



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA

**Estudio de la actividad antimicrobiana
de compositos de M-TiO₂-AuNP**

T E S I S

Que para obtener el título de
LICENCIADA EN TECNOLOGÍA

P R E S E N T A

Paulina Govea Alvarez

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Padmavati Sahare

Co-asesor: Dr. Sujay Paul



Juriquilla, Qro., 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Mi gratitud

*A mi familia, mis padres por apoyarme en cada etapa de mi vida que sin ellos
no estaría hasta donde estoy ahora.*

*A mis amigos, por su gran apoyo y por su ayuda en afirmar mis
conocimientos multidisciplinarios.*

*A mis maestros por su tiempo en instruirme, haciéndome cada vez más
conocedora del mundo que me rodea.*

*A la UNAM, por sus facilidades y la educación de alto nivel, por permitirme
estudiar en la máxima casa de estudios de México.*

RESUMEN

Se sabe que la titania mesoporosa tiene propiedad antibacterial y que su tamaño de poro está correlacionado con su respuesta antimicrobial. Por otro lado, las nanopartículas de oro no presentan como tal una buena respuesta antimicrobial, sin embargo, funcionan como buenos agentes acarreadores de fármacos, generando una mejor respuesta antimicrobial al combinar ambos materiales. En este proyecto se sintetizó un compuesto titania mesoporosa-nanopartículas de oro para ser caracterizado, por ser un nuevo material, y para analizar la eficiencia antimicrobial en contraste con otros estudios que presentan otro tipo de morfologías del material de titania. Se encontró que los materiales compuestos por M-TiO₂-AuNP, independientemente de la concentración de AuNP, tuvieron una buena respuesta antimicrobiana. Se analizó, sólo con propósito de comparación, el material por medio de un análisis antifúngico, no obteniendo un resultado significativo que mostrara tal actividad antifúngica. Más análisis se proponen para su posterior estudio del por qué no se observó tal cambio. Cabe recalcar que al haber más estudios con diferentes microorganismos y variando la concentración, se pudo verificar la eficiencia de los materiales compuestos.

Faltan más estudios de optimización del material, variando el medio tal como el pH, la temperatura, así como la estabilidad del compuesto después de un periodo determinado de tiempo.

PALABRAS CLAVE: Titania mesoporosa, Nanopartículas de oro, antimicrobial.

ABSTRACT

It is known that mesoporous titania has antibacterial properties and that their pore size is correlated with the antimicrobial response. In other hand, gold nanoparticles do not present such efficient antimicrobial response, however, they can be very helpful as drug carriers, increasing the antimicrobial response when they are mixed with the mesoporous titania. In this project nanocomposites of mesoporous titania -gold nanoparticles were synthesized to be characterized, for being a new material, and to analyze the antimicrobial efficient response in comparison with other mesoporous titania material's morphologies presented in other articles. It was found that the compose materials by M-TiO₂-AuNP, independently of the AuNP's concentration, showed a great antibacterial response. The material was analyzed, just for comparison purposes, via antifungal analysis. In this matter we did not find any significant outcome that showed such antifungal activity. More analysis are proposed for further examination to know why it was not observed such antifungal behavior. It is worth mention than these further studies with different microorganisms and by varying the concentration, efficiency of the composite materials could be verified.

More studies of optimization of the material are needed to fully characterize it, varying the medium such as pH, temperature, as well as the stability of the compound after a certain period of time.

KEY WORDS: Mesoporous titania, gold nanoparticles, antimicrobial.

CONTENIDO

DEDICATORIAS
RESUMEN
ABSTRACT
INTRODUCCIÓN
OBJETIVOS

ÍNDICE

CONTENIDO.....	4
INTRODUCCIÓN.....	8
OBJETIVOS	11
CAPÍTULO 1. CONCEPTOS BÁSICOS	12
<i>MARCO TEÓRICO</i>	12
1.1 Biomateriales.....	12
1.2 Uso de biomateriales en implantes.....	13
1.3 Infecciones Asociadas a Biomateriales (BAI).....	14
1.4 Titania mesoporosa (M-TiO ₂).....	16
1.4.1 Propiedades. Biocompatibilidad.....	18
1.5 Nanopartículas de oro (AuNP).....	19
1.5.1 Propiedades. Biocompatibilidad.....	20
1.6 Caracterización de materiales	20
1.6.1 Espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV-Vis).....	21
1.6.2 Microscopía de Escaneo Láser Confocal (CLSM).....	22
1.6.3 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	23
1.6.4 Difracción de Rayos X (DRX)	24
1.6.5 Análisis Termogravimétrico (TGA).....	24
1.6.6 Método Brunauer, Emmett y Teller (BET).....	24
1.7 Proceso de liofilización	28
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
2.1 Síntesis verde de nanopartículas de oro (AuNP) usando hojas de toronjil (<i>Melissa officinalis</i>)	29
2.2 Síntesis verde de nanopartículas de plata (AgNP) usando <i>Melissa officinalis</i>	29
2.3 Síntesis de titania mesoporosa (M-TiO ₂)	30
2.4 Síntesis del composito de titania mesoporosa -nanopartículas de oro (M-TiO ₂ -AuNP)	32
2.5 Caracterización de los materiales.....	34
2.5.1 Caracterización por microscopía de escaneo láser confocal (CLSM).....	34
2.5.2 Caracterización por espectroscopía UV-Visible.....	34
2.5.3 Caracterización por microscopía electrónica de barrido (SEM).....	35
2.5.4 Caracterización por difracción de Rayos X (DRX).....	35
2.5.5 Análisis Termogravimétrico (TGA).....	35
2.5.6 Método de análisis BET (Brunauer, Emmet, Teller)	36
2.6 Tratamiento de liofilización a nanopartículas.....	36
2.7 Pruebas antimicrobiales. Ensayos en placa.....	38
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
3.1 Caracterizaciones por microscopía de escaneo láser confocal (CLSM)	39
3.2 Caracterizaciones por espectroscopía UV-Visible	40
3.3 Caracterización por microscopía electrónica de barrido (SEM).....	43
3.4 Caracterizaciones por difracción de rayos X (DRX).....	44
3.5 Análisis Termogravimétrico (TGA).....	46
3.6 Método de análisis BET (Brunauer, Emmett, Teller)	49
3.7 Ensayos de Placa	51

