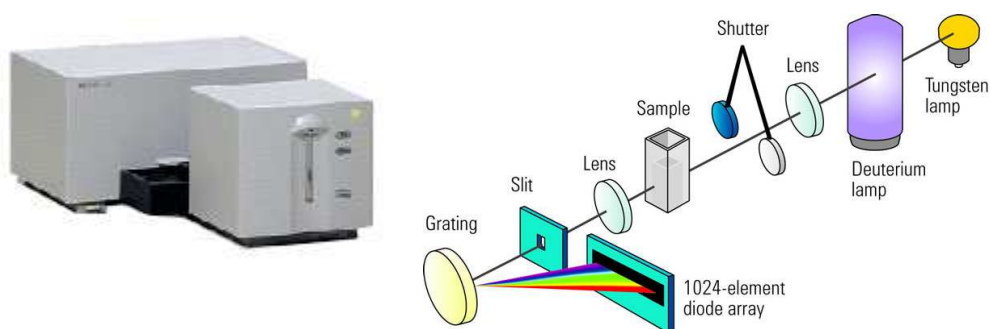


Aldrich®) conocido con las siglas APTES, la SBA15 funcionalizada con APTES y con nanopartículas de plata a alta y baja concentración, y/o ácido peroxiacético.

### 8.2.2 Espectrofotometría ultravioleta-visible-infrarrojo cercano

La espectrofotometría en la región ultravioleta-visible-infrarrojo cercano es una técnica que permite determinar la concentración de un compuesto en disolución si su espectro presenta repuesta adecuada en ese rango de longitudes de onda. Se basa en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración al menos en el rango de concentraciones analizado de acuerdo con la Ley de Beer Lambert.

Las moléculas pueden absorber energía luminosa y almacenarla en forma de energía interna. Cuando la luz (energía) es absorbida por una molécula se origina un salto desde un estado energético fundamental a uno de mayor energía. Cada molécula tiene una serie de estados excitados que la distingue del resto de moléculas. Como consecuencia, la absorción que a distintas longitudes de onda presenta una molécula (espectro de absorción), constituye una señal de identidad de la misma. Finalmente, la molécula en forma excitada libera la energía absorbida hasta el estado energético fundamental.



**Figura 8.4.** Esquema del espectrofotómetro y de su funcionamiento (Agilent Technologies®)

El equipo que se ha utilizado en este trabajo es el modelo 8453 de Agilent® (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA). Este espectrofotómetro cuenta con un detector multicanal (PDA, PhotoDiode Array), compuesto por un vector lineal de fotodiodos discretos integrados en un circuito. Permite detectar simultáneamente un rango de longitudes de onda desde 190 nm hasta 1100 nm, con una resolución de 1 nm.

Este equipo se ha utilizado, para detectar el Malonil Dialdehido (MDA) en el análisis de especies reactivas de oxígeno producidas por los materiales estudiados.

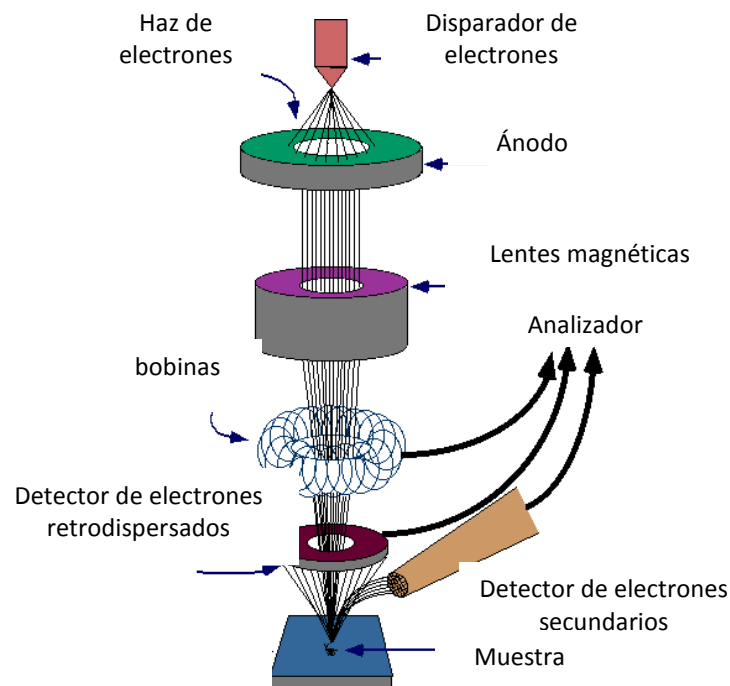
### 8.2.3 Microscopio electrónico de barrido

La microscopía electrónica de barrido (SEM, *Scanning Electron Microscopy*) se ha utilizado para la visualización del tamaño, morfología y estructura de los materiales usados. Se han visualizado materiales comerciales como el óxido de plata (I) (Sigma-Aldrich®), zeolitas comerciales intercambiadas con plata, en forma de pellets de 1,6

mm (Sigma-Aldrich®), y en forma granular +20 mesh (Sigma-Aldrich®), ZSM5 sin calcinar, calcinada e intercambiada con plata, MCM41 con y sin ácido peroxiacético absorbido, y nanohilos de plata. También se han podido visualizar bacterias en cultivo y junto a los materiales objeto de estudio como *biofilms* sobre dichos materiales. Las bacterias, al ser material biológico, antes de ser visualizadas en el SEM, han de ser fijadas y deshidratadas tal y como se ha explicado anteriormente.

Por otro lado, muchas de las muestras nombradas anteriormente no son conductoras, a excepción de los nanohilos de plata, por lo que es necesario que se recubran con un metal conductor mediante un metalizador de vacío. Este equipo funciona evaporando, de una manera controlada, un blanco metálico de oro-paladio (Au/Pd 80/20) gracias a la creación de un plasma de iones de argón. El equipo utilizado es el *Mini Sputter Coater* de Quórum Technologies® modelo SC7620 (Quórum Technologies Ltd, West Sussex, United Kingdom).

De una manera muy resumida, se puede decir que el funcionamiento del SEM se basa en recorrer la muestra con un haz colimado muy concentrado de electrones acelerados. De todas las formas de radiación resultantes de la interacción del haz incidente y la muestra hay dos realmente fundamentales en el microscopio de barrido: los electrones secundarios y los electrones retrodispersados. Los primeros son electrones de baja energía que resultan de la emisión por parte de los átomos constituyentes de la muestra (los más cercanos a la superficie) debido a la colisión con el haz incidente o con electrones retrodispersados. Los electrones retrodispersados sin embargo, son electrones del haz incidente que han interactuado (colisionado) con los átomos de la muestra y han sido reflejados. La intensidad de ambas emisiones varía en función del ángulo que forma el haz incidente con la superficie del material, es decir depende de la topografía de la muestra.



**Figura 8.5.** Esquema del funcionamiento del microscopio electrónico de barrido (Microtech Science)

La señal emitida por los electrones y radiación resultantes del impacto se recoge mediante un detector y se amplifica para cada posición de la sonda. Las variaciones en la intensidad de la señal que se producen conforme la sonda barre la superficie de la muestra, se utilizan para variar la intensidad de la señal en un tubo de rayos catódicos que se desplaza en sincronía con la sonda. De esta forma existe una relación directa entre la posición del haz de electrones y la fluorescencia producida en el tubo de rayos catódicos. El resultado es una imagen topográfica muy ampliada de la muestra.

Se han utilizado principalmente dos equipos durante el desarrollo de este trabajo. Uno es el modelo S-2300 de Hitachi®, y otro Inspect F50 FEI®, ambos situados en el Laboratorio de Microscopías Avanzadas del Instituto de Nanociencia de Aragón de la Universidad de Zaragoza.

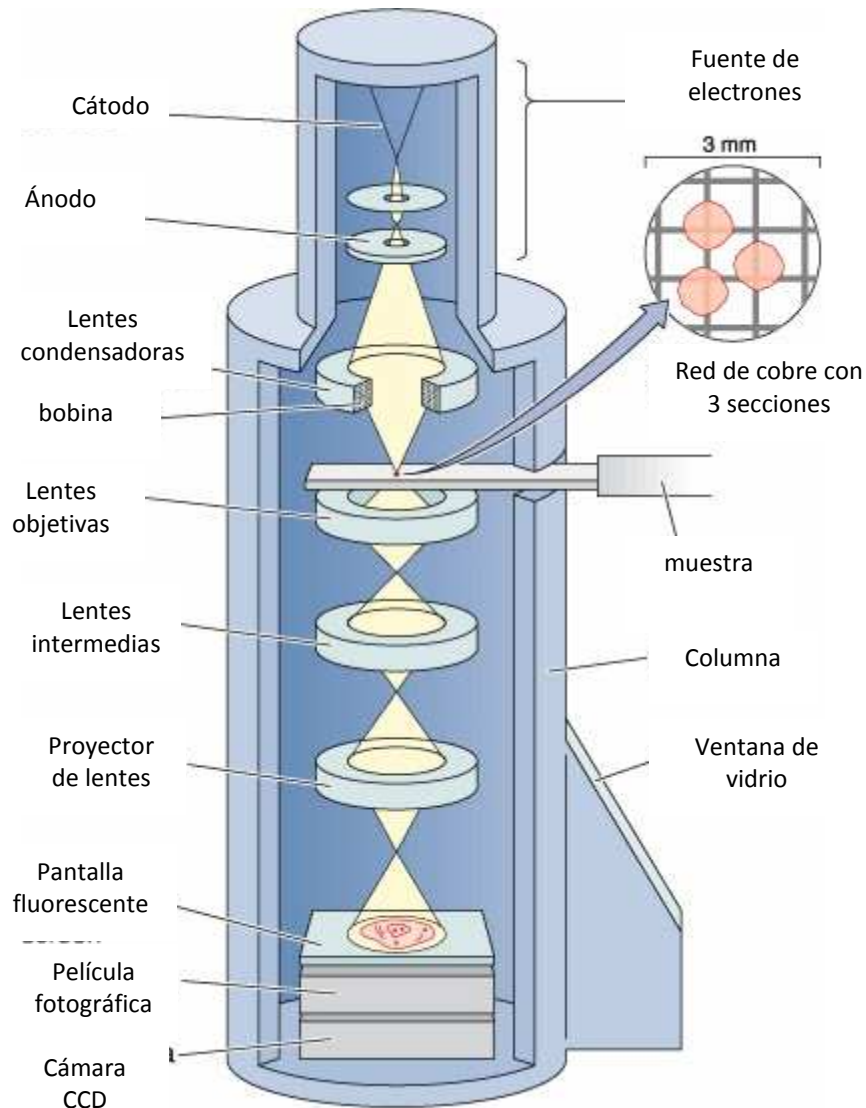
### 8.2.4 Microscopio electrónico de transmisión

La microscopía electrónica de transmisión (TEM, *Transmission Electron Microscopy*) se ha utilizado para visualizar la morfología y los poros de los materiales, así como, el tamaño y la morfología de las nanopartículas. Por esta técnica se han visualizado la zeolita ZSM5 sin calcinar, calcinada e intercambiada con plata y con nanopartículas de plata en su estructura. También se han visualizado diferentes materiales comerciales como son las zeolitas intercambiadas con plata, en forma de pellets de 1,6 mm (Sigma-Aldrich®), y en forma granular +20 mesh (Sigma-Aldrich®), también nanopartículas comerciales de 100 nm (Sigma-Aldrich®). Por otro lado se han caracterizado las SBA 15 funcionalizadas con APTES con y sin nanopartículas de plata a alta y baja concentración, y/o ácido peroxiacético absorbido.

Para utilizar esta técnica las muestras han de tener un espesor reducido e inferior a 200-300 nm, para que los electrones las puedan atravesar. De esta manera, para prepararlas se dispersa el material en etanol 96 % (v/v) (Panreac®) a una concentración muy baja del material (aproximadamente 100 µg/mL), evaporando una gota de esta dispersión sobre las rejillas de cobre recubiertas de carbono, que se utilizan para esta técnica como soporte.

En resumen, en el microscopio electrónico de transmisión, la muestra es irradiada con un haz de electrones que proviene de un filamento de Wolframio o LaB<sub>6</sub> aplicando un potencial negativo entre 100 kV y 1000 kV. Los electrones colisionan con la muestra, en función de su grosor y del tipo de átomos que la forman, parte de ellos son dispersados selectivamente, es decir, hay una gradación entre los electrones que la atraviesan directamente y los que son totalmente desviados. De esta manera, los electrones que se dispersan, tienen una energía característica de cada elemento.

