



## CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y SU EFECTO SOBRE *E.coli*.

Marina Olivia Franco Hernández<sup>a</sup>, C. María del Socorro Camargo Sánchez<sup>a</sup>, Faviola Rivas Hernández<sup>a</sup>, Ariel Guzmán Vargas<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Instituto Politécnico Nacional- UPIBI. Av. Acueducto S/N Col. Barrio La Laguna Ticomán. Gustavo A. Madero, México D.F. CP 07340. mofrancoh@ipn.mx, qfbsoco@yahoo.com.mx, faviolarivashdz@gmail.com

<sup>b</sup> Instituto Politécnico Nacional- ESIQIE. Unidad Profesional Adolfo López Mateos. Col. Lindavista. Gustavo A. Madero México D.F., C.P. 07738 gvariel@hotmail.com

### RESUMEN

Los nanomateriales están definidos con tamaños a nanoescala, o que poseen estructura interna a nanoescala. El intervalo de estos valores se considera que va de 1 a 100 nm. En la actualidad se ha reportado que las nanopartículas de plata (AgNP) pueden ser utilizadas como agentes antimicrobianos, aunque todavía no hay reportes que indiquen las condiciones para controlar el tamaño y la estabilidad de las nanopartículas a través del tiempo. En el presente trabajo se sintetizaron nanopartículas de Ag con citrato de sodio (Baker) y  $\text{AgNO}_3$  (Sigma-Aldrich). Se mezclaron diferentes concentraciones de plata 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45 y 0.5 mM, con 1.25 mL de solución de citrato de sodio. Cada mezcla se calentó a punto de ebullición durante 15 minutos. Las AgNPs obtenidas fueron caracterizadas con imágenes de Microscopía Electrónica de Transmisión y Barrido (TEM) y Microscopía de Fuerza Atómica (AFM). Los resultados demostraron que el tamaño de partícula fue entre 2 y 10 nm. La longitud de onda máxima de las soluciones de AgNPs fue de 425, valor reportado en la literatura y la estabilidad fue de 5 meses. Estas soluciones se probaron con una cepa de *E. coli* y las que mostraron resultados de inhibición del 100% del crecimiento fueron las de 0.4mM y concentraciones superiores. En este caso la concentración mínima inhibitoria fue de 0.4mM.

### 1. INTRODUCCIÓN.

Las nanopartículas de metales se han usado como biocidas, se tienen algunas referencias como por ejemplo. Guerra (2013) trabajó con nanopartículas de plata y de oro que fueron dispersados en TS-1 silicato con un bajo contenido de titanio, estos materiales fueron evaluados como biocidas para *E.coli* y *Salmonella typhi* resultando eficientes en la eliminación de los microorganismos presentes en el medio nutritivo.

Se han utilizado nanopartículas de plata en soportes de zeolitas como biocidas e inhibidores del crecimiento de patógenos como *Escherichia coli* y *Salmonella typhi* obteniendo buenos resultados (Guerra y cols., 2012), también se han utilizado soportes de silicalita que es una combinación de compuestos de silicón y titanio para plata y oro (20).

Otro material utilizado como biocida es el HKUST-1 metal-estructura orgánica (MOF), el cual fue probado como antifúngico, resultando efectivo contra *Saccharomyces cerevisiae* encontrando actividad antifúngica altamente eficiente y con respecto a *Geotrichum candidum*, se encontró una reducción en el crecimiento de  $6.16$  a  $1.29$  UFC $\text{ml}^{-1}$  después de 48 horas de incubación. La acción



antifúngica fue relacionada con los iones de cobre en el medio de cultivo, debido a una degradación cristalina del material involucrado en la formación de superficie extra-base Cu (I), los iones cobre interrumpen el transporte de nutrientes e inhiben la actividad enzimática. (Chiericatti, 2012)

**2. TEORÍA.** Actualmente hay muchos trabajos de investigación en el tratamiento de aguas enfocados al uso de nanopartículas, esto trae como consecuencia disminución de costos en el proceso, además de dar solución a problemas ambientales, dando lugar a propuestas de tratamientos diferentes a los convencionales. El objetivo del presente trabajo fue preparar y caracterizar nanopartículas de plata (AgNPs) a diferentes concentraciones y probar su efectividad en coliformes fecales, teniendo como especie de estudio a *Escherichia coli*.