CONCLUSIONES	55
AGRADECIMIENTOS	58
REFERENCIAS.	59

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1 Clases de biomateriales. Tabla traducida de Pişkin (1995).</i>	12
<i>Tabla 2 Criterios para la selección de biomateriales. Tabla traducida de Pişkin (1995).</i>	12
<i>Tabla 3 Ventajas y desventajas de realizar una liofilización de acuerdo a la FDA</i>	28
<i>Tabla 4 Datos BET obtenidos de la muestra de titania mesoporosa</i>	50
<i>Tabla 5 Actividad antibacterial y antifúngica que mostraron algunos de los 6 distintos materiales utilizados en cada una de las cepas</i>	54

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1 Mapa mundial del mercado de implantes médicos entre los años del 2020 – 2025. Figura modificada de Mordor Intelligence.</i>	13
<i>Figura 2 Plasmones de resonancia de nanopartículas de metales nobles (Ag, Au) generado por el componente del campo eléctrico de la luz entrante. Ilustración modificada de Zielińska-Jurek (2014).</i>	21
<i>Figura 3 Diagrama de rayos de un microscopio electrónico de barrido. Ilustración modificada de SubsTech, traducida al español.</i>	23
<i>Figura 4 Clasificación de la IUPAC de isothermas de fisisorción. Imagen modificada de la original, traducida al español.</i>	26
<i>Figura 5 Clasificación de la IUPAC para los ciclos de histéresis. Imagen modificada de la original, traducida al español.</i>	27
<i>Figura 6 Caja de guantes del Centro de Geociencias en el laboratorio de Geoquímica de Aguas.</i>	31
<i>Figura 7 Muestra de M-TiO₂ por triplicado con 3 distintos volúmenes de AuNP: P1 con 1mL, P2 con 2.4mL y P3 con 4mL.</i>	33
<i>Figura 8 Preparación de la mezcla de M-TiO₂-AuNP en un a) vaso de precipitado con 200mg de M-TiO₂ (calcinada a 560°C) con 1mL de AuNP y b) sobre el agitador orbital del laboratorio de polímeros del Dr. Josué D. Mota Morales.</i>	34
<i>Figura 9 Muestras de AuNP y AgNP sintetizadas previo a su liofilización. Volumen de las muestras: 250mL</i>	36
<i>Figura 10 Muestra de AuNP después de un día de liofilización, apunto de secarse completamente. Equipo del laboratorio B-02 del Dr. Manuel Aguilar en el INB.</i>	37
<i>Figura 11 Muestra de AuNP donde a) muestra de AuNP previo a la liofilización tras haber sido congelada con ayuda de hielo seco y acetona b) misma muestra después de haber sido liofilizada.</i>	37
<i>Figura 12 Imágenes de CLSM de las nanopartículas de oro (AuNP) donde a) se presenta una de las distancias recorridas por el láser durante el escaneo y la emisión en ese plano (verde, metal) y b) donde se muestra la misma imagen pero editada con el filtro negativo para proporcionar una mejor visualización de las nanopartículas en estado coloidal. La escala es de 10um, mostrando el pequeño tamaño del diámetro de las AuNP.</i>	39
<i>Figura 13 Espectros de las nanopartículas de oro diluidas con 950uL de agua destilada y 50uL de la solución a) sin sonicar y b) sonicadas por una sono-punta.</i>	40
<i>Figura 14 Espectros obtenidos de la caracterización por espectroscopia UV-Vis de las nanopartículas de plata (AgNP) a) no lavadas y</i>	41

<i>Figura 15 Espectros de UV-Vis obtenidos de titania mesoporosa sintetizada sin nanopartículas y la titania mesoporosa sintetizada con 1, 2.5 y 4mL de AuNP.</i>	<i>42</i>
<i>Figura 16 Imágenes en SEM de la titania mesoporosa sintetizada a 100°C a un enfoque de a) 5,000x con un detector de electrones secundarios a alto ángulo (LEI) y b) 40,000x con un detector de electrones secundarios de bajo ángulo (SEI), y en dos locaciones distintas dentro del material mesoporoso.</i>	<i>43</i>
<i>Figura 17 Difractogramas correspondientes de las muestras de M-TiO₂ sintetizada a 100°C (M-TiO₂_Sin; línea negra) y M-TiO₂ calcinada a 560°C (M-TiO₂_Cal; línea roja).</i>	<i>44</i>
<i>Figura 18 Difractogramas correspondientes de las muestras de M-TiO₂ sintetizada a 100°C (M-TiO₂; línea negra) y composito de M-TiO₂-AuNP sintetizado por el primer método (M-TiO₂-AuNP; línea azul).</i>	<i>45</i>
<i>Figura 19 Termogramas de (a,c) nanopartículas de oro y (b,d) nanopartículas de plata.</i>	<i>48</i>
<i>Figura 20 Isotermas de fisisorción de N₂ de la muestra de titania mesoporosa (M-TiO₂). La línea roja muestra la adsorción del gas sobre la superficie del material a diferentes presiones relativas. La línea azul representa la desorción de los mismos átomos adsorbidos sobre la muestra.</i>	<i>49</i>
<i>Figura 21 Diagrama de distribución de tamaño de poro de la muestra de titania mesoporosa (M-TiO₂).</i>	<i>50</i>
<i>Figura 22 Ensayo en placa de las diferentes cepas bacterianas de E. Coli dispuestas en 3 placas de Petri con nombres: 39G, 73 y 25. Cada placa de Petri contiene pequeñas cantidades los 6 tipos diferentes de nanomateriales en el disco como se resume:</i>	<i>51</i>
<i>Figura 23 Cajas de Petri con la cepa bacteriana de Citrobacter con los 6 tipos diferentes de materiales:</i>	<i>52</i>
<i>Figura 24 Placas de Petri (34G Azul y 33 Azul) con la cepa bacteriana de Klebsiella y las 6 muestras de materiales sintetizados:</i>	<i>52</i>
<i>Figura 25 Placas de Petri con la cepa del hongo Trichoderma con las 6 muestras de materiales:</i>	<i>53</i>
<i>Figura 26 Placas de Petri con la cepa del hongo Fusarium con las 6 muestras de materiales: .</i>	<i>53</i>

INTRODUCCIÓN.