Todos ellos son conducidos y modulados por unas lentes para formar una imagen final sobre un condensador. La información que se obtiene es una imagen con distintas intensidades de gris que se corresponden al grado de dispersión de los electrones incidentes.



**Figura 8.6.** Esquema del funcionamiento del microscopio electrónico de transmisión [370]

El equipo utilizado se encuentra en el Laboratorio de Microscopías Avanzadas del Instituto de Nanociencia de Aragón de la Universidad de Zaragoza. Es el modelo Tecnai® F30 de la compañía FEI® (Hillsboro, Oregon, USA).

### 8.2.5 Análisis termogravimétrico

El análisis termogravimétrico (TGA, *Thermal Gravimetric Analysis*) es una técnica que mide la variación de masa en un compuesto en función de la temperatura a lo largo del tiempo, gracias a una balanza de precisión y a un calentamiento y atmósfera controlados. Las variaciones de temperatura no siempre implican un cambio en la masa de la muestra; existen, sin embargo, procesos físicos y reacciones químicas conseguidos por cambios térmicos que sí se acompañan de un cambio de masa, como la descomposición, la sublimación, la combustión, la reducción, la desorción, la absorción y la vaporización. Estos cambios pueden ser medidos mediante TGA.

Esta técnica ha sido utilizada en este trabajo para las siguientes aplicaciones:

- Determinar la cantidad de ácido peroxiacético absorbido en las zeolitas con y sin plata intercambiada y con plata nanoparticulada.
- Determinar la cantidad de ácido peroxiacético absorbido en los diferentes materiales mesoporosos con y sin nanopartículas de plata a alta y baja concentración.
- Determinar la masa de los nanohilos de plata utilizados posteriormente en los análisis microbiológicos, y eliminación del solvente y de la Polivinilpirrolidona, (Sigma-Aldrich® Saint Louis, MO, USA) PVP.

Para los dos primeros puntos se hizo un calentamiento de 25°C a 500°C con una rampa de temperatura de 10°C/minuto, con un caudal de 30 mL/minuto de aire.

El método utilizado en el último punto, es un calentamiento de 25°C a 50°C con una rampa de temperatura de 0,1°C/minuto y una isoterma de 50°C durante 30 minutos con un caudal de 20 mL/minuto de aire para muestras dispersadas en etanol y un calentamiento de 30°C a 500°C con una rampa de temperatura de 30°C/minuto y una isoterma de 500°C durante 40 minutos con un caudal de 20 mL/minuto de aire para dispersiones de nanohilos de plata en agua. Se utilizaron dos protocolos diferentes porque en el primer caso se necesitaba conocer la evaporación de PAA que se producía, y por lo tanto, solamente fue necesario calentar la muestra sin necesidad de que este aumento fuera lento. En el segundo caso, fue necesario determinar la masa de los nanohilos de plata, y de esta manera, se consideró más importante controlar la temperatura para evaluar qué agentes utilizados en la síntesis de nanohilos y a qué temperatura eran eliminados.



**Figura 8.7.** Esquema de los dos equipos usados (TA Instruments®, USA y Mettler Toledo AG, Barcelona, España)

Se usaron dos equipos, ambos formados por una termobalanza que incluye una balanza analítica, un horno, un mecanismo de control y programación de la temperatura del horno, un registrador y un equipo opcional para el trabajo en vacío o en una atmósfera a presión controlada. El primer equipo usado es el modelo TGAQ500 (TA Instruments®, USA). El segundo equipo es el modelo TGA/SDTA 851 (Mettler Toledo® AG, Barcelona, España).

### 8.2.6 Espectroscopía de absorción atómica

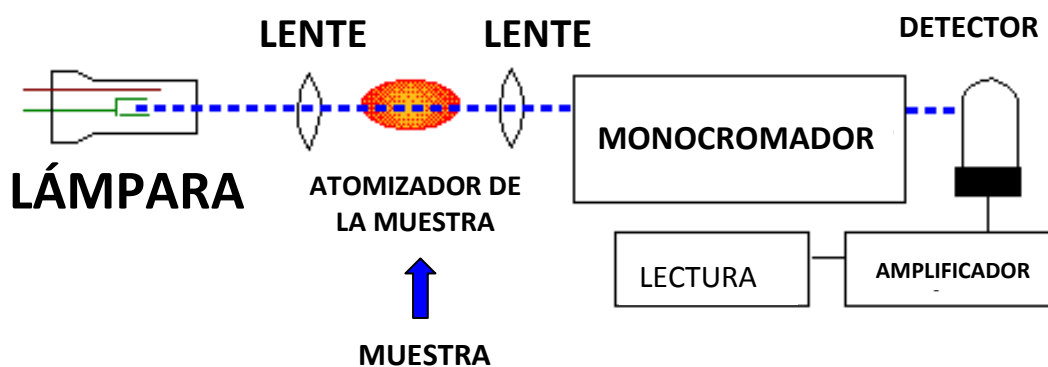
La técnica de Espectroscopía de Absorción Atómica (AAS, *Atomic Absorption Spectroscopy*) se utiliza para evaluar la concentración de un analito en una muestra líquida.

La AAS se ha utilizado con los siguientes fines:

- Determinar la cantidad de plata liberada al medio de cultivo TSB por parte de los materiales. En algunos casos también se ha usado para detectar aluminio. También se ha cuantificado la plata con presencia y ausencia de bacterias.
- Determinar la cantidad de plata que poseía el material. Para ello es necesario una digestión previa del material inorgánico.
- Determinar la cantidad máxima de plata que los materiales pueden liberar.

La técnica se basa en que los electrones de los átomos en el atomizador, pueden ser promocionados a orbitales superiores por un instante mediante la absorción de una cantidad de energía de una determinada longitud de onda. Esta longitud de onda, es específica a una transición de electrones de un determinado elemento. Cada longitud de onda corresponde a un elemento determinado.

Como la cantidad de energía que se pone en la llama es conocida, y la cantidad restante en el detector se puede medir, es posible, a partir de la Ley de Beer-Lambert, calcular cuántas de estas transiciones tienen lugar, y así obtener una señal que es proporcional a la concentración del elemento que se mide.



**Figura 8.8.** Esquema del funcionamiento de la Espectroscopía de Absorción Atómica

El equipo utilizado es un Spectra A 110 (Varian®). Se ha usado una lámpara para detección de plata con las siguientes condiciones: flujo de una mezcla de aire/acetileno de 3,5/1,5, la lámpara tenía una intensidad de 8 mA y una longitud de onda de 338,3 nm. La recta de calibrado se ha realizado a partir de una Solución de Plata Estándar para Absorción Atómica 1% en peso de plata en ácido nítrico (Sigma-Aldrich® Saint Louis, MO, USA). El equipo realiza automáticamente tres medidas por muestra. Este equipo está situado en la Escuela Politécnica Superior de Huesca de la Universidad de Zaragoza.

### 8.2.7 Espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X

Esta técnica (XPS, *X Ray Photoelectron Spectroscopy*) se ha utilizado para determinar el porcentaje de plata intercambiada que existe en la ZSM5 utilizada en los experimentos.

La espectroscopía fotoelectrónica de rayos X, también conocida como ESCA Espectroscopía Electrónica para Análisis Químico (ESCA) es un método de caracterización de superficies que proporciona información cualitativa y cuantitativa de todos los elementos presentes, excepto del Hidrógeno y el Helio.

Las muestras se irradian con un haz monocromático de fotones y se analiza la energía de emisión de fotoelectrones.

Al ser una técnica que analiza superficies, la información que da de la muestra es de aproximadamente 5 nm de profundidad (aunque dicho valor depende del ángulo del haz incidente y de la energía suministrada). De una monocapa se obtiene sensibilidad de hasta 0,1 % atómico. Para preparar las muestras simplemente se ha de fijar el material en cinta de carbono.

Este equipo permite hacer análisis de perfiles utilizando *depth profiling*. Esta técnica se basa en la eliminación de capas sucesivas en el material mediante la pulverización catódica de las secciones delgadas de la superficie de la muestra por bombardeo de iones energéticos.

El equipo usado es un modelo Axis Ultra del fabricante Kratos® (Kratos Analytical, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) que se encuentra en el Instituto de Nanociencia de Aragón en la Universidad de Zaragoza.

### 8.2.8 Adsorción de nitrógeno

Esta técnica se ha utilizado para determinar el área superficial específica, el volumen y el tamaño de poro de los materiales mesoporosos utilizados en este trabajo con el objeto de evaluar las características de la SBA15, la SBA15 funcionalizada con APTES, con nanopartículas de plata y con ácido peroxiacético absorbido.

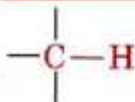
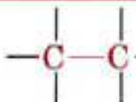
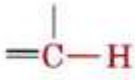

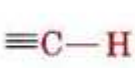
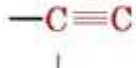

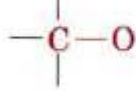
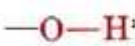
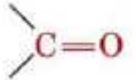
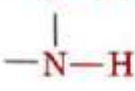

El método se basa en el análisis de las isotermas de adsorción de nitrógeno de los materiales ensayados.

El equipo utilizado ha sido el modelo ASAP 2020 V1 Micromeritics Instrument Corporation® (Norcross, GA, USA), ubicado en el Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente en el Centro Politécnico Superior de la Universidad de Zaragoza.

### 8.2.9 Espectrofotometría de infrarrojo con transformada de Fourier

La técnica espectrofotometría de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR, *Fourier Transformation Infrared Spectroscopy*), se ha utilizado para corroborar la eliminación de compuestos orgánicos de la superficie de las nanopartículas. Por ejemplo, se han utilizado para demostrar que los nanohilos de plata una vez purificados no contienen trazas de compuesto orgánico, en este caso etilenglicol utilizado en su síntesis, que pudieran alterar los resultados de los análisis microbiológicos posteriores debido a su poder bactericida. Las muestras estaban en estado líquido.

Es una técnica de análisis cualitativo para la identificación de los enlaces químicos presentes en los compuestos de la muestra. Se basa en la interacción entre la radiación electromagnética y las moléculas. Se irradia la muestra con radiación infrarroja, una parte de la radiación es absorbida por la muestra, provocando un cambio del estado vibracional y rotacional de las moléculas, y el resto pasa a través de ella.

Bond	$\lambda/\mu\text{m}$	Bond	$\lambda/\mu\text{m}$
	3.4–3.5		6.6–16.7
	3.2–3.3		5.9–6.2
	3.0		4.4–4.8
	2.5–2.8		7.7–10.0
	2.9–3.1		5.7–5.9
	2.8–3.0		4.3–5.0

**Figura 8.9.** Longitudes de onda características de algunos enlaces (Chemistry. McGraw-Hill Companies®)

Cada estructura molecular tiene un espectro característico que la identifica y que aparece en una determinada longitud de onda, y el resultado del análisis aporta los picos de absorción de los componentes de la muestra.

El equipo utilizado es un modelo Vertex 70, espectrómetro FTIR de Broker Optics® (Broker Corporation, Billerica, MA, USA) equipado con un detector DTGS y un accesorio *Golden Gate diamond* para reflectancia total atenuada (ATR, *Attenuated Total Reflectance*). El análisis de datos se realiza con el software que proporciona el fabricante (OPUS).

### 8.3 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS CEFUROXIMA, CEFAZOLINA Y LINEZOLID

Las cefalosporinas actúan sobre la pared celular de las bacterias, la cual es esencial para un crecimiento y desarrollo normal del organismo. El peptidoglicano es un componente heteropolimérico de la pared celular que le proporciona estabilidad mecánica y rigidez gracias a que su estructura le facilita capacidad de entrecruzamiento. En los microorganismos Gram positivos, la pared celular tiene un espesor de 50 a 100 moléculas de peptidoglicano pero sólo de 1 ó 2 moléculas en las bacterias Gram negativas. El peptidoglicano está compuesto por dos aminoazúcares acetilados que forman cadenas de glicano compuestas por restos alternantes de N-acetilglucosamina y de N-acetilmurámico unidas con enlaces  $\beta$  1, 4.