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

En el presente trabajo se sintetizaron nanopartículas de Ag con citrato de sodio (Baker) y  $\text{AgNO}_3$  (sigma-aldrich). Se mezclaron diferentes concentraciones de plata 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45 y 0.5 mM, con 1.25 ml de solución de citrato de sodio. Cada mezcla se calentó a punto de ebullición durante 15 minutos. Para caracterizar las nanopartículas se realizó un análisis por U.V – VIS el equipo que se utilizó fue un espectrofotómetro GBC Cintra 10e y se hizo un barrido de 200 a 800 nm, la microscopía TEM (Microscopía Electrónica de Transmisión) se realizó con el microscopio JEOL JEM-2010 Electron Microscope del Centro de Nanociencias y Nanomateriales del IPN y AFM (Microscopía de Fuerza Atómica) para esta última se utilizó un SPM (Scanning Probe Microscope) marca Digital Instruments ubicado en la UAM Azcapotzalco.

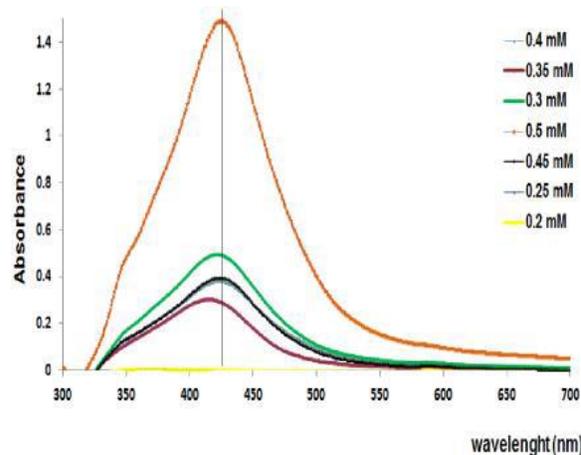
Evaluación de la concentración mínima inhibitoria de las nanopartículas. Se prepararon 100 mL de caldo nutritivo (se pesaron 4.0 g de caldo nutritivo y se llevaron a 500 mL con agua), se inoculó una asada de *E. coli*, la cual fue proporcionada por el laboratorio de microbiología industrial de la ENCB, se dejó agitando durante dos horas (agitación 120 rpm) a una temperatura de 35-37 °C. Pasadas dos horas se colocaron 9 mL del cultivo anterior en diferentes tubos, a cada tubo se le adicionaron 1 mL de la solución de nanopartículas en concentraciones de 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45, 0.5 mM de solución de nitrato de plata (esto se hizo por duplicado). De cada uno de los tubos anteriores se tomó 1ml para sembrar en caja petri por separado con agar nutritivo (esto se realizó por triplicado). Se leyó la absorbancia de los tubos a 600 nm de longitud de onda, se utilizó como blanco una mezcla medio de cultivo y solución de nanopartículas.

**4. RESULTADOS.** Los resultados demostraron que con la técnica de Turkevich, pueden formarse las nanopartículas de plata (AgNPs). La primer evidencia fue la coloración amarilla dorada, tal como se puede observar en la figura 3a, 3b y 3c. La intensidad de la coloración depende de la concentración de plata en la solución.

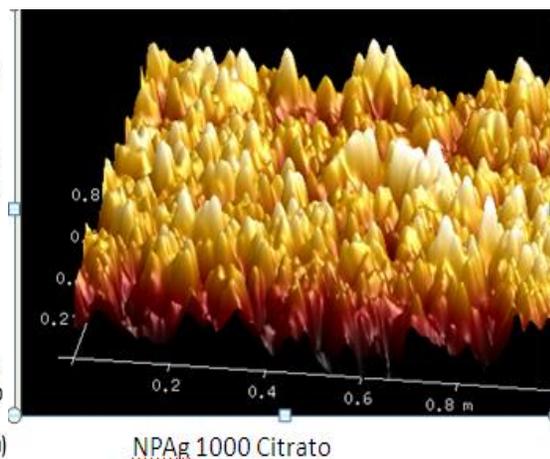
Con cada solución de AgNPs, se realizó un barrido en la región ultravioleta visible para conocer la longitud de onda máxima, la cual resultó de 428 nm, tal como lo mencionan Xihui y cols., 2014. Ver figura 2. En la figura 3., podemos observar que el tamaño de las AgNPs no sobrepasa los 10 nm de acuerdo a la técnica de AFM.