La nanotecnología es el diseño, fabricación y aplicación de nanoestructuras o nanomateriales, y la fundamental comprensión de las relaciones entre propiedades físicas o fenómenos y las dimensiones del material¹. La primera persona que introdujo el concepto o idea de la nanotecnología fue el Dr. Richard Feynman en una de sus pláticas en el Instituto Tecnológico de California (Caltech) llamada “There’s plenty of room at the bottom” en 1960 (Feynman, 1960)^a; sin embargo, no fue hasta 1981 que hubo un crecimiento en el número de investigaciones y aplicaciones de la nanotecnología en la vida actual. A partir de ese entonces, el crecimiento del uso de la nanotecnología fue exponencial y actualmente una de las áreas que más resaltan es el campo de la nanotecnología aplicada a la medicina.

La Metrología y la Normalización de la Nanotecnología² ha establecido que un nano-objeto es un pieza discreta de material con una, dos o tres dimensiones comprendidas dentro o fuera de la nanoescala (entre 1-100 nanómetros (nm)). Las nanopartículas están consideradas como nanoestructuras cero-dimensionales, significando que toda su estructura está dentro de la escala nano (entre 1nm-100nm). Por otro lado, los materiales mesoporosos, a manera de un conjunto completo, se consideran dentro del rango superior a los 100nm, sin embargo, sus poros interiores podrían estar dentro de la nanoescala, siendo así considerados estos materiales como nanomateriales especiales¹; el término “mesoporoso” viene dado por el diámetro del poro (d) el cual está entre los $2\text{nm} < d < 50\text{nm}$.

El dióxido de titanio, titania, o TiO_2 , ha sido uno de los óxidos metálicos más utilizados en las áreas de óptica, energía y campos relacionados debido a su gran capacidad fotoeléctrica. Además, tiene un bajo costo de producción, buena estabilidad térmica y puede ser biocompatible. Si ésta es sintetizada como nanopartícula de titania (TiO_2 NP), se ha demostrado que puede llegar a ser biocompatible si se evita lo siguiente: que el tamaño de diámetro sea mayor a 10nm, que la titania esté en fase rutilo y no en anatasa, puesto que ésta última es 100 veces más tóxica, y que se encuentre en concentraciones dentro del cuerpo, por debajo de los 100mg/ml^3 . Sin embargo, esto sólo ha sido reportado para nanopartículas de titania, no para la titania mesoporosa en sí.

^a Feynman, R. (1960, Febrero 1). There's Plenty of Room at the Bottom. Recuperado el 24 de enero, 2020, de: <http://calteches.library.caltech.edu/1976/>

De hecho, hay estudios realizados con M-TiO₂ que demuestran la gran aplicación de ésta en el área biológica, tal como usarlo como detector cuantitativo y cualitativo de varias biomoléculas, como proteínas o marcadores tumorales, al ser empleado como sistema de liberación de fármacos debido a su particularidad de tener sitios superficiales, poros, para dar la posibilidad de una funcionalización más sencilla. Para el caso de dar uso de una funcionalidad antimicrobiana, que es el principal objetivo de este proyecto, la titania mesoporosa es uno de los mejores materiales que exhiben tal propiedad de acuerdo con varios artículos. Uno de ellos es el estudio realizado por Atefyekta *et. al.* (2016) el cual demostró que al utilizar titania mesoporosa en forma de películas delgadas puede reducir significativamente las infecciones asociadas a implantes. Demostraron que las películas mostraban propiedades deseables en reducir la fijación bacteriana y que esta reducción también se veía afectada en función al tamaño de poro. Además, en este estudio incluyeron la utilización de agentes antimicrobianos para evaluar su efectividad de inhibir la formación de colonias bacteriana. Se observó que la carga de antibióticos mejora el comportamiento antimicrobiano para todas las superficies y el efecto se correlacionó de buena manera con la cantidad del fármaco liberado⁴.

Para el caso de las nanopartículas de oro, o AuNP, éstas cuentan con varias propiedades que le proporcionan ser uno de los nanomateriales más utilizados en varias aplicaciones, especialmente en el campo médico ya que cuenta con la propiedad de ser biocompatible expuesto por Shukla *et. al.* (2005) remarcando que las nanopartículas presentan no toxicidad, inmunogenicidad y alta permeabilidad en los tejidos sin obstaculizar la funcionalidad celular⁵. Para esto, las nanopartículas deben cumplir con ciertos rubros como que éstas sean de un tamaño mayor a 10nm, que se encuentren en concentraciones bajas dentro del cuerpo y que sean estables al ser funcionalizadas, esto quiere decir que no cambien su manera de reaccionar al ser introducida en el cuerpo, tal como que la formación de una biocorona de proteínas afecte su funcionalidad y genere efectos secundarios. Uno de los usos más comunes que se les da a las AuNP es que se utilizan como acarreadores de medicamentos, teniendo así una entrega más controlada en un área específica del cuerpo⁶. Pero, ¿éstas tienen alguna propiedad que les haga exhibir una respuesta antimicrobiana? Las nanopartículas de oro en este tipo de aplicaciones antimicrobianas no tienen como tal un buen impacto, se ha visto que tienen poca actividad bactericida y pueden ser débiles incluso a altas concentraciones⁷. Sin embargo, como se mencionó antes, las AuNP pueden actuar como

portadores o vehículos de entrega de antibióticos, mejorando así el efecto bactericida de los antibióticos.

Habiendo introducido lo anterior y queriendo dar un primer paso en el desarrollo de un proyecto de investigación en esta área médica, al unir estos 2 nanomateriales, cada uno con sus respectivas propiedades, se quiere sintetizar un nano-composito de AuNP en M-TiO₂ por medio de síntesis verde y alcóxidos, respectivamente, para ser utilizado en posibles bioaplicaciones, más específicamente para observar si se mejora su capacidad antimicrobial de la previamente ya datada en algunos artículos, siendo así más eficiente.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Generar un nanocomposito de titania mesoporosa (M-TiO₂) con nanopartículas de oro (AuNP) para poder evaluar su respuesta antimicrobial.