La biosíntesis del peptidoglicano involucra alrededor de 30 enzimas bacterianas y se suele dividir en tres pasos. La primera etapa o la de formación del precursor, tiene lugar en el citoplasma, el producto obtenido es la uridina difosfato (UDP-acetilmuram-pentapeptido), que se acumula en la célula hasta que las siguientes fases de síntesis se inhiben. La última reacción de síntesis de este compuesto es la adición del dipéptido D-alanil-D-alanina. La síntesis del dipéptido implica una previa racemización de la L-alanina y una condensación catalizada por la enzima D-alanyl-D-alanina sintetasa. Durante la segunda etapa, se unen UDP-acetilmuram-pentapeptido y UDP-acetilglucosamina para formar un polímero largo. La tercera y última etapa es la terminación del entrecruzamiento y se logra con la reacción de transpeptidación que tiene lugar fuera de la membrana celular ya que la transpeptidasa está unida a la membrana. El residuo terminal de glicina de la pentaglicina se une al cuarto residuo del pentapéptido (D-alanina), liberando el quinto residuo (también D-alanina).

Es este último paso de la síntesis del peptidocicano el que es inhibido por los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Se debe a que la conformación de la penicilina o las cefalosporinas es muy similar a D-alanil-D-alanina. La transpeptidasa se acetila con la rotura del enlace -CO-N del anillo- beta lactámico [371].

Aunque la inhibición de la transpeptidasa es muy importante hay otras moléculas dianas sobre las que actúan las penicilinas y cefalosporinas, son las denominadas *penicillin-binding proteins* (PBPs). Estas proteínas tienen diferentes interacciones covalentes con los antibióticos beta lactámicos. Algunas de ellas intervienen en el paso de la transpeptidación de la síntesis peptidoglicano y otras participan en la formación del *septum* para llevar a cabo una adecuada división celular. Por lo que la inhibición de la transpeptidasa produce tanto una lisis celular rápida como una división inadecuada dando lugar a formas filamentosas de las bacterias, por lo que la letalidad de las cefalosporinas es debida a ambos mecanismos, líticos y no líticos. De esta forma, las cefalosporinas producen una perturbación del balance entre PBP y la actividad de la mureina hidrolasa, enzima involucrada en el metabolismo de formación de la pared celular, dando lugar a una lisis celular [372].

El linezolid actúa de una manera totalmente diferente. Mientras que muchos antibióticos (macrólidos, cloramfenicol) inhiben la síntesis de proteínas actuando en la fase tardía de elongación, el linezolid actúa en una fase temprana interaccionando con la subunidad ribosomal 50s [373]. En el paso inicial de la traducción bacteriana, la subunidad 50s se asocia con fMet-tRNA y con un complejo de la subunidad ribosomal 30s y mRNA para formar el complejo funcional de iniciación. El linezolid interactúa con el sitio de unión P del peptidil-tRNA de la subunidad 50s con elevada afinidad [374]. Esta interacción impide que se una fMet-tRNA durante la formación del complejo de iniciación y por tanto se impide la síntesis de proteínas [375].

## 9. PUBLICACIONES

### 9.1. ARTÍCULOS

#### 9.1.1 Artículos relacionados con este trabajo

1. Título: ***Antibacterial action of Ag-containing MFI zeolite at low Ag loadings.***  
Autores: Patricia Lalueza, Manuel Arruebo, Marta Monzón, Jesús Santamaría.  
Revista: *Chemical Communications* (2011), Vol. 47 (2), 680 – 682.
2. Título: ***Hollow porous implants filled with mesoporous silica particles as a two-stage antibiotic-eluting device.***  
Autores: Luis Manuel Pérez, Patricia Lalueza, Marta Monzón, José Antonio Puértolas, Manuel Arruebo, Jesús Santamaría.  
Revista: *International Journal of Pharmaceutics* (2011), Vol. 409 (1-2), 1-8.
3. Título: ***Bactericidal effects of different silver-containing materials.***  
Autores: Patricia Lalueza, Marta Monzón, Manuel Arruebo, Jesús Santamaría.  
Revista: *Materials Research Bulletin* (2011), Vol. 46 2070–2076.
4. Título: ***Layered microporous titanosilicates JDF-L1 and AM-4 for biocide applications.***  
Autores: Javier Pérez-Carvajal, Patricia Lalueza, Clara Casado, Carlos Téllez, Joaquín Coronas.  
Revista: *Applied Clay Science* (2012), Vol. 56, 30–35.
5. Título: ***Strong bactericidal synergy between peracetic acid and silver-exchanged zeolitas.***  
Autores: Patricia Lalueza, Daniel Carmona, Marta Monzón, Manuel Arruebo, Jesús Santamaría.  
Revista: *Microporous and Mesoporous Materials* (2012), Vol.156, 171–175.
6. Título: ***Mesoporous silica loaded with peracetic acid and silver nanoparticles as a dual-effect, highly efficient bactericidal agent.***  
Autores: Daniel Carmona, Patricia Lalueza, Francisco Balas, Manuel Arruebo, Jesús Santamaría.  
Revista: *Microporous and Mesoporous Materials* (2012) Vol. 161, 84-90.

#### 9.1.2 Artículos anteriores a este trabajo

1. Título: ***Age-related changes in oxidative stress markers and abscisic acid levels in a drought-tolerant shrub *Cistus clusii* grown under mediterranean field conditions.***  
Autores: Sergi Munné-Bosch, Patricia Lalueza.  
Revista: *Planta* (2007) Vol. 225 (4), 1039-1049.

## 9.2 CONTRIBUCIONES A CONGRESOS

1. Título: ***Difusión controlada de antibióticos desde matrices silíceas***

Patricia Lalueza, Manuel Arruebo, Marta Monzón, Jesús Santamaría.

3ª Jornada de Jóvenes Investigadores de Aragón. Química y Física. Zaragoza, España, 10 Diciembre 2008.

2. Título: ***Antimicrobial activity of silver-exchanged zeolites as coatings on biomedical devices***

Patricia Lalueza, Luís Manuel Pérez, Marta Monzón, Manuel Arruebo, Jesús Santamaría  
22nd European Conference on Biomaterials. Lausanne, Suiza, September 7-11, 2009.

3. Título: ***Antimicrobial activity of different silver-containing materials.***

Patricia Lalueza, Marta Monzón, Manuel Arruebo, Jesús Santamaría.

23rd European Conference on Biomaterials, Tampere (Finlandia), Septiembre 11-15, 2010.

4. Título: ***Antimicrobial activity of different silver-containing materials and zeolites.***

Patricia Lalueza, Marta Monzón, Manuel Arruebo, Jesús Santamaría.

ImagineNano 2011. Bilbao (España). Abril 11-14, 2011.

## 9.3 PATENTES

Título: ***Implante de hueso, dotado de límites porosos, para la liberación controlada de compuestos terapéuticamente activos.***

Inventores/as (p.o de firma): Manuel Arruebo Gordo, Silvia Irusta Alderete, Luís Manuel Pérez Puentes, Patricia Lalueza Valero, José Antonio Puértolas Rafales, Luís Gracia Villa, Felícito Enrique García-Álvarez García, Marta Monzón Garcés, Jesús Santamaría Ramiro

Nº DE SOLICITUD: P200931157.

PAÍS DE PRIORIDAD: España.

FECHA DE PRIORIDAD: 11/12/09.

Título: ***Composición bactericida y método de desinfección y/o esterilización que comprende dicha composición.***

Inventores/as (p.o de firma): Manuel Arruebo Gordo, Jesús Santamaría Ramiro, Patricia Lalueza Valero.

Nº DE SOLICITUD: P201131264.

PAÍS DE PRIORIDAD: España.

FECHA DE PRIORIDAD: 22/07/11.

## 10. REFERENCIAS

1. <http://www.merckengage.com>.
2. <http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2010/en#/XX>.
3. <http://www.who.int/en/>.
4. Kenrad E. Nelson, M., Johns Hopkins, *Infectious Disease Epidemiology*. Jones and Bartlett Publishers, 2007.
5. [www.elementos.buap.mx/num77/pdf/15.pdf](http://www.elementos.buap.mx/num77/pdf/15.pdf).
6. [http://www.gum2012.fionastoreydesign.co.uk/facilities\\_background.html](http://www.gum2012.fionastoreydesign.co.uk/facilities_background.html).
7. <http://pathmicro.med.sc.edu/mhunt/intro-vir.htm>.
8. Moran, N.A., *Symbiosis*. Current Biology, 2006. **16**(20): p. R866-R871.
9. Meilhoc, E., Boscari, Alexandre, Bruand, Claude, Puppo, Alain, Brouquisse, Renaud, *Nitric oxide in legumeae rhizobium symbiosis*. Plant Science, 2011. **181**(5): p. 573-581.
10. Ishikawa, T., et al., *Transport phenomena of microbial flora in the small intestine with peristalsis*. Journal of Theoretical Biology, 2011. **279**(1): p. 63-73.
11. Larson, E.L., Cronquist, Alicia B., Whittier, Susan, Lai, Lena, Lyle, Christopher T., Latta, Phyllis Della, *Differences in skin flora between inpatients and chronically ill outpatients*. Heart & Lung: The Journal of Acute and Critical Care, 2000. **29**(4): p. 298-305.
12. <http://www.who.int/infectious-disease-report/pages/ch1text.html>.
13. <http://www.who.int/infectious-disease-report/pages/ch1text.html>.
14. *CDCFact sheet for health professionals Emergency wound management for healthcare professionals*.  
<http://www.bt.cdc.gov/disasters/emergwoundhcp.asp>, 2006.
15. *Microbes without borders: Key facts on infectious diseases in Europe*. European centre for disease prevention and control (ECDC), 2007.
16. G, D., *Guide pratique pour la lutte contre l'infection hospitalière*. . WHO/BAC. **79.1**.
17. G.L. French, A.F.C., *Measurement of the costs of hospital infection by prevalence surveys*. Journal Hosp Infect, 1991. **18**(A): p. 65-72.
18. Wenzel, R.P., *The Lowbury Lecture*. J Hosp Infect., 1995. **31**: p. 79-87.

19. W.J. Martone, W.R.J., D.H. Culver, R.W. Haley *Incidence and nature of endemic and epidemic nosocomial infections*. Hospital infections (3rd edn), Little, Brown and Company, Boston 1992: p. 577-596.
20. *Circulaire DGS/VS/VS2-DH/E01 n°17 du 19 avril 1995 relative à la lutte contre les infections nosocomiales dans les établissements de santé publics ou privés participant au service public*. Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire, 1995. **28**: p. 125-127.
21. G. Ducel, F.H., Ginebra, Suiza, J. Fabry, Universidad Claude Bernard, Lyon, Francia, L. Nicolle, Universidad de Manitoba, Winnipeg, Canadá, *Prevención de las infecciones nosocomiales: Guía práctica*. . WHO/CDS/CSR/EPH/, 2002. **12**.
22. System, A.r.f.t.N., *National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004*. American journal of infection control, 2004. **32**(8): p. 470-485.
23. Ivón Karina Ruiz López, J.B.B.D.H., Daniel O. Pacheco Rosas,3 Martha Velázquez Camacho Eric M Flores Ruiz,3 Ma. Guadalupe Miranda Novales., *Bacterial resistance in isolates from patients with nosocomial infections*. ENF INF MICROBIOL, 2007. **27**(1): p. 15-21.
24. Chen, P., et al., *An improved medium for growing Staphylococcus aureus biofilm*. Journal of Microbiological Methods, 2012. **90**(2): p. 115-118.
25. Prescott, *Microbiology*. 1996: p. 392.
26. Chambers, H., *The changing epidemiology of Staphylococcus aureus?* Emerg Infect Dis. , 2001. **7**: p. 178-182.
27. Neu, H., *The crisis in antibiotic resistance*. *Science.*, 1992. **257**(1064-1072).
28. Barrett FF, M.R.J., Finland M. , *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus at Boston City Hospital: bacteriologic and epidemiologic observations*. N Engl J Med., 1968. **279**(441-448).
29. Louis B. Rice, M., *Antimicrobial Resistance in Gram-Positive Bacteria*. The American Journal of Medicine, 2006. **119**(6A): p. 11-19.
30. Klevens, *Invasive Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Infections in the United States* Journal of the American Medical Association 1997. **298**(15): p. 1763-1771.