**Figura 1.** Técnica con citrato y diferentes concentraciones de  $\text{AgNO}_3$ . a) y b) solución de nanopartículas utilizando 0.45 y 0.5 mM de  $\text{AgNO}_3$  respectivamente, c) solución de nanopartículas con concentraciones de 0.2 mM a 0.45 mM de  $\text{AgNO}_3$ .



**Figura 2.** Espectro UV-VIS para las soluciones de AgNPs, utilizando diferentes concentraciones de  $\text{AgNO}_3$



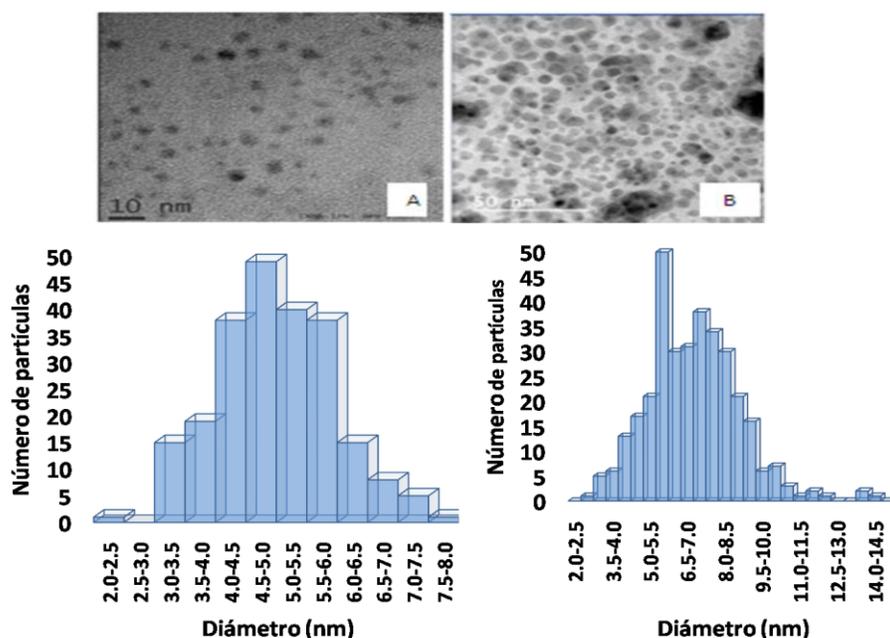
**Figura 3.** Imagen microscopia fuerza atómica (AFM) para AgNPs 0.45mM

En la figura número 4, podemos observar las imágenes TEM de las AgNPs para las soluciones con concentración 0.35 y 0.45 mM. Se cuantificaron los tamaños de partícula y se realizó el análisis estadístico, obteniendo un comportamiento de distribución gaussiana. En el caso de la solución con concentración 0.35 mM, el diámetro de las AgNPs, osciló entre tres y 8 nm. El mayor número de partículas, presentó un tamaño de 4.5 a 5 nm. En el caso de la solución con 0.45 mM de  $\text{AgNO}_3$ , la distribución del tamaño de partículas estuvo entre 2 y 14.5 nm de diámetro. Sin embargo el mayor número de partículas presentó un diámetro de 5 a 5.5 nm.



En general se revisaron todas las soluciones y se pudo observar que con este método la mayor cantidad de AgNPs presentan un diámetro entre 4.5 y 5.5 nm. Un porcentaje menor al 4% presentaron diámetros entre 8 y 14.5 nm, asimismo un porcentaje menor al 2% presentaron valores a 3 nm.

Las coloraciones y tamaños se monitorearon mensualmente durante 6 meses y se observó que presentaron una estabilidad de 5 meses, posteriormente formaron precipitados.