Objetivos Específicos

- Sintetizar y caracterizar por separado la M-TiO₂ y las AuNP, cada uno con su respectivo método de síntesis. Síntesis de alcóxidos para la M-TiO₂ y síntesis verde para las AuNP.
- Aplicar el nanocomposito, la M-TiO₂ y las AuNP en material biológico, más específicamente a 3 diferentes cepas de bacterias y 2 cepas de hongos por medio de ensayos en plana para así poder observar su actividad antimicrobial.
- Evaluar la respuesta antimicrobial de nanocomposito respecto a las otras muestras de M-TiO₂ y AuNP originales.

CAPÍTULO 1. CONCEPTOS BÁSICOS

MARCO TEÓRICO

1.1 Biomateriales

Existen numerosas definiciones de lo que es un biomaterial, sin embargo, la más aceptada hoy en día y la más actualizada es la proveída por Hasirci & Hasirci (2018): “Sustancias implantadas o utilizadas en conjunto con el cuerpo, diseñadas para obtener propiedades similares a la del sistema biológico, ser estables para el uso deseado, tener niveles adecuados de bioactividad, y diseñadas para cumplir total o parcialmente las funciones de órganos y tejidos enfermos, dañados o con mal funcionamiento”⁸. Hoy en día, los biomateriales de acuerdo con esta definición van en aumento al ser utilizados más comúnmente como dispositivos médicos, jugando un papel clave en el tratamiento de dolencias, siendo destinados a sustituir, y en algunos casos restaurar, la función biológica⁹. Existen varias clases de biomateriales. En la Tabla 1 se muestran algunas de las más comunes¹⁰.

TABLA 1 CLASES DE BIOMATERIALES. TABLA TRADUCIDA DE PIŞKIN (1995).

<i>Clases</i>	<i>Ejemplos</i>
<i>Metales</i>	Aceros inoxidables, aleaciones a base de cobalto, oro, titanio y sus aleaciones.
<i>Cerámicos</i>	Óxido de aluminio, hidroxiapatita, vidrios, carbonos.
<i>Compositos</i>	Materiales recubiertos de cerámica, materiales recubiertos de carbono.
<i>Materiales biológicos</i>	Piel porcina y válvulas cardíacas, arterias bovinas, entre otros.
<i>Polímeros</i>	Acrílicos, poliuretanos, siliconas, nylon, teflón.

Sin embargo, no todo material sintetizado puede ser catalogado como biomaterial, debe cumplir ciertos criterios y requisitos reglamentarios antes de que puedan ser calificados para su uso en aplicaciones médicas, éstos vienen enlistados en la Tabla 2.

TABLA 2 CRITERIOS PARA LA SELECCIÓN DE BIOMATERIALES. TABLA TRADUCIDA DE PIŞKIN (1995).

<ul style="list-style-type: none">○ Se puede purificar, fabricar y esterilizar fácilmente con métodos convencionales.○ Están libres de impurezas lixiviables, aditivos y compuestos (por ejemplo, iniciadores, estabilizadores, emulsionantes, monómeros u oligómeros sin reaccionar, plastificantes, fragmentos de rellenos)○ Tiene propiedades biomecánicas deseadas (en tensión, compresión y corte)○ Tiene una estructura física deseable (por ejemplo, cristalinidad, densidad de enredos, hinchazón de equilibrio)○ Tiene otras propiedades deseables (por ejemplo, hidrofobicidad/hidrofilia, humectabilidad, carga superficial, polaridad, heterogeneidad en la distribución de grupos químicos reactivos, energía superficial, agua sorbida, movilidad de las moléculas superficiales, suavidad)○ Mantiene sus propiedades y funciones in vivo durante el período de tiempo deseado (por ejemplo, 1 h, 1 día, 1 o 10 años)○ No incluye reacciones indeseables del huésped (p. Ej., Trombosis, reacciones inflamatorias, necrosis tisular, toxicidad, reacciones alérgicas, carcinogénesis)

Nuevos biomateriales y nuevas técnicas de funcionalización son necesarias para poder desarrollar y mejorar la bioactividad de éstos en comparación con las generaciones anteriores y así poder reducir gradualmente los efectos secundarios adversos que producen los biomateriales al ser introducidos al cuerpo. La constante y creciente experimentación para generar mejoras o innovaciones en los biomateriales es actualmente una de las áreas con más desarrollo, una de ellas es la ingeniería de tejidos con polímeros bioactivos¹⁵ y la generación de implantes, siendo ésta última la aplicación con más demanda.

1.2 Uso de biomateriales en implantes

Actualmente el uso de implantes ha tenido un gran impacto, como previamente se mencionó, en decenas de millones de pacientes, siendo esta proporción sólo en los Estados Unidos de América. Se estima que para 2030 la demanda de artroplastias totales primarias de cadera y de rodilla aumentará en un 174% a 572,000 y en un 673% a 3.48 millones de procedimientos, respectivamente¹⁶, de lo que es actualmente. En la parte de abajo se muestra la demanda en el mercado de implantes médicos a nivel mundial ya sea muy alta, moderada y baja en una proyección de años entre 2020-2025 (Figura 1). Se ve claramente que los implantes comprenden un componente principal de la medicina moderna y son esenciales para muchas aplicaciones clínicas que van desde el reemplazo de cadera/rodilla¹⁷, reparación/reconstrucción de tejidos¹⁸, prótesis neurales¹⁹, liberación controlada de fármacos²⁰, hasta monitoreo de signos vitales²¹, entre otros.