31. Engelsman, A.F., et al., *Morphological aspects of surgical meshes as a risk factor for bacterial colonization*. British Journal of Surgery, 2008. **95**(8): p. 1051-1059.
32. I. Lasa, J.L.d.P., J. R. Penadés, J. Leiva, *Biofilms bacterianos e infección*.
33. Hall-Stoodley, L., J.W. Costerton, and P. Stoodley, *Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases*. Nat Rev Micro, 2004. **2**(2): p. 95-108.
34. JW. Costerton, K.C., GC. Geesey, TI. Ladd, JC. Nickel, M. Dasgupta, TJ. Marrie. , *Bacterial biofilms in nature and disease*. Annual review of microbiology, 1987. **41**: p. 435-464.
35. Gristina., A., *Implant failure and the immune-incompetent fibro-inflammatory zone*. . Clinical orthopaedics and related research, , 1994. **298**: p. 106-118.
36. <http://www.fda.gov>.
37. Monzón M. , G.-Á.F., Laclériga A., Gracia E., Leiva J., Oteiza C., Amorena B, *A simple infection model using pre-colonized implants to reproduce rat chronic Staphylococcus aureus osteomyelitis and study antibiotic treatment*. J Orthop. Res, 2001. **19**(820-826).
38. E.A. Salvati, A.G.D.V., B.A. Masri *The infected total hip arthroplasty*. Instr Course Lect, 2003. **52**: p. 223.
39. Schwechter, E.M., et al., *Optimal Irrigation and Debridement of Infected Joint Implants: An In Vitro Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Biofilm Model*. The Journal of Arthroplasty. **26**(6, Supplement): p. 109-113.
40. Widmer, A.F., *New developments in diagnosis and treatment of infection in orthopedic implants*. Clin Infect Dis, 2001. **33**(Suppl 2): p. 94.
41. JYarwood JM, B.D., Volper EM and Greenberg EP, *Quorum Sensing in Staphylococcus aureus Biofilms*. J Bacteriol. , 2004. **186**(6): p. 1838-50.
42. Schachter, B., *Slimy business - the biotechnology of biofilms*. Nature, 2003. **21**: p. 361-365.
43. Pankey, G.A. and L.D. Sabath, *Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections*. Clinical Infectious Diseases, 2004. **38**(6): p. 864-870.

44. French, G.L., *Bactericidal agents in the treatment of MRSA infection, the potential role of daptomycin*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2006. **58**(6): p. 1107-1117.
45. *Antibiotics are substances that are derived from various species of microorganisms and are capable of inhibiting the growth of other microorganisms when administered in sma*. Antimicrobial chemotherapy.
46. da Silva Meira, Q.G., et al., *Influence of temperature and surface kind on biofilm formation by Staphylococcus aureus from food-contact surfaces and sensitivity to sanitizers*. Food Control, 2011. **25**(2): p. 469-475.
47. Sharma, M., J. Eastridge, and C. Mudd, *Effective household disinfection methods of kitchen sponges*. Food Control, 2009. **20**(3): p. 310-313.
48. Leonardo Sánchez-Saldaña, E., *Antisépticos y desinfectantes*. Dermatología Peruana, 2005. **15**(2): p. 82-103.
49. A. Rutala, P., MPH, CIC., *APIC guideline for selection and use of disinfectant* William APIC Guidelines Committee, 1994-1996.
50. TA Koski , S.L., Ortenzio LF, *Comparison of chlorine, bromine, iodine as disinfectants for swimming pool water*. Applied Microbiology, 1966. **14**(2): p. 276-279.
51. Hua, G. and D.A. Reckhow, *Comparison of disinfection byproduct formation from chlorine and alternative disinfectants*. Water Research, 2007. **41**(8): p. 1667-1678.
52. USEPA, S.D.a.D.B.R.E.-H.-O.-.-.
53. Panasenko, O.M., et al., *Hypochlorite induces lipid peroxidation in blood lipoproteins and phospholipid liposomes*. Free Radical Biology and Medicine, 1995. **19**(2): p. 133-140.
54. R.T. Ricketts, W.B.L.I., F. Klein, M.E. Gustafson, M.C. Flickinger Application, sterilization and decontamination of ultrafiltration systems for large-scale production of biologicals D. LeRoith, J. Shiloach, T.J. Leahy (Eds.), Purification of Fermentation Products, ACS Symposium series (ACS), Washington, DC, USA (1985), pp. 21–49.
55. 7393-2, C.C.I.

56. Kinani, S., et al., *Analysis of inorganic chloramines in water*. TrAC Trends in Analytical Chemistry. **33**(0): p. 55-67.
57. Snyder, S.A., Vanderford, B.J., Rexing, D.J., 2005. Trace analysis of bromate, chlorate, iodate, and perchlorate in natural and bottled waters. Environ. Sci. Technol. 39, 4586–4593.
58. Diehl, A.C., Speitel, G.E., Symons, J.M., Krasner, S.W., Hwang, C.J., Barrett, S.E., *DBP formation during chloramination*. J. Am. Water Works Assoc. , 2000. **92**(6): p. 76-90.
59. Zuo, J.-l., et al., *Removal effect on Mesocyclops leukarti and mutagenicity with chlorine dioxide*. Journal of Environmental Sciences, 2006. **18**(5): p. 891-896.
60. Singer, P.C., 1994. Control of disinfection by-products in drinking water. J. Environ. Eng.—ASCE 120 (4), 727–744.
61. Reckhow, D.A., Singer, P.C., 1984. The removal of organic halide precursors by preozonation and alum coagulation. J. Am. and Water Works Assoc. 76 (4).
62. Hoigne, J., Bader, H., *The formation of trichloronitromethane (chloropicrin) and chloroform in a combined ozonation/chlorination treatment of drinking water*. Water Research, 1988. **3**: p. 313-319.
63. Jacangelo, J.G., Patania, N.L., Reagen, K.M., Aieta, E.M., Krasner, S.W., McGuire, M.J., *Ozonation: assessing its role in the formation and control of disinfection by-products*. . J. Am. Water Works Assoc., 1989. **81**(8): p. 74-84.
64. Miltner, R.J., Shukairy, H.M., Summers, R.S., *Disinfection byproducts formation and control by ozonation and biotreatment*. J. Am. Water Works Assoc., 1992. **84**(11): p. 53-62.
65. Hartmann, C.M., 2002. Identification and fate of mixed ozonation/ chlorination and ozonation/chloramination by-products in drinking water treatment. Ph.D. Dissertation, University of Massachusetts, Amherst.
66. Jubany-Mari, T., S. Munné-Bosch, and L. Alegre, *Redox regulation of water stress responses in field-grown plants. Role of hydrogen peroxide and ascorbate*. Plant Physiology and Biochemistry. **48**(5): p. 351-358.
67. Zeromski, J. and E. Jezewska, *Functional alterations of human blood monocytes after exposure to various nickel compounds in vitro: an effect on the production of hydrogen peroxide*. Immunology Letters, 1995. **45**(1&2): p. 117-121.



68. J.W. McLeod, J.G., *Production of hydrogen peroxide by bacteria* J Path Bact., 1923. **23**: p. 499-506.
69. Bravo, J., Verdaguer, Núria, Tormo, José, Betzel, Christian, Switala, Jack, Loewen, Peter C., Fita, Ignacio, *Crystal structure of catalase HPII from Escherichia coli*. Structure, 1995. **3**(5): p. 491-502.
70. Del'Alamo, L., et al., *An outbreak of catalase-negative meticillin-resistant Staphylococcus aureus*. Journal of Hospital Infection, 2007. **65**(3): p. 226-230.
71. *Codinep. Grupo asesor de control d infecciones y epidemiología. Argentina.*
72. Cardoso, C.F., Faria, Jose de Assis Fonseca, Miranda Walter, Eduardo Henrique, *Modeling of sporicidal effect of hydrogen peroxide in the sterilization of low density polyethylene film inoculated with Bacillus subtilis spores*. Food Control, 2011. **22**(10): p. 1559-1564.
73. <http://tel.archives-ouvertes.fr/docs/00/56/08/83/PDF/leveneaur.pdf>.
74. Kitis, M., *Disinfection of wastewater with peracetic acid: a review*. Environment International, 2004. **30**(1): p. 47-55.
75. Lalueza, P., Carmona, Daniel, Monzón, Marta, Arruebo, Manuel, Santamaría, Jesús, *Strong bactericidal synergy between peracetic acid and silver-exchanged zeolites*. Microporous and Mesoporous Materials, 2012. **156**(0): p. 171-175.
76. Baldry, M.G.C.B., *The bactericidal, fungicidal and esporicidal properties of hydrogen peroxide and peracetics acid*. Journal of Applied Bacteriology, 1983. **54** (3): p. 417-423
77. <http://nepis.epa.gov/Adobe/PDF/P1004VF7.pdf>.
78. Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology, 1985.
79. S. Monarca, S.D.R., D. Feretti, M. Grottolo, A.D. Thruston, C. Zani, G. Navazio, P. Ragazzo, I. Zerbini, A. Alberti, *Mutagenicity and disinfection by-products in surface drinking water disinfected with peracetic acid*. Environ. Toxicol. Chem., 2002. **21**: p. 309-318.
80. [www.epa.gov](http://www.epa.gov).
81. Schmidt, A., et al., *Heavy metal resistance mechanisms in actinobacteria for survival in AMD contaminated soils*. Chemie der Erde - Geochemistry, 2005. **65**, Supplement 1(0): p. 131-144.

82. M. Dopson, C.B.-A., P.R. Koppineedi, P.L. , *Bond Growth in sulphidic mineral environments: metal resistance mechanisms in acidophilic micro-organisms*. Microbiology, 2003. **149**: p. 1959-1970.
83. Nies, D.H., *Heavy metal resistance* Applied Microbiology and Biotechnology, 1999. **51**: p. 730-750.
84. C. Geslin, J.L., D. Prieur, C. Jeanthon *The manganese and iron superoxide dismutases protect Escherichia coli from heavy metal toxicity*. 2001.
85. C. Cervantes, H.O., L. Chu, T. Misra, S. Silver *Cloning, nucleotide sequence, and expression of the chromate resistance determinant of Pseudomonas aeruginosa plasmid pUM505*. 1990.
86. Jencova, V., et al., *Nucleotide sequence, organization and characterization of the (halo)aromatic acid catabolic plasmid pA81 from Achromobacter xylosoxidans A8*. Research in Microbiology, 2008. **159**(2): p. 118-127.
87. Massidda, O., et al., *Analysis of the B-lactamase plasmid of borderline methicillin-susceptible Staphylococcus aureus: Focus on bla complex genes and cadmium resistance determinants cadD and cadX*. Plasmid, 2006. **55**(2): p. 114-127.
88. Gupta, A., Matsui, K., Lo, J.F., Silver, S., *Molecular basis for resistance to silver cations in Salmonella*. Nat. Med, 1999. **5**(2): p. 183-188.
89. Walton, R.C., et al., *Tissue accumulation of aluminium is not a predictor of toxicity in the freshwater snail, Lymnaea stagnalis*. Environmental Pollution, 2009. **157**(7): p. 2142-2146.
90. Chao Feng Huang , N.Y., Namiki Mitani , Masahiro YanoYoshiaki Nagamura, Jian Feng Ma *A Bacterial-Type ABC Transporter Is Involved in Aluminum Tolerance in Rice*. Plant Cell, 2009. **21**: p. 655-667.
91. Wood, M., *A mechanism of aluminium toxicity to soil bacteria and possible ecological implications*. Plant and Soil, 1995. **171**(1): p. 63-69.
92. Government, A.S.A.A.i.o.N., *Pastures and Acid Soils*.
93. <http://www.pv.fagro.edu.uy/cursos/pvh/DocsPVH/C-QUIMICO.pdf>.
94. <http://www.shengpengchem.com>.