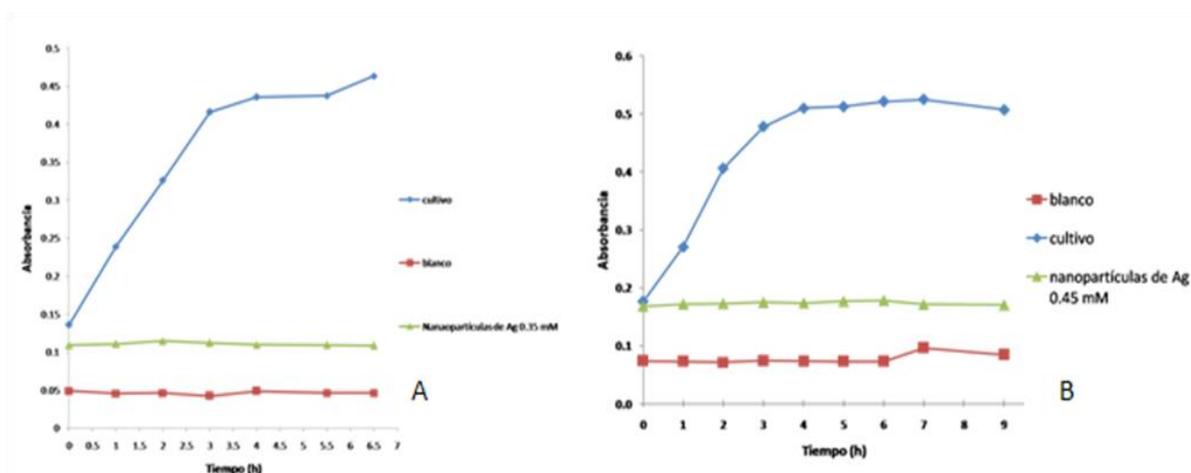


**Figura 4.** Imagen de las AgNPs por microscopía electrónica de transmisión (TEM) y distribución del tamaño de partículas (A.- 0.35 y B.- 0.45 mM de AgNO<sub>3</sub>)

Las soluciones que presentaron un efecto bactericida reproducible fueron las de 0.35mM y 0.45mM, por lo que se eligieron para probarlas en una cinética de crecimiento de la cepa de *Escherichia coli*. Los resultados fueron parecidos a lo demostrado por Guerra (2013). La cinética se realizó con tres matraces erlemeyer conteniendo 300 mL de caldo nutritivo, dos se inocularon con la cepa de *E. coli*, y solo en un matraz se adicionaron 10 mL de AgNps (se realizó por triplicado). Las muestras se tomaron a las 12 h la primera y después cada hora durante las siguientes 7 horas, registrándose la absorbancia. No se obtuvo crecimiento en el blanco y en el cultivo con AgNPs. En el cultivo control se obtuvo una absorbancia máxima de 0.5 a 0.55, que es donde se presentó la fase estacionaria de *E. coli* (figura 5). El blanco presentó una absorbancia de 0.05 debida a la propia turbidez del medio. En los cultivos con inóculo de *E. coli* y AgNPs se observó una absorbancia mayor que el blanco (0.15), esta fue debida al inóculo de la cepa bacteriana, ya que al morir, los desechos celulares quedan en el medio produciendo turbidez y por lo tanto un valor de absorbancia.



Con lo anterior quedó demostrado que desde que las AgNPs tienen contacto con la cepa de *E. coli*, inhiben su crecimiento, eliminándolas ya que al sembrar en placa con agar nutritivo no se obtuvo ningún crecimiento.



**Figura 5.-** Cinética de crecimiento para *E. coli*, control en ausencia ( $\diamond$ ) y en presencia de nanopartículas ( $\Delta$ ), blanco ( $\square$ ) para 0.35 mM (A) y 0.45 mM (B)

## 5. CONCLUSIONES

Se obtuvieron las AGNPs con el método del citrato de sodio, se pudo verificar con las técnicas de UV-VIS, TEM y AFM, comprobando que la distribución del tamaño de partícula fue menor a los 10 nm y la mayor población estuvo entre 4 y 6 nm.

La estabilidad de las AgNPs fue de 5 meses.

Las AgNPs en concentraciones de 0.35 y 0.45 mM exhiben una buena actividad antimicrobiana sobre *E. coli*.

La actividad antimicrobiana en cultivo líquido de *E. coli*, se observó desde la primer hora de la cinética de crecimiento.

## BIBLIOGRAFÍA

1. R. Guerra. **2013**. Antimicrobial supported nanoparticles: Gold versus silver for the cases of Escherichia coli and Salmonella typhi. *Microporus and Mesoporus Materials* **170**, 62-66,.
2. R. Guerra, E. L. M. V. A. G. V. L. **2012**. Growth of Escherichia coli and Salmonella typhi inhibited by fractal silver nanoparticles supported on zeolites, *Microporus and Mesoporus Materials* **147**, 267-273.
3. C. Chiericatti. **2012**. Novel application of HKUsT-1 metal organic framework as antifungal: Biological test and physicochemical characterizations, *Microporus and Mesoporus Materials* **162**, 60-63.
4. Z. Xihui, e. a. **2014**. Microwave-assisted synthesis of silver nanoparticles using sodiualginate and their antibacterial activity, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* **444** (*Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 444 (2014) 180– 188), 180-188.