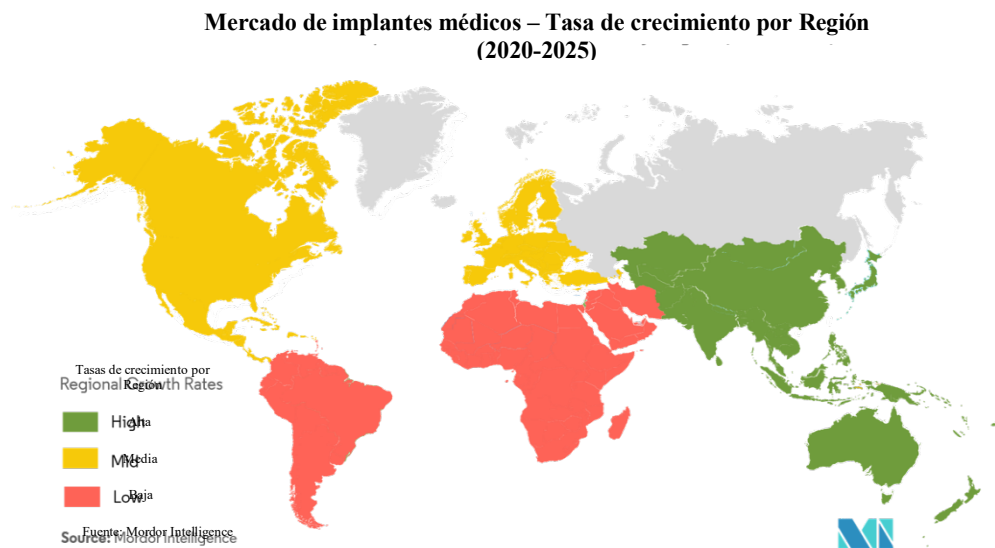


Figura 1 Mapa mundial del mercado de implantes médicos entre los años del 2020 – 2025. Figura modificada de Mordor Intelligence.

A diferencia de las nanopartículas, que bajo ciertos criterios, tales como la concentración y el tamaño de partícula, pueden llegar a ser fagocitadas y eliminadas por el sistema inmune innato^{17,22}, los materiales a escala macro o *bulk* no biodegradables, tales como algunos implantes, deben de permanecer en el cuerpo por un periodo mayor, siendo indispensable que el huésped no detecte estos implantes como extraños y monte una respuesta de rechazo mediada por el sistema inmune^{23,24}. A este último proceso se le conoce más comúnmente como cascada fibrótica, e incluye daño tisular, reclutamiento inmune de monocitos inflamatorios y neutrófilos en ese sitio de lesión del tejido generando, a su vez, una variada secreción de mediadores tóxicos secretados por las células, tales como especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS), tales como peróxido de hidrógeno (H₂O₂), radicales superóxidos (O²⁻), radicales hidroxilo (*OH), óxido nítrico (NO) y iones peroxinitrito (ONOO⁻), entre otros, que llegan a ser perjudiciales para los tejidos circundantes^{24,25}, evitando la interacción con el microambiente circundante, incluida la detección de estímulos bioquímicos como pH, oxígeno, niveles de glucosa en sangre y/u obstruir el flujo de nutrientes donde los componentes internos del dispositivo son de origen biológico^{23,26}. Una serie de experimentos han demostrado que los macrófagos pueden llegar a tener plasticidad considerable, respondiendo a numerosas señales²⁷ y siendo uno de los componentes clave del reconocimiento de prótesis, adhiriéndose activamente a la superficie de estos objetos extraños^{23,26,28,29}. El artículo revisión de Ward, K. (2008) describe diferentes tipos de respuestas obtenidas por macrófagos y citoquinas al material exógeno, mencionando que este destino es el mismo para materiales de origen natural y sintético, incluidos polisacáridos, polímeros, cerámicas y metales²⁶.

Ahora, agregando el hecho de que el uso de biomateriales en implantes cada vez es mayor para garantizar el restablecimiento de una función y dar calidad de vida a distintos pacientes, es de esperarse que el problema de la infección asociada con biomateriales (BAI, por sus siglas en inglés) aumente en las próximas décadas³⁰.

1.3 Infecciones Asociadas a Biomateriales (BAI)

La demanda de implantes y dispositivos de biomateriales es cada vez mayor, debido a varias razones enumeradas anteriormente que incrementan tanto la expectativa de vida como su calidad.

Sin embargo, los implantes y dispositivos biomateriales ya sean implantados temporal o permanentemente; interna o externamente, enfrentan 2 problemáticas, en especial los permanentes internos: infección asociada con biomateriales (BAI) y falta de integración de tejido nativo³¹.

En el caso de las BAI, la colonización microbiana del implante es la iniciadora de la infección asociada con el biomaterial^{32,33}, y es por ello la importancia de comprender la adhesión microbiana y los mecanismos de infección, así como para el diseño de medidas preventivas.

Ahora, la resistencia es la capacidad de un microorganismo de crecer en presencia de un nivel elevado de antimicrobianos³³ Estos antimicrobianos pueden dividirse en diferentes categorías: Fenoles, ácidos orgánicos e inorgánicos: ésteres y sales, diamidinas aromáticas, agentes tensioactivos, aldehídos, halógenos, alcoholes, compuestos de peróxido, péptidos permeabilizadores, entre otros, todos ellos resumidos en el capítulo escrito por Moore, L. y Payne, D. del libro “Principios y prácticas de desinfección, conservación y esterilización de Russell y Ayliffe” (2008)³⁴.

A su vez, la variedad de recubrimientos antibacterianos son reafirmados por el artículo de revisión de Vasilev, K., Cavallaro, A. y Zlim, P. (2018) dedicado también a presentar los últimos avances en el campo de los materiales, éste resalta que puede haber una cantidad grande de sustancias e incluso materiales que pueden fungir como antimicrobianos, pueden ser naturales como el quitosán, o sintetizados como las nanopartículas de plata, así como recubrimientos con composiciones diferentes de los siguientes elementos: Cr-Cu-O, Al-Cu-N o Zr-Cu-N ^{35,36}

Sin embargo, aunque haya avances en la investigación para prevenir la sedimentación indeseable de microorganismos y se hayan desarrollado controles adicionales en la industria para prevenir infecciones, aún no se ha demostrado como tal una solución general para la colonización de la superficie microbiana y las BAI³⁶. En el caso de México, desde que la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2017 hizo un llamado a los países miembros a trabajar por la Seguridad del Paciente, esto indica el cuidar las dosis de medicación hacia los pacientes; enfocándose más al uso de antimicrobianos, éstos deben ser mediados ya que en lugar de generar una mejora puede llegar a afectar al paciente. Para solventar el problema, el cual no sólo tiene que ver con la parte médica, sino también con la industria particularmente de alimentos, y el medio ambiente, entre otros; México a adoptado un plan de acción de acuerdo con lo establecido por la OMS-OPS

(Organización Panamericana de la Salud). De acuerdo con el Boletín CONAMED, Especial 2018, boletín 22 emitido y editado por la Secretaría de Salud (México), dice lo siguiente^b:

“El Plan de Acción Global de Resistencia Antimicrobiana (PAG), ha determinado cinco objetivos estratégicos:

1. Mejorar el conocimiento y comprensión de la RAM (Resistencia Antimicrobiana) a través de educación y capacitación.
2. Fortalecer el conocimiento y evidencia a través de la vigilancia e investigación.
3. Reducir la incidencia de infecciones a través de medidas efectivas de higiene y de control y prevención de infecciones.
4. Optimizar el uso de antimicrobianos en la salud humana y animal.
5. Asegurar la sostenibilidad de la inversión a través de investigación y desarrollo.