95. Almeida, A., Cunha, Ángela, Fernandes, Sandra, Sobral, Paula, Alcántara, Fernanda, *Copper effects on bacterial activity of estuarine silty sediments*. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 2007. **73**(3(4)): p. 743-752.
96. Thurman R.B., G.C.P., *The Molecular Mechanisms of Copper and Silver Ion Disinfection of Bacteria and Viruses CRC Critical Reviews in Environmental Control* 1989. **18** (4)(295-315).
97. Sterritt, R.L., JN (1980). "Interactions of heavy metals with bacteria". *The Science of the total environment* **14** (1): 5–17.
98. Kuwahara, J.S., Tadashi; Funakoshi, Kyoko, Sugiura, Yukio., *Photosensitive DNA cleavage and phage inactivation by copper(II)-camptothecin*. Biochemistry, 1983. **25**(6): p. 1216-1221.
99. [www.antimicrobialcopper.com](http://www.antimicrobialcopper.com).
100. [www.cupron.com](http://www.cupron.com).
101. *Diagnosis and Therapy Springer-Verlag*,. A.S. Gerlach Marine Pollution., 1981: p. 218.
102. De, J. and N. Ramaiah, *Characterization of marine bacteria highly resistant to mercury exhibiting multiple resistances to toxic chemicals*. Ecological Indicators, 2007. **7**(3): p. 511-520.
103. Graeme Md, K.A. and M.D.F.C.V. Pollack Jr, *Heavy Metal Toxicity, Part I: Arsenic and Mercury*. The Journal of Emergency Medicine, 1998. **16**(1): p. 45-56.
104. Lorscheider FL, V.M., Summers AO *Mercury exposure from silver tooth emerging evidence questions a traditional dental paradigm*. FASEB J, 1995. **9**: p. 504-508.
105. Banerjee, D., Das, Parimal Kumar, Singha, Haraprasad, Bagchi, Sanjib, *Fluorimetric study of interaction of merbromin with trypsin*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2008. **70**(5): p. 1109-1113.
106. BE, B., *Cadmium transport by a Cd<sup>2+</sup>-sensitive and a Cd<sup>2+</sup>-resistant strain of Bacillus subtilis*. Can J Microbiol 1986. **32**: p. 539-542.
107. [www.quimetal.cl](http://www.quimetal.cl).
108. Weast RC *CRC handbook of chemistry and physics*. 64 edn. CRC, Boca Raton, Fla, 1984.

109. Davis CM, V.J., *Isolation and characterization of a biologically active chromium oligopeptide from bovine liver*. Arch Biochem Biophys, 1997. **339**: p. 335-343.
110. [www.curtinsa.com](http://www.curtinsa.com).
111. Lalueza, P., Arruebo, M., Monzón, M., Santamaría J, , *Antibacterial action of Ag-containing MFI zeolite at low Ag loadings* Chemical Communication, 2011. **47(2)**: p. 680 - 682.
112. Williams, D.F., *On the nature of biomaterials*. Biomaterials, 2009. **30**: p. 5897-5909.
113. REGÍ, M.V., *Biomateriales para sustitución y reparación de tejidos*.
114. Hryniewicz, T., R. Rokicki, and K. Rokosz, *Corrosion and surface characterization of titanium biomaterial after magnetoelectropolishing*. Surface and Coatings Technology, 2009. **203(10-11)**: p. 1508-1515.
115. Sionkowska, A., *Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: Review*. Progress in Polymer Science. **36(9)**: p. 1254-1276.
116. M. Olivares Santiago, C.G.M., J. Roa Fernández, *Los composites: características y aplicaciones en la construcción*. Informes de la Construcción, 2003. **54(184)**.
117. Gauthier, O., et al., *In vivo bone regeneration with injectable calcium phosphate biomaterial: A three-dimensional micro-computed tomographic, biomechanical and SEM study*. Biomaterials, 2005. **26(27)**: p. 5444-5453.
118. Franz, S., et al., *Immune responses to implants. A review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials*. Biomaterials, 2011. **32(28)**: p. 6692-6709.
119. Feynman, R., *There's plenty of room at the bottom (reprint from speech given at annual meeting of the American Physical Society)*. Eng Sci, 1960. **23**: p. 22-36.
120. Sanchez, F. and K. Sobolev, *Nanotechnology in concrete – A review*. Construction and Building Materials. **24(11)**: p. 2060-2071.
121. *NSTC, The National Nanotechnology Initiative*. Executive Office of the President of the United States. Strategic Plan., 2007.
122. Girard-Egrot, A.P., S. Godoy, and L.c.J. Blum, *Enzyme association with lipidic Langmuir Blodgett films: Interests and applications in nanobioscience*. Advances in Colloid and Interface Science, 2005. **116(1)**: p. 205-225.

123. Health, N.I.O., *Bioengineering Nanotechnology Initiative*. Bethesda, MD, Estados Unidos: Office of Extramural Research., 2002.
124. Roco, *National Nanotechnology investment in the Fy 2004 budget request*. AAAS report. XXVIII: research and development FY 2004, 2004.
125. Lancet, T., *Nanomedicine: grounds for optimism, and a call for papers*. Lancet 1 (7901), 235-240., 2003. **362**: p. 673.
126. Dalby, M.J., et al., *Use of nanotopography to study mechanotransduction in fibroblasts – methods and perspectives*. European Journal of Cell Biology, 2004. **83**(4): p. 159-169.
127. Cheng, M.S., et al., *Development of an electrochemical membrane-based nanobiosensor for ultrasensitive detection of dengue virus*. Analytica Chimica Acta, 2012. **725**(0): p. 74-80.
128. Cebrián, V., et al., *Size-dependent transfection efficiency of PEI-coated gold nanoparticles*. Acta Biomaterialia, 2011. **7**(10): p. 3645-3655.
129. Ashby, M.F., Ferreira, P. J y Schodek, D.L, *Nanomaterials: Classes and Fundamentals*. . Nanomateriales, Nanotechnologies and Design, 2009: p. 177-197.
130. Perez, L.M., et al., *Hollow porous implants filled with mesoporous silica particles as a two-stage antibiotic-eluting device*. International Journal of Pharmaceutics. **409**(1-2): p. 1-8.
131. Wang, X., P. Liu, and Y. Tian, *Ordered mesoporous carbons for ibuprofen drug loading and release behavior*. Microporous and Mesoporous Materials, 2011. **142**(1): p. 334-340.
132. Skoog, S.A., et al., *Antibacterial activity of zinc oxide-coated nanoporous alumina*. Materials Science and Engineering: B, 2012. **177**(12): p. 992-998.
133. N.K. Savant, L.E.D., G.H. Snyder *Depletion of plant-available silicon in soils: a possible cause of declining rice fields*. Commun. Soil Sci. Plant Anal., 1997. **28**: p. 1245-1252.
134. Carlisle, E.M., *Silicon as an essential element for the chick*. Science of The Total Environment, 1972. **178**: p. 619-621.
135. Vallet-Regi, M., *Revisiting ceramics for medical applications*. Dalton Transactions, 2006(44): p. 5211-5220.

136. K.S.W. Sing, D.H.E., R.A.W. Haul, L. Moscou, R.A. Pierotti, J. Rouquerol, T. Siemieniowska, , *Reporting physisorption data for Gas/Solid Systems with Special Reference to the Determination of Surface Area and Porosity*. Pure Appl. Chem. , 1985. **57**: p. 603-619.
137. Javier Pérez-Ramírez, C.H.C., Kresten Egeblad, Christina H. Christensen, Johan C. Groen, *Hierarchical zeolites: enhanced utilisation of microporous crystals in catalysis by advances in materials design*. Chem. Soc. Rev., 2008. **37**: p. 2530-2542.
138. X. S. Zhao, G.G.L., *Nanoporous materials-an overview*. Chapter 1. Nanoporous Materials - Science and Engineering.
139. Shor, A.M. and A.I. Rubaylo, *IR spectroscopic study of SO<sub>2</sub> adsorption on modified Y zeolites*. Journal of Molecular Structure, 1997. **410**–**411**(0): p. 133-136.
140. Wang, Y., et al., *Adsorption of NO and N<sub>2</sub>O on Fe-BEA and H-BEA zeolites*. Applied Surface Science. **256**(12): p. 4042-4047.
141. Kim, K.-J. and H.-G. Ahn, *The effect of pore structure of zeolite on the adsorption of VOCs and their desorption properties by microwave heating*. Microporous and Mesoporous Materials. **152**(0): p. 78-83.
142. Carmona, D., et al., *Mesoporous silica loaded with peracetic acid and silver nanoparticles as a dual-effect, highly efficient bactericidal agent*. Microporous and Mesoporous Materials, 2012. **161**(0): p. 84-90.
143. Dubbe, A., *The effect of platinum clusters in the zeolite micropores of a zeolite-based potentiometric hydrocarbon gas sensor*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2009. **137**(1): p. 205-208.
144. Pellejero, I., et al., *Nanoporous silicalite-only cantilevers as micromechanical sensors: Fabrication, resonance response and VOCs sensing performance*. Sensors and Actuators B: Chemical. **168**(0): p. 74-82.
145. Cebrián, V., et al., *On the role of the colloidal stability of mesoporous silica nanoparticles as gene delivery vectors*. Journal of Nanoparticle Research, 2011. **13**(9): p. 4097-4108.
146. Akira Taguchi, F.S., *Ordered mesoporous materials in catalysis*. Microporous and Mesoporous Materials 2005. **77**(1-45).

147. C. Baerlocher, W.M.M.a.D.H.O., *Atlas of Zeolite Framework Types*. Elsevier, Amsterdam, , 2001. **5th edn**.
148. <http://www.iza-structure.org/>.
149. Weitkamp, J., *Zeolites and catalysis*. Solid State Ionics 2000. **131**: p. 175-188.
150. Nanozeolites: Synthesis, C.M., and Applications, *Lubomira Tosheva and Valentin P. Valtchev*. Chem. Mater., 2005. **17**: p. 2494-2513.
151. Lee, H., Zones, Stacey I., Davis, Mark E., *Zeolite Synthesis Using Degradable Structure-Directing Agents and Pore-Filling Agents* The Journal of Physical Chemistry B, 2004. **109**(6): p. 2187-2191.
152. Kuroda, Y., R. Kumashiro, and M. Nagao, *Prominent redox feature of copper ion exchanged in ZSM-5-type zeolite*. Applied Surface Science, 2002. **196**(4): p. 408-422.
153. Lalueza, P., Monzón, Marta, Arruebo, Manuel, Santamaría, Jesús, *Bactericidal effects of different silver-containing materials*. Materials Research Bulletin, 2012. **46**(11): p. 2070-2076.
154. Moretti, G., et al., *A comparison between Cu-ZSM-5, Cu-S-1 and Cu-mesoporous-silica/alumina as catalysts for NO decomposition*. Applied Catalysis B: Environmental, 1999. **20**(1): p. 67-73.
155. A.H. Janssen, A.J.K., K.P. de Jong, *Angew. , Chem. Int. Ed.*, 2001. **40**: p. 1102.
156. I. Schmidt, A.B., E. Gustavsson, K. Staahl, S. Pehrson, S. Dahl, A. Carlsson, C.J.H. Jacobsen., *Chem. Mater. , 2001. 13*: p. 4416.
157. S. T. Wilson, B.M.L., C. A. Messina, T. R. Cannon and E. M. Flanigen 1146., *Aluminophosphate Molecular-Sieves - A New Class of Microporous Crystalline Inorganic Solids*. J. Am. Chem. Soc. , 1982. **104**.
158. E. M. Flanigen, R.L.P., S. T. Wilson *Structural, Synthetic and Physicochemical Concepts in Aluminophosphate-Based Molecular Sieves*. Stud. Surf. Sci. Catal. , 1988. **37**.
159. H. Li, O.M.Y., *Transformation of Germanium Dioxide to Microporous Germanate 4-Connected Nets* Am. Chem. Soc. , 1998. **120**.
160. X. D. Zou, T.C., M. Klingstedt, M. S. Dadachov, M. O'Keeffe *A mesoporous germanium oxide with crystalline pore walls and its chiral derivative*. Nature, 2005. **437**.

161. G.C, C.M., *Que son las zeolitas y los zeotipos y sus aplicaciones* Universidad de Córdoba, 2006.
162. Utcharyajit, K. and S. Wongkasemjit, *Structural aspects of mesoporous AlPO<sub>4</sub>-5 (AFI) zeotype using microwave radiation and alumatrane precursor*. *Microporous and Mesoporous Materials*, 2008. **114**(1-3): p. 175-184.
163. Kresge, C.T., et al., *Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism*. *Nature*, 1992. **359**(6397): p. 710-712.
164. Wang, S., *Ordered mesoporous materials for drug delivery*. *Microporous and Mesoporous Materials*, 2009. **117**: p. 1-9.
165. Y. Wan, D.Z., *On the controllable soft-templating approach to mesoporous silicates*. *Chem. Rev.*, 2007. **107**: p. 2821-2860.
166. Villarejo, M.V.R.-A.L.D., *Liberación de fármacos en matrices biocerámicas: Avances y perspectivas*. Fundación José Casares Gil.
167. Brett, D.K.W., *Ostomy Wound Manage*, 2006. **52**: p. 3.
168. Joy Fong<sup>1</sup>, F.W.N.s.d.i.w.m.a.r.J.o.N., *Nanocrystalline silver dressings in wound management: a review*. *International Journal of Nanomedicine* 2006. **1**(4): p. 441-449.
169. [www.silver-colloids.com](http://www.silver-colloids.com).
170. Klaseen, H.J., *A historical review of the use of silver in burns, Part I*. *Early uses*. *Burns*, 2000. **26**(1): p. 1-9.
171. A.B, L.a.A.W., *Bacterial resistance to silver in wound care and medical devices*. *J. Wound care.*, 2007. **16**(1): p. 15-19.
172. Castellano, J.J., Shafil, S.M., Ko, F., Donate, G., Wright, T.E., Mannari, R.J., Payne, W.G., Smith, D.J., Robson, M.C., *Comparative evaluation of silver-containing antimicrobial dressings and drugs*. *Int. Wound J.*, 2007. **4**(2): p. 114-122.
173. DeSanti, R.H.D.a.L., *Effects of silver on wound management*. *Wounds*, 2001. **13**: p. 4.
174. W.B. Hugo and A.D. Russell, *Types of antimicrobial agents, In: Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization*,. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK 1982: p. 106 8.