(...) Existe una estrecha relación entre la RAM y los Objetivos de Desarrollo Sustentable (Agenda 2030); la resistencia a los antimicrobianos es una crisis que hay que gestionar con la máxima urgencia.” Por eso mismo, considero de suma importancia seguir desarrollando controles y protocolos mejorados para prevenir cualquier tipo de infecciones ya sea asociadas a bacterias u hongos.

1.4 Titania mesoporosa (M-TiO₂)

De manera más enfocada acerca de la titania mesoporosa utilizada en bioaplicaciones, más específicamente en actividad antimicrobiana, el estudio de Brook *et. al.* (2007) desarrolló películas fotocatalíticamente activas de dióxido de titanio (TiO₂, o titania), sintetizadas por la técnica de Deposición Química de Vapor térmica o CVD térmica (por sus siglas en inglés), método modificado funcional y estructuralmente utilizando deposición de plata nanoestructurada; este método permite controlar mejor la nanoestructura de la película, lo que es vital para determinar su bioactividad³⁷. Demostraron que las películas compuestas son altamente duraderas, fotocatalíticamente activas y poseen un fuerte comportamiento antibacteriano. Pero lo impresionante del estudio fue que demostraron que las películas también tenían la capacidad de "autorregeneración", ya que no sólo mataban las bacterias presentes en la superficie de la película, sino que también fotodegradaban los residuos. Para primeros resultados se observaron velocidades

^b BOLETÍN CONAMED. Año 4, Especial 2018. Núm. 04-2018-051610104800-203, ISSN 2594-1534. Última modificación: 18 de diciembre de 2018. Recuperado el día 16 de junio de 2020 de: http://www.conamed.gob.mx/gobmx/boletin/pdf/boletin22/numero_completo.pdf

de muerte en menos de 5 minutos (para 6 muertes logarítmicas), lo que indicaría una mejora sustancial adicional en la bioactividad. Esto demuestra una buena eficiencia del material compuesto sintetizado por esta técnica de CVD térmica.

Ahora, uno podría pensar que sería más sencillo utilizar fármacos ya existentes que sirven como agentes antimicrobianos, sin necesidad de utilizar elementos tóxicos, como son las comúnmente usadas nanopartículas de plata (bajo ciertas condiciones³⁸), y es justo lo que hizo el estudio de Atefyekta *et. al.* (2016). Evaluó la eficacia *in vitro* de películas delgadas de titania mesoporosa sintetizadas por el método EISA (Evaporation-Induced Self-Assembly method, por sus siglas en inglés) con diámetros de poro de 4, 6 y 7 nm. A su vez, éstas fueron caracterizadas y funcionalizadas con agentes antimicrobianos como vancomicina, gentamicina y daptomicina; en colonias bacterianas de *S. aureus* y *P. aeruginosa*⁴. Los resultados mostraron que la adhesión de bacterias era menor; aunque lo más resaltante del estudio es que la sola presencia de los poros tuvo un efecto deseado en la disminución de colonización bacteriana, con o sin agentes, observándose una tendencia decreciente en función del tamaño de poro; a mayor tamaño de poro, menor conteo de unidades formadoras de colonias (CFU) en ambas bacterias. Este estudio da pauta a desarrollar más estudios para evaluar biomateriales porosos de titania para reducir las infecciones por implantes.

Más estudios se han hecho relacionado al tema; uno de los más recientes fue hecho por Escobar *et. al.* (2019) donde discuten el uso de películas de titania mesoporosa (Mesoporous Titania Films, MTF) no sólo da la ya conocida funcionalización y liberación de gentamicina; sino la también funcionalización superficial de las MTF con proteína morfogenética ósea recombinante humana 2 (hrBMP - 2) para una posible regeneración ósea³⁹. Lo que quisiera resaltar del estudio es que demostraron que la gentamicina no es liberada en un solo paso, sino se libera muy lentamente, durando incluso semanas, evitando la formación de colonias de bacterias en el implante mientras se realiza la cirugía liberando la mayor parte de la gentamicina durante las primeras horas, mientras que el resto de la gentamicina, depositada en los poros de la MTF se libera en dosis más bajas durante semanas evitando la infección. Esto resalta el uso materiales porosos, preferiblemente entre los 2 y 50 nm.

1.4.1 Propiedades. Biocompatibilidad.

Ahora se estará uno preguntando ¿por qué titania mesoporosa y qué la hace biocompatible? la titania tiene una variedad de estructuras cristalinas que pueden cambiar las propiedades del material en sí afectando así su biocompatibilidad. En otras palabras, su composición de fase es su propiedad citotóxica. Sayes *et. al.* (2006) realizó un estudio de nanopartículas de TiO_2 con tamaños entre los 3 y 10 nm de diámetro. Demostraron que la fase anatasa de la TiO_2 era más tóxica que la fase rutilo, siendo casi 100 veces más tóxica que la segunda³. Sin embargo, la respuesta celular a estas nanopartículas, como la inflamación y la muerte celular sólo eran visibles a concentraciones relativamente altas (100 mg/mL o más). A su vez, demostraron que el daño celular provocado por la acción de anticuerpos (o citotoxicidad), de las nanopartículas estaba correlacionada con la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). A más generación de ROS por parte de la nanopartícula, mayor su citotoxicidad.

El trabajo de Mo y Ching (1995) ya habían demostrado antes que la razón por la cual la anatasa era más tóxica que la rutilo, si es que se quiere utilizar como bioaplicación, es debido a su amplio band-gap (o espacio de absorción), otorgándole la posibilidad de generar más ROS⁴⁰.