175. Chopra, I., *The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern?* Journal Antimicrob Chemother, 2007. **59**: p. 587-590.
176. Rai, M., A. Yadav, and A. Gade, *Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials.* Biotechnology Advances. **27**(1): p. 76-83.
177. Bragg PD, R.D., *The effect of silver ion on the respiratory chain of Escherichia coli.* Can J Microbiol, 1974. **20**: p. 883-889.
178. Haefili C, F.C., Hardy K. . *Plasmid-determined silver resistance in Pseudomonas stutzeri isolated from a silver mine.* J Bacteriol., 1984. **158**: p. 389-392.
179. Rosenkranz HS, C.H., *Silver sulfadiazine: effect on growth and metabolism of bacteria.* Antimicrob Agents Chemother, 1972. **5**: p. 199-201.
180. Schreurs WJA, R.H., *Effect of silver ions on transport and retention of phosphate by Escherichia coli.* . J Bacteriol., 1982. **152**(1): p. 7-13.
181. Yamanaka M, H.K., Kudo J. , *Bactericidal Actions of a Silver Ion Solution on Escherichia coli, Studied by Energy-Filtering Transmission Electron Microscopy and Proteomic Analysis.* . App. Environ. Microbiol., 2005. **71**(11): p. 7589-7593.
182. Q.L. Feng, J.W., G.Q. Chen, F.Z. Cui, T.N. Kim and J.O. Kim, *A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus.* J Biomed Mater 2000. **52** (4): p. 662-668.
183. J.R. Morones, J.L.E., A. Camacho and J.T. Ramirez, *The bactericidal effect of silver nanoparticles* Nanotechnology, 2005. **16**: p. 2346-2353.
184. Song HY, K.K., Oh LH, Lee BT., *Fabrication of silver nanoparticles and their antimicrobial mechanisms.* . Eur Cells Mater 2006. **11**: p. 58.
185. Liau SY, R.D., Pugh WJ, Furr JR, Russell AD. I, *Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions.* Lett Appl Microbiol, 1997. **25**: p. 279-283.
186. Matsumura, Y., Yoshikata, K., Kunisaki, S., Tsuchido, T.,, *Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate.* . App. Environ. Microbiol. , 2003. **69** (7): p. 4278-4281.
187. DeVasConCellos, P., et al., *Antimicrobial particulate silver coatings on stainless steel implants for fracture management.* Materials Science and Engineering: C, 2012. **32**(5): p. 1112-1120.

188. Malachova, K., P. Praus, and M. Turicova, *Activity of antibacterial compounds immobilised on montmorillonite*. Applied Clay Science, 2009. **43**(4): p. 364-368.
189. Kawahara, K., et al., *Antibacterial effect of silver-zeolite on oral bacteria under anaerobic conditions*. Dental Materials, 2000. **16**(6): p. 452-455.
190. Raimondi F, S.G., Kotz R, Wokaun A. Angew. , *Nanoparticles in energy technology: examples from electrochemistry and catalysis*. . Chem., Int. Ed., 2005. **44**: p. 2190-2209.
191. Pal S, T.Y., Song JM. , *Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium Escherichia coli*. . Appl Environ Microbiol 2007. **27**(6): p. 1712-1720.
192. A. Panacek, L.K., R. Prucek, M. Kolar, R. Vecerova and N. Pizurova et al., , *Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity*. J Phys Chem 2006. **110** (**33**): p. 16248-16253.
193. Lok, C.N., Ho, C. M., Chen, R., He, Q. Y., Yu, W. Y., Sun, H., Tam, P. K. H., Chiu, J. F., Che, C. M., *Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities*. Journal of Biological Inorganic Chemistry, 2007. **12**(4): p. 527-534.
194. Choi, O., et al., *The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth*. Water Research, 2008. **42**(12): p. 3066-3074.
195. Kittler, S., et al., *Toxicity of Silver Nanoparticles Increases during Storage Because of Slow Dissolution under Release of Silver Ions*. Chemistry of Materials. **22**(16): p. 4548-4554.
196. F.A. Cotton, G.W., Advanced Inorganic Chemistry, 1996. **2nd edition**.
197. McHugh, G.L., Moellering, R.C., Hopkins, C.C., Swartz, M.N. , *Salmonella typhimurium resistant to silver nitrate, chloramphenicol, and ampicillin*. Lancet 1 (7901), 235-240., 1975. **1**(7901): p. 235-240.
198. Grewal, J.S., Tiwari, R.P., *Resistance to metal ions and antibiotics in Escherichia coli isolated from foodstuffs*. J Med. Microbil, 1990. **32**(4): p. 223-226.
199. Haefeli, C., Franklin, C., Hardy, K, *Plasmid-determined silver resistance in Pseudomonas stutzeri isolated from a silver mine*. . J Bacteriol., 1984. **158**(1): p. 389-392.

200. Silver, S., *Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds*. FEMS Microbiology Reviews, 2003. **27**(2 (3)): p. 341-353.
201. F., B., *Low level antibacterial resistance: a gateway to clinical resistance*. . Drug Resist Update 2001. **4**: p. 93-105.
202. Woods, E.J., C.A. Cochrane, and S.L. Percival, *Prevalence of silver resistance genes in bacteria isolated from human and horse wounds*. Veterinary Microbiology, 2009. **138**(3): p. 325-329.
203. Percival, S.L., P.G. Bowler, and D. Russell, *Bacterial resistance to silver in wound care*. Journal of Hospital Infection, 2005. **60**(1): p. 1-7.
204. Ip, M., et al., *The prevalence of resistance to silver in a Burns unit*. Journal of Hospital Infection, 2006. **63**(3): p. 342-344.
205. Davis, S.C., Ricotti, C., Cazzaniga, A., Welsh, E., Eaglstein, W.H., Mertz, P.M., *Microscopic and physiologic evidence for biofilm associated wound colonization in vivo*. Wound Repair Regen, 2008. **16**(1): p. 23-29.
206. Sondossi M, R.H., Wireman JW. , *Observations of resistance and cross-resistance to formaldehyde and a formaldehyde condensate biocide in Pseudomonas aeruginosa*. Int Biodeterior Biodegrad 1985. **21**: p. 105-106.
207. Annear DI, M.N., Bailey M. , *Instability and linkage of silver resistance, lactose fermentation and colony structure in Enterobacter cloacae*. . J Clin Pathol 1976. **29**(441-443).
208. Hendry AT, S.I., *Silver-resistant Enterobacteriaceae from hospital patients*. Can J Microbiol 1979;**25**:916-921. Can J Microbiol 1979. **25**: p. 916-921.
209. Deshpande LM, C.B., *Plasmid mediated silver resistance in Acinetobacter baumannii*. . Biometals, 1994. **7**: p. 49-56.
210. Du, H., et al., *Systems-level analysis of Escherichia coli response to silver nanoparticles: The roles of anaerobic respiration in microbial resistance*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2012(0).
211. <http://www.epa.gov/iris/subst/0099.htm>.
212. P. L. Drake, K.J.H., *Exposure-Related Health Effects of Silver and Silver Compounds: A Review*. Ann. occup. Hyg., Published by Oxford University Press, 2005. **49**(7): p. 575-585.
213. [www.brita.es](http://www.brita.es).

214. *Silver in Drinking-water. Health criteria and other supporting information.* Guidelines for drinking-water quality. World Health Organization, 1996. **2**.
215. (EFSA), E.F.S.A., *Scientific Opinion on the safety evaluation of the substance, silver zeolite A (silver zinc sodium ammonium alumino silicate), silver content 2 – 5 %, for use in food contact materials.* 2011.
216. [www.aenor.es](http://www.aenor.es).
217. Tappin, A.D., et al., *Dissolved silver in European estuarine and coastal waters.* Water Research. **44**(14): p. 4204-4216.
218. J. Barry Wright, P.K.L., BSc Robert E. Burrell, PhD, *Wound management in an era of increasing bacterial antibiotic resistance: A role for topical silver treatment.* Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology, 1998. **26**(6): p. 572-577.
219. HICPAC. *Recommendations for preventing the spread of vancomycin resistance: recommendation of the Hospital Infection. Control Practices Advisory Committee.* AJIC Am J Infect Control, 1995. **23**: p. 87-94.
220. Margaret Ip, S.L.L., Vicent K. M Poon, Ivan Lug, Andrew Burd, *Antimicrobial activities of silver dressings: an in vitro comparison.* Journal of Medical Microbiology, 2006. **55**: p. 59-63.
221. Lansdown, A.B., *Silver. 2. Toxicity in mammals and how its products aid wound repair.* J Wound Care 2002. **11**: p. 173-177.
222. Samuel, U. and J.P. Guggenbichler, *Prevention of catheter-related infections: the potential of a new nano-silver impregnated catheter.* International Journal of Antimicrobial Agents, 2004. **23, Supplement 1**(0): p. 75-78.
223. [www.vademecum.es](http://www.vademecum.es).
224. Quintana, A., *ANTIBIOTICOS BASES MICROBIOLÓGICAS DEL USO DE ANTIMICROBIANOS.* .
225. D.J. Biedenbach, G.J.M., R.N. Jones, *Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2002).* Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 2004. **50**: p. 59-69.

226. Freire-Moran, L., et al., *Critical shortage of new antibiotics in development against multidrug-resistant bacteria. Time to react is now*. Drug Resistance Updates, 2011. **14**(2): p. 118-124.
227. Bergogne, E., *Treatment and prevention of antibiotic associated diarrhea*. International Journal of Antimicrobial Agents, 2000. **16**(4): p. 521-526.
228. Kao, L.-P., D. Ovchinnikov, and E. Wolvetang, *The effect of ethidium bromide and chloramphenicol on mitochondrial biogenesis in primary human fibroblasts*. Toxicology and Applied Pharmacology. **261**(1): p. 42-49.
229. Harges, J., et al., *Lack of toxicological side-effects in silver-coated megaprotheses in humans*. Biomaterials, 2007. **28**(18): p. 2869-2875.
230. Gosheger, G., et al., *Silver-coated megaendoprotheses in a rabbit model—an analysis of the infection rate and toxicological side effects*. Biomaterials, 2004. **25**(24): p. 5547-5556.
231. *Side effects of silver sulphadiazine*. Burns, 1984. **10**(4): p. 303.
232. Hoekstra, M.J., et al., *Experimental evaluation of side effects of novel silver dressings*. Burns, 2007. **33**(1, Supplement): p. S117-S118.
233. Holtz, R.D., et al., *Nanostructured silver vanadate as a promising antibacterial additive to water-based paints*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, (0).
234. A. M. Smith, H.D., M. N. Rhyner, G. Ruan and S. A. Nie, , *Synthesis of Gold Nanoparticles Bearing the Bioconjugation* Phys Chem Chem Phys, 2006. **8**: p. 3895.
235. Sondi, I. and B. Salopek-Sondi, *Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria*. Journal of Colloid and Interface Science, 2004. **275**(1): p. 177-182.
236. Mirzajani, F., et al., *Antibacterial effect of silver nanoparticles on Staphylococcus aureus*. Research in Microbiology. **162**(5): p. 542-549.
237. Kalishwaralal, K., et al., *Silver nanoparticles impede the biofilm formation by Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus epidermidis*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. **79**(2): p. 340-344.