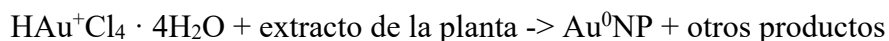
Sin embargo, sólo se está hablando de nanopartículas de titania, no titania mesoporosa la cual tiene más propiedades por el simple hecho de tener poros. El estudio realizado por Wu *et. al.* (2011) que utilizó nanopartículas de titania mesoporosa (o MTN) funcionalizadas analizó su biocompatibilidad para poder darles uso en el área de bioimagen; así como en el área médico para la administración de fármacos contra células de cáncer⁴¹. Demostraron que la titania mesoporosa amorfa tiene una toxicidad más baja y una excelente biocompatibilidad en comparación con la titania comercial cristalina (ya sea con fase rutilo o anatasa) pudiendo utilizar concentraciones hasta de 400mg/mL, con un índice de sobrevivencia celular del 50% (LC_{50} 400mg/mL). Esto es ya una concentración alta en comparación con la propuesta por Sayes *et. al.*

Estos artículos nos ayudan a notar que incluso si el tamaño es importante para ser considerado como una característica clave para usar un nanomaterial con fines médicos, la característica más relevante para TiO_2 es su composición de fase.

1.5 Nanopartículas de oro (AuNP)

Las nanopartículas de oro son una de las nanopartículas más estables y populares, que recibe considerable atención debido a sus aplicaciones en imágenes biomédicas y pruebas de diagnóstico. Existen numerables métodos para sintetizar AuNP sin embargo algunos de ellos utilizan productos químicos tóxicos generando problemas ambientales⁴²⁻⁴⁴. Sin embargo, algunos de los métodos reducen este tipo de problemas al utilizar ya sea plantas⁴⁵, algas marinas⁴⁶ y microbios⁴⁷ para sintetizar las AuNP, por métodos físicos y químicos. En este contexto, los fitoconstituyentes presentes en la fuente natural contribuyen a una mayor biocompatibilidad y citotoxicidad al estabilizar las nanopartículas de oro⁴⁸. Si se quiere consultar algunos de los métodos ya documentados para la síntesis de nanopartículas por medio de síntesis verde, se recomienda consultar el artículo reporte de Kuppusamy *et. al.* (2014).

En mi proyecto, enfocándonos a la síntesis verde de AuNP utilizando plantas, el extracto de la planta contiene diferentes biomoléculas como proteínas, azúcares, aminoácidos, enzimas y otros restos de metales. Estos metabolitos están fuertemente involucrados en el proceso de bio-reducción. En este caso, la reacción fue reducción de iones de Au⁺ del precursor ácido cloroáurico tetrahidratado (HAuCl₄) a nanopartículas metálicas de Au⁰^{48,49}. La reacción se da a continuación:



Ahora, ¿por qué se cree que el compuesto de titanio y oro funcionará mejor como nanomaterial para nuestros fines? Las propiedades de la plata y el oro permiten a éstas ser foto-depositadas sobre un sustrato, al tener un compuesto de dióxido de titanio con alguno de estos metales permite que éstos se utilicen para la oxidación de CO, la producción de H₂, degradación de colorantes y como bactericidas⁵⁰. Esto a su vez agregándole el hecho de que la actividad de los catalizadores de oro es típicamente mucho mayor que otros metales típicos como la plata y el cobre.

También el oro posee un plasmón de resonancia superficial localizada o LSPR, por sus siglas en inglés, que le permite mejorar la actividad fotocatalítica y otorgándole una estabilidad química más robusta (5.1-5.3eV)⁵⁰⁻⁵². Así que, al tener compuestos Au-TiO₂ se puede llegar a tener una mejor fotoactividad incluso mejor que la de los compuestos de Ag-TiO₂ porque el oro permite una mejor separación de la carga de TiO₂⁵⁰.

1.5.1 Propiedades. Biocompatibilidad

¿Puede ser que las nanopartículas, sintetizadas sin ningún otro elemento, puedan presentar propiedad antibacterial? El estudio llevado por Abdel-Raouf *et. al.* (2013) sintetizó AuNP por medio de síntesis verde utilizando extracto con etanol de alga marina roja *G. elongata*⁵³. En este artículo demostraron que al usar AuNP como agentes antimicrobianos puede representar una alternativa viable para retrasar o inhibir el crecimiento de muchas especies patógenas, de acuerdo con las distintas maneras de sintetizar las nanopartículas. En este caso utilizaron tanto polvo como extracto con etanol de AuNP, dándose cuenta de que el extracto con etanol tenía mayores zonas de inhibición en el ensayo antimicrobial en placas de Petri con la mayoría de las bacterias utilizadas. Sin embargo, no se conocen los mecanismos detrás de la actividad de las AuNP sobre las bacterias. Ellos sugieren que las AuNP pueden seguir los mismos mecanismos que siguen las nanopartículas de plata al momento de utilizarse como agentes antimicrobiales^{53,54}, que son:

1. La absorción de iones de oro libres seguido de la interrupción de la producción de ATP y la replicación del ADN.
2. La formación de especies de oxígeno reactivo (ROS).
3. Daño directo a las membranas celulares.

Pero este estudio demuestra mejor que el simple hecho de tener nanopartículas de oro solas, sin generar ningún compuesto, puede tener ciertas deficiencias que al usarlas en un composito como en el caso de usarlas con el dióxido de titanio.

1.6 Caracterización de materiales

Para conocer las propiedades fisicoquímicas de un material es muy importante caracterizar este nanomaterial obtenido de manera cualitativa y cuantitativamente utilizando diferentes técnicas. Siendo también así verificada la consistencia del nanomaterial. Es por ello que existen una gran cantidad de técnicas de caracterización de materiales las cuales tiene cada una diferentes formas de análisis, otorgándonos así información específica de cada una de las propiedades que puede tener nuestro material. Las técnicas de caracterización utilizadas en mi proyecto son descritas a continuación con pequeños detalles de la teoría y su importancia.

1.6.1 Espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV-Vis)

La espectroscopía UV-Vis está basada en analizar el proceso de absorción de una molécula o material dentro del rango de las longitudes de onda ultravioleta-visible (radiación comprendida entre los 160 y 780 nm).

La absorción de esta radiación causa la promoción de un electrón a un estado excitado, estos electrones son los provenientes del enlace de las moléculas, por lo que los picos de absorción se pueden correlacionar con los distintos tipos de enlace presentes en el compuesto. Esto en el caso de moléculas o material no metálico.