238. Costa, C., et al., *Antimicrobial silver-montmorillonite nanoparticles to prolong the shelf life of fresh fruit salad*. International Journal of Food Microbiology, 2011. **148**(3): p. 164-167.
239. Guerra, R., et al., *Growth of Escherichia coli and Salmonella typhi inhibited by fractal silver nanoparticles supported on zeolites*. Microporous and Mesoporous Materials. **147**(1): p. 267-273.
240. Quang, D.V., et al., *Preparation of amino functionalized silica micro beads by dry method for supporting silver nanoparticles with antibacterial properties*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. **389**(1-3): p. 118-126.
241. Pucek, R., et al., *The targeted antibacterial and antifungal properties of magnetic nanocomposite of iron oxide and silver nanoparticles*. Biomaterials. **32**(21): p. 4704-4713.
242. Wang, B.-L., et al., *Fast and long-acting antibacterial properties of chitosan-Ag/polyvinylpyrrolidone nanocomposite films*. Carbohydrate Polymers, (0).
243. Bedi, R.S., Cai, Rui, O'Neill, Cory, Beving, Derek E., Foster, Stephen, Guthrie, Sean, Chen, Wilfred, Yan, Yushan, *Hydrophilic and antimicrobial Ag-exchanged zeolite a coatings: A year-long durability study and preliminary evidence for their general microbiocidal efficacy to bacteria, fungus and yeast*. Microporous and Mesoporous Materials. **151**(0): p. 352-357.
244. Matsuura, T., et al., *Prolonged antimicrobial effect of tissue conditioners containing silver-zeolite*. Journal of Dentistry, 1997. **25**(5): p. 373-377.
245. Kaali, P., et al., *Antimicrobial properties of Ag+ loaded zeolite polyester polyurethane and silicone rubber and long-term properties after exposure to in-vitro ageing*. Polymer Degradation and Stability. **95**(9): p. 1456-1465.
246. Hertzberg, R.C. and M.M. MacDonell, *Synergy and other ineffective mixture risk definitions*. Science of The Total Environment, 2002. **288**(1-2): p. 31-42.
247. Park, Y., H.J. Kim, and K.-S. Hahm, *Antibacterial synergism of novel antibiotic peptides with chloramphenicol*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004. **321**(1): p. 109-115.

248. Stepanovic, S., et al., *In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs*. Microbiological Research, 2003. **158**(4): p. 353-357.
249. Rey-Jurado, E., et al., *Synergistic effect of two combinations of antituberculous drugs against Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis. **92**(3): p. 260-263.
250. Kawase, M., et al., *Antimicrobial activity of trifluoromethyl ketones and their synergism with promethazine*. International Journal of Antimicrobial Agents, 2001. **18**(2): p. 161-165.
251. Fadli, M., et al., *Antibacterial activity of Thymus maroccanus and Thymus broussonetii essential oils against nosocomial infection bacteria and their synergistic potential with antibiotics*. Phytomedicine, 2012. **19**(5): p. 464-471.
252. Endo, E.H., et al., *Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against Candida albicans*. Research in Microbiology, 2010. **161**(7): p. 534-540.
253. Serge Ruden, K.H., Marina Berditsch, Parvesh Wadhvani, and Anne S. Ulrich, *Synergistic Interaction between Silver Nanoparticles and Membrane-Permeabilizing Antimicrobial Peptides*. 2009. **53**(8): p. 3358-3540.
254. Lamabam Sophiya Devi, S.R.J., *Antimicrobial and Synergistic Effects of Silver Nanoparticles Synthesized Using Soil Fungi of High Altitudes of Eastern Himalaya*. Mycobiology 2012. **40**(1): p. 27-34.
255. Li Ping, J.L., Changzhu Wu, Qingsheng Wu y Jian Li, *Synergistic antibacterial effects of  $\beta$ -lactam antibiotic combined with silver nanoparticles*. 2005. **16**: p. 1912.
256. Yu-sen e Lin, R.D.V., Janet E. Stout, Victor L. Yu, *Individual and combined effects of copper and silver ions on inactivation of Legionella pneumophila*. Water Research, 1996. **30**(8): p. 1905-1913.
257. Alireza Jafari, M.G.a.S.A., *Synergistic antibacterial effects of nano zinc oxide combined with silver nanocrystales* African Journal of Microbiology Research, 2011. **5**(30): p. 5465-5473.
258. L.Feyen, P.W.A., *Disinfection by-products in swimming pools: minimize or avoid?*

259. Pedahzur, R., H.I. Shuval, and S. Ulitzur, *Silver and hydrogen peroxide as potential drinking water disinfectants: Their bactericidal effects and possible modes of action*. Water Science and Technology, 1997. **35**(11-12): p. 87-93.
260. Cassells, J.M., et al., *Efficacy of a combined system of copper and silver and free chlorine for inactivation of Naegleria fowleri amoebas in water*. Water Science and Technology, 1995. **31**(5(6)): p. 119-122.
261. *Lux report. Nanomaterials state of the market: stealth success, broad impact*.
262. Ahamed, M., AlSalhi, Mohamad S., Siddiqui, M. K. J., *Silver nanoparticle applications and human health*. Clinica Chimica Acta. **411**(23-24): p. 1841-1848.
263. [www.elastoplast.com](http://www.elastoplast.com).
264. [www.curad.com](http://www.curad.com).
265. [es.hartmann.info/](http://es.hartmann.info/).
266. [www.agc-glass.eu](http://www.agc-glass.eu).
267. <http://www.agion-tech.com>.
268. Atiyeh, B.S., Costagliola, Michel, Hayek, Shady N., Dibo, Saad A., *Effect of silver on burn wound infection control and healing: Review of the literature*. Burns, 2007. **33**(2): p. 139-148.
269. Ferreira, L., et al., *Antimicrobial activity of faujasite zeolites doped with silver*. Microporous and Mesoporous Materials, 2012. **160**(0): p. 126-132.
270. Di Nunzio, S., et al., *Silver containing bioactive glasses prepared by molten salt ion-exchange*. Journal of the European Ceramic Society, 2004. **24**(10-11): p. 2935-2942.
271. Mendes, E., et al., *The influence of particle size and AgNO<sub>3</sub> concentration in the ionic exchange process on the fungicidal action of antimicrobial glass*. Materials Science and Engineering: C, 2012. **32**(6): p. 1518-1523.
272. Mo, A., et al., *Preparation and antibacterial effect of silver hydroxyapatite/titania nanocomposite thin film on titanium*. Applied Surface Science, 2008. **255**(2): p. 435-438.
273. Y. Kampmann, E.D.C., S. Kohn, D.K. Patchala, R. Langerock, J. Kreyenschmidt, *Study on the antimicrobial effect of silver-containing inner liners in refrigerators*. Journal of Applied Microbiology, 2008. **104**(6): p. 1808-1814.
274. <http://www.iceomatic.com>.



275. [www.samsung.com](http://www.samsung.com).
276. J.Honman, T.T.y.N.N., *Sterilization of liquid food with silver ion-containing sepiolite*. 1994.
277. Kumar, R. and H. Münstedt, *Silver ion release from antimicrobial polyamide/silver composites*. *Biomaterials*, 2005. **26**(14): p. 2081-2088.
278. Moretro, T., et al., *Antibacterial activity of cutting boards containing silver*. *Food Control*, 2012. **28**(1): p. 118-121.
279. <http://www.kohler.com>.
280. <http://www.odinwear.eu>.
281. Radic, N., et al., *Deposition of silver ions onto DBD and DCSBD plasma treated nonwoven polypropylene*. *Surface and Coatings Technology*, 2012. **206**(23): p. 5006-5011.
282. <http://www.nationalofficefurniture.com>.
283. Gutarowska, B., et al., *Analysis of the sensitivity of microorganisms contaminating museums and archives to silver nanoparticles*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2012. **68**(0): p. 7-17.
284. [wound.smith-nephew.com](http://wound.smith-nephew.com).
285. [www.nanocomposix.com/products/silver](http://www.nanocomposix.com/products/silver).
286. [silverlon.com](http://silverlon.com).
287. Jain, J., et al., *Silver Nanoparticles in Therapeutics: Development of an Antimicrobial Gel Formulation for Topical Use*. *Molecular Pharmaceutics*, 2009. **6**(5): p. 1388-1401.
288. Abou-Okeil, A., Sheta, A. M., Amr, A., Ali, Marwa A., *Wound dressing based on nonwoven viscose fabrics*. *Carbohydrate Polymers*. **90**(1): p. 658-666.
289. Vimala, K., et al., *Fabrication of porous chitosan films impregnated with silver nanoparticles: A facile approach for superior antibacterial application*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **76**(1): p. 248-258.
290. Ma, Z., et al., *Silver nanoparticles decorated, flexible SiO<sub>2</sub> nanofibers with long-term antibacterial effect as reusable wound cover*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2011. **387**(1): p. 57-64.

291. Montazer, M., et al., *Durable antibacterial and cross-linking cotton with colloidal silver nanoparticles and butane tetracarboxylic acid without yellowing*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2011. **89**(0): p. 196-202.
292. Fernández, A., P. Picouet, and E. Lloret, *Cellulose-silver nanoparticle hybrid materials to control spoilage-related microflora in absorbent pads located in trays of fresh-cut melon*. International Journal of Food Microbiology, 2010. **142**(1&€“2): p. 222-228.
293. Juby, K.A., et al., *Silver nanoparticle-loaded PVA/gum acacia hydrogel: Synthesis, characterization and antibacterial study*. Carbohydrate Polymers, 2012. **89**(3): p. 906-913.
294. Yoksan, R. and S. Chirachanchai, *Silver nanoparticle-loaded chitosan-starch based films: Fabrication and evaluation of tensile, barrier and antimicrobial properties*. Materials Science and Engineering: C, 2010. **30**(6): p. 891-897.
295. Lloret, E., Picouet, Pierre, Fernández, Avelina, *Matrix effects on the antimicrobial capacity of silver based nanocomposite absorbing materials*. LWT - Food Science and Technology, 2012(0).
296. Duncan, T.V., *Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrie materials, antimicrobials and sensors*. Journal of Colloid and Interface Science, 2011. **In press**.
297. [http://www.redorbit.com/news/science/419918/sharper\\_image\\_introduces fr esherlongertm\\_miracle\\_food\\_storage\\_containers/](http://www.redorbit.com/news/science/419918/sharper_image_introduces_fr esherlongertm_miracle_food_storage_containers/).
298. bluemoongoods.com.
299. Lv, Y., et al., *Silver nanoparticle-decorated porous ceramic composite for water treatment*. Journal of Membrane Science, 2009. **331**: p. 50-56.
300. Treatment, A.o.N.i.W.W., *Dhermendra K. Tiwari, J. Behari y Prasenjit Sen*. World Applied Sciences Journal 2008. **3**(3): p. 417-433.
301. <http://www.smartsilver.com>.
302. Lorenz, C., Windler, L., von Goetz, N., Lehmann, R. P., Schuppler, M., Hungerbahler, K., Heuberger, M., Nowack, B., *Characterization of silver release from commercially available functional (nano)textiles*. Chemosphere, 2012(0).

303. Hebeish, A., et al., *Highly effective antibacterial textiles containing green synthesized silver nanoparticles*. Carbohydrate Polymers, 2011. **86**(2): p. 936-940.
304. Xue, C.-H., et al., *Superhydrophobic conductive textiles with antibacterial property by coating fibers with silver nanoparticles*. Applied Surface Science, 2012. **258**(7): p. 2468-2472.
305. Savage, N.M.S.D., *Nanomaterials and Water Purification: Opportunities and Challenges*. J. Nanopart. Res., 2005. **7**(4-5): p. 331-342.
306. Schoen, D.T., et al., *High Speed Water Sterilization Using One-Dimensional Nanostructures*. Nano Letters, 2010. **10**(9): p. 3628-3632.
307. Raad, I., et al., *In vitro antimicrobial efficacy of silver iontophoretic catheter*. Biomaterials, 1996. **17**(11): p. 1055-1059.
308. Chiang, W.-C., et al., *Bacterial inhibiting surfaces caused by the effects of silver release and/or electrical field*. Electrochimica Acta, 2008. **54**(1): p. 108-115.
309. Scalzo M, P.M., Simonetti N, Cerreto F., *Antimicrobial activity of electrochemical silver ions in nonionic surfactant solutions and in model dispersions*. J Pharm Pharmacol, 1996. **48**(1): p. 60-63.
310. N Simonetti, G.S., F Bougnol, and M Scalzo, *Electrochemical Ag<sup>+</sup> for preservative use*. Appl Environ Microbiol., 1992. **58**(12): p. 3834-3836.
311. Butkus, M.A., Talbot, Mark, Labare, Michael P., *Feasibility of the silver-UV process for drinking water disinfection*. Water Research, 2005. **39**(20): p. 4925-4932.
312. Liu, L., Liu, Zhaoyang, Bai, Hongwei, Sun, Darren Delai, *Concurrent filtration and solar photocatalytic disinfection/degradation using high-performance Ag/TiO<sub>2</sub> nanofiber membrane*. Water Research, 2011. **46**(4): p. 1101-1112.
313. Ubonchonlakate, K., L. Sikong, and F. Saito, *Photocatalytic disinfection of P.aeruginosa bacterial Ag-doped TiO<sub>2</sub> film*. Procedia Engineering, 2012. **32**(0): p. 656-662.
314. Xiong, Z., et al., *Silver-modified mesoporous TiO<sub>2</sub> photocatalyst for water purification*. Water Research, 2010. **45**(5): p. 2095-2103.

315. Ma, J., et al., *Enhanced inactivation of bacteria with silver-modified mesoporous TiO<sub>2</sub> under weak ultraviolet irradiation*. *Microporous and Mesoporous Materials*, 2011. **144**(1): p. 97-104.
316. [www.nanogist.com](http://www.nanogist.com).
317. [nanohuier.com](http://nanohuier.com).
318. Kanafani, Z.A. and V.G. Fowler Jr, *Staphylococcus aureus Infections: New Challenges from an Old Pathogen*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 2006. **24**(3): p. 182-193.
319. Amorena B, G.E., Monzón M, Leiva J, Oteiza C, Pérez M, *Antibiotic susceptibility assay for Staphylococcus aureus in biofilms developed in vitro*. *J Antimicrob Chemother* 1999. **44**: p. 43-55.
320. E. Gracia, A.L., M. Monzón, J. Leiva, C. Oteiza, B. Amorena., *Application of a Rat Osteomyelitis Model to Compare in Vivo and in Vitro the Antibiotic Efficacy against Bacteria with High capacity to form biofilms*. *Journal of Surgical Research*, 1998. **79**: p. 140-153.
321. Zhang, W.C., et al., *Self-organized formation of silver nanowires, nanocubes and bipyramids via a solvothermal method*. *Acta Materialia*, 2008. **56**(11): p. 2508-2513.
322. Boe-Hansen, R., Albrechtsen, Hans-Jürgen, Arvin, Erik, Jørgensen, Claus, *Bulk water phase and biofilm growth in drinking water at low nutrient conditions*. *Water Research*, 2002. **36**(18): p. 4477-4486.
323. Chen, D., et al., *Convenient synthesis of silver nanowires with adjustable diameters via a solvothermal method*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2010. **344**(2): p. 286-291.
324. *Pearson Education Inc. Publishing as Benjamin Cummings*. 2004.
325. Becerra, M., Páez, Paulina, Laróvere, Laura, Albesa, Inés, *Lipids and DNA oxidation in <i>Staphylococcus aureus</i>, as a consequence of oxidative stress generated by ciprofloxacin*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2006. **285**(1): p. 29-34.
326. Kiley PJ, S.G., *Exploiting thiol modifications*. . *PLoS Biol* 2, 2004. **e400**.

327. Elzbieta Kuzniak, M.S., *Compartment-specific role of the ascorbate–glutathione cycle in the response of tomato leaf cells to Botrytis cinerea infection*. Journal of Experimental Botany, 2005. **56**(413): p. 921-933.
328. Sinnhuber RO, Y.T., *Characterization of the red pigment formed in 2-thiobarbituric acid determination of oxidative rancidity*. Journal Food Sci, 1958. **23**: p. 626-633.
329. Heath RL, P.L., *Photoperoxidation in isolated chloroplasts. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation*. Arch Biochem Biophys, 1968. **125**: p. 180-198.
330. Pelle E, M.D., Padula GA, Kim E-K, Smith WP, *An in vitro model to test relative antioxidant potential: ultraviolet-induced lipid peroxidation in liposomes*. Arch Biochem Biophys, 1990. **283**: p. 234-240.
331. Du Z, B.W., *Modified thiobarbituric assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich plant tissue extracts*. Journal Agric Food Chem, 1992. **40**: p. 1566-1570.
332. DeLong Jm, S.K., *Photosynthetic function, lipid peroxidation and alfa-tocopherol content in spinach leaves during exposure to UV-B radiation*. Can Journal Plant Sci, 1997. **77**: p. 453-459.
333. Mark Hodges, J.M.D., Charles F. Fomey, Robert K. Prange., *Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds*. Planta, 199. **207**: p. 604-611.
334. Pratten, J., et al., *Staphylococcus aureus accessory regulators: expression within biofilms and effect on adhesion*. Microbes and Infection, 2001. **3**(8): p. 633-637.
335. G.C.M, H., *Chromatography in aqueous solution with mineral precipitates insoluble in water. Application to the separation of amino-acids by adsorption on Ag<sub>2</sub>S*. 1945. **39**.
336. Kasuga, N.C., et al., *Light-stable and antimicrobial active silver(I) complexes composed of triphenylphosphine and amino acid ligands: Synthesis, crystal structure, and antimicrobial activity of silver(I) complexes constructed with hard and soft donor atoms*. Inorganica Chimica Acta, 2008. **361**(5): p. 1267-1273.

337. AmandaM Schrand, L.K.B.-S., John J Schlager, Liming Dai, Saber M Hussain, *Can silver nanoparticles be useful as potential biological labels?* Nanotechnology, 2008. **19**: p. 235104.
338. Foldbjerg, R., et al., *PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes.* Toxicology Letters, 2009. **190**(2): p. 156-162.
339. Sadiq, I.M., et al., *Antimicrobial sensitivity of Escherichia coli to alumina nanoparticles.* Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2009. **5**(3): p. 282-286.
340. Bradley, T.J., Fish, F., Parker, M. S., *Interaction of aluminium with bacteria isolated from wounds.* Journal of Pharmacy and Pharmacology, 1965. **17**(S1): p. 98-103.
341. Olsen, E.D., *Métodos ópticos de análisis.* Editorial Reverté.
342. Harold F. Walton, J.R., *Análisis Químico e instrumental moderno.* Editorial Reverté.
343. Landry, B.K., Nadworny, Patricia L., Omotoso, Oladipo E., Maham, Yadollah, Burrell, Jessica C., Burrell, Robert E., *The kinetics of thermal instability in nanocrystalline silver and the effect of heat treatment on the antibacterial activity of nanocrystalline silver dressings.* Biomaterials, 2009. **30**(36): p. 6929-6939.
344. Djokic SS, B.R., *Behavior of silver in physiological solutions.* Soc J Electrochem, 1998. **145**: p. 1426-1430.
345. Klosky, S. and L. Woo, *Solubility of Silver Oxide.* The Journal of Physical Chemistry, 1925. **30**(9): p. 1179-1180.
346. <http://www.dtic.mil/cqi-bin/GetTRDoc?AD=AD0853490>.
347. [www.saltlakemetals.com](http://www.saltlakemetals.com).
348. Katiyar, A., et al., *Synthesis of ordered large pore SBA-15 spherical particles for adsorption of biomolecules.* Journal of Chromatography A, 2006. **1122**(1-2): p. 13-20.
349. Lu Han, H.W., Bo Tu, Dongyuan Zhao, *A facile one-pot synthesis of uniform core-shell silver nanoparticle@mesoporous silica nanospheres.* Chemical Communications, 2011. **47**: p. 8536-8538.

350. Fang Zeng, C.H., ShuizhuWu, Xinxing Liu, Zhen Tong and Shuning Yu, *Silver nanoparticles directly formed on natural macroporous matrix and their anti-microbial activities*. Nanotechnology, 2007. **18**.
351. Chen, A.B., et al., *In situ introduction of dispersed metallic Ag nanoparticles into the channels of mesoporous carbon CMK-3*. Chinese Chemical Letters, 2007. **18**(8): p. 1017-1020.
352. Lindsay, W.L., *Chemical Equilibria in Soil*. John Wiley & Sons. USA, 1979.
353. Sigma-Aldrich, *Material Safety Data Sheet. (3-Aminopropyl)triethoxysilane*. 2011.
354. Xinqing Chen, K.F.L., King Lun Yeung, *Selective removal of chromium from different aqueous systems using magnetic MCM-41 nanosorbents*. Chemical Engineering Journal, 2011. **172**(2-3): p. 728–734.
355. Ananthanarayanan, K., Natarajan, P., *Fabrication and photophysical studies of phenosafranine and proflavine dyes encapsulated in mesoporous MCM-41 along with titanium dioxide nanoparticles*. Microporous and Mesoporous Materials. **124**(1-3): p. 179-189.
356. Zhang, X., et al., *Immobilizing silver nanoparticles onto the surface of magnetic silica composite to prepare magnetic disinfectant with enhanced stability and antibacterial activity*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. **375**(1-3): p. 186-192.
357. Dowling, D.P., et al., *Anti-bacterial silver coatings exhibiting enhanced activity through the addition of platinum*. Surface and Coatings Technology, 2003. **163-164**: p. 637-640.
358. Pakiari A H, J.Z., *Interaction of amino acids with gold and silver clusters*. J. Phys. Chem, 2007. **111** p. 4391-4396.
359. <http://www.samsung.com/latin/consumer/home-appliances/refrigerators/side-by-side/RS20NRSV5/XAP>.
360. Gao, Y., et al., *Silver nanowires with five-fold symmetric cross-section*. Journal of Crystal Growth, 2005. **276**(3-4): p. 606-612.
361. Chen, C., et al., *Study on the growth mechanism of silver nanorods in the nanowire-seeding polyol process*. Materials Chemistry and Physics, 2008. **107**(1): p. 13-17.

362. Carotenuto G., G.P.P., L. Nicolais., *Preparation and characterization of nano-sized Ag/PVP composites for optical applications*. The European Physical Journal B-Condensed Matter and Complex Systems, 2000. **16** (1): p. 11-17.
363. Staples, C.A., et al., *Fate, effects and potential environmental risks of ethylene glycol: a review*. Chemosphere, 2001. **43**(3): p. 377-383.
364. David T. Schoen, A.P.S., Liangbing Hu, Han Sun Kim, Sarah C. Heilshorn, Yi Cui, *High Speed Water Sterilization Using One-Dimensional Nanostructures*. Nano Letters, 2010. **10**: p. 3628–3632.
365. [encyclopedia2.thefreedictionary.com/Aqua+Regia](http://encyclopedia2.thefreedictionary.com/Aqua+Regia).
366. Narai, A., S. Arai, and M. Shimizu, *Rapid decrease in transepithelial electrical resistance of human intestinal Caco-2 cell monolayers by cytotoxic membrane perturbants*. Toxicology in Vitro, 1997. **11**(4): p. 347-354.
367. Roha Kasra Kermanshahi, M.R.S., *Effect of static electric field treatment on multiple antibiotic-resistant pathogenic strains of Escherichia coli and Staphylococcus aureus*. Journal Microbol Immunol Infect, 2005. **38**: p. 394-398.
368. <http://www.sigmaaldrich.com/spain.html>.
369. <http://drxp.info/glosario/>.
370. <http://dehistology.blogspot.com/2011/06/electron-microscopy.html>.
371. zur Wiesch, P.A., et al., *Population biological principles of drug-resistance evolution in infectious diseases*. The Lancet Infectious Diseases. **11**(3): p. 236-247.
372. Bayles, K.W., *The bactericidal action of penicillin: new clues to an unsolved mystery*. Trends in Microbiology, 2000. **8**(6): p. 274-278.
373. S.M Swaney, H.A., M.C Ganoza, D.L Shinabarger, *The oxazolidinone linezolid inhibits initiation of protein synthesis in bacteria*. . Antimicrob. Agents Chemother, 1998. **42**: p. 3251-3255.
374. D.L Shinabarger, K.R.M., R.W Murray, A.H Lin, E.P Melchior, S.M Swaney, D.S Dunnyak, W.E Demyan, J.M Buysse, *Mechanism of action of oxazolidinones: effects of linezolid and eperezolid on translation reactions*. Antimicro Agents Chemother, 1997. **41**: p. 2132-2136.



375. J.R Colca, W.G.M., D.J Waldon, L.M Thomasco, R.C Gadwood, E.T. Lund, G.s Cavey, W.R Mathews, L.Adams,, *Cross-linkin in the living cell locates the site of action of oxazolidinone antibiotics*. J Biol Chem, 2003. **278**: p. 21972-21979.