Para el caso de los metales, por ejemplo de las nanopartículas de oro, existe otro fenómeno de resonancia electrónica, llamado plasmón. Se sabe que un material metálico es un buen conductor debido a que posee electrones libres en él. Al inducirle un haz de luz (onda electromagnética), en este caso de la radiación del espectrofotómetro comprendido entre el rango ultravioleta (UV) y visible, el campo eléctrico de ésta interacciona con esos electrones libres del material, excitándolos, generando una especie de nube de electrones alrededor del material. A esta nube de electrones se le conoce como plasmón (Figura 2)^{55,56}.

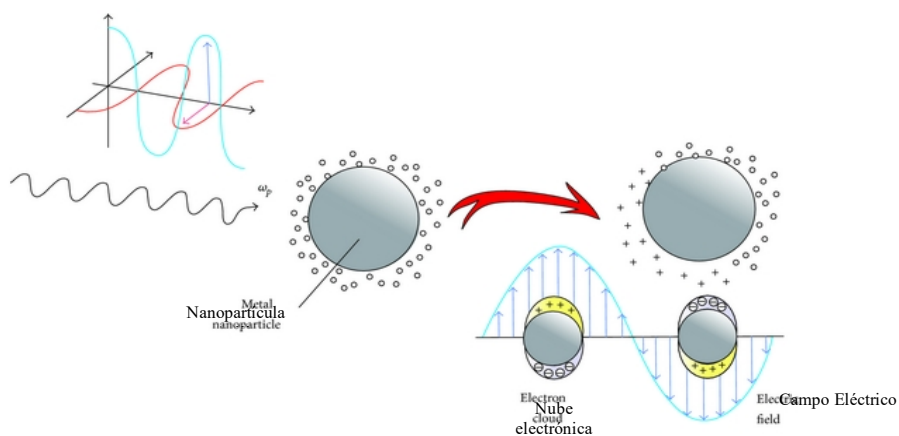


Figura 2 Plasmones de resonancia de nanopartículas de metales nobles (Ag, Au) generado por el componente del campo eléctrico de la luz entrante. Ilustración modificada de Zielińska-Jurek (2014).

Si los electrones son excitados a una frecuencia de resonancia particular de la configuración del plasmón, entonces la absorción de luz en respuesta de la excitación será muy fuerte. En cambio, si la frecuencia de resonancia no coincide con esta configuración, su absorción será muy débil.

Como ya se mencionó anteriormente, las AuNP exhiben un fenómeno conocido como resonancia del plasmón superficial (SPR, por sus siglas en inglés), que es responsable de sus secciones de

absorción y dispersión del haz de luz, proporcionándoles propiedades ópticas que pueden variar debido a su tamaño, forma y/o composición. Las AuNP están caracterizadas por un color rojizo o morado debido a sus efectos de SPR relacionados a su tamaño⁵⁷.

En sí, en la espectroscopía por absorción molecular se mide ya sea la transmitancia T o la absorbancia A de una determinada longitud de onda de soluciones que están en celdas transparentes las cuales tienen una longitud de trayectoria de b cm. Esto se puede expresar por medio de la Ley de Beer:

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P} = \epsilon bc \quad (\text{Ec. 1})$$

P_0 y P son las potencias radiantes incidente y transmitida, respectivamente. Siendo que $\frac{P_0}{P}$ se otra manera de representar a la Absorbancia (A) y su recíproco, $\frac{P}{P_0}$, la Transmitancia (T)⁵⁸.

Debido a ello, la espectroscopía UV-Vis se utiliza para la identificación de los grupos funcionales presentes en una molécula y, para el caso de los metales, nos da la longitud de onda en la cual se da la resonancia de electrones en el material.

1.6.2 Microscopía de Escaneo Láser Confocal (CLSM)

El microscopio de barrido confocal combina el microscopio de fluorescencia con imagen electrónica y puntos de luz suministrados por láser dirigido al espécimen en particular para obtener imágenes tridimensionales. El láser se aplica en forma de barrido, punto por punto, en una pequeña parte del material u espécimen; éste atraviesa la muestra y nos da imágenes de diferentes planos focales que permiten el análisis tridimensional de las estructuras analizadas⁵⁹.

Es utilizado para varias áreas de investigación como ciencia de materiales, biología y medicina, sin embargo su mayor uso radica en las últimas dos para realizar seccionamientos ópticos, es decir para observar los tejidos en sus diferentes niveles. Es una técnica no invasiva, la cual no daña las muestras de tejido o celulares. Aparte, permite la visualización de uno o más tintes de marcaje, pudiendo diferenciando diferencias, por ejemplo en el caso de células, sus diferentes organelos.

En el caso de materiales, esta técnica nos permite visualizar de igual manera la muestra en diferentes planos focales obteniendo imágenes que pueden mostrarse superpuestas una encima de la otra, por ejemplo, con cada imagen codificada en diferentes pseudocolor, haciendo las imágenes

obtenidas por esta microscopía diferentes a las otras producidas por microscopios convencionales, por el simple hecho de que éstas estaban en registro exacto y no mostraban paralaje, ya que cada una es generada por el mismo punto de escaneo. Esto nos permite discernir e identificar cada uno de los elementos que puede conformar nuestras muestras, de manera visual⁶⁰.

1.6.3 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Es una técnica la cual nos permite visualizar la superficie de un material a escala micro. Ésta consiste en enfocar un haz de electrones muy fino sobre la superficie de la muestra sólida, haciendo pasar este haz por medio de un barrido sobre ella, de arriba hacia abajo, de izquierda a derecha. El proceso se repite hasta que el área deseada de la superficie haya sido totalmente recorrida por el haz, o totalmente barrida. En los instrumentos para microscopía electrónica de barrido (SEM) los electrones retrodispersados y secundarios se detectan y se utilizan para construir la imagen (Figura 3).

Existen muchos microscopios que cuentan con detectores de rayos X para dar un análisis más especializado químico, que facilitan las determinaciones cualitativas y cuantitativas⁵⁸. Es una técnica de caracterización superficial que proporciona información morfológica y de composición química de los materiales a nivel de superficie⁶¹. Es no destructiva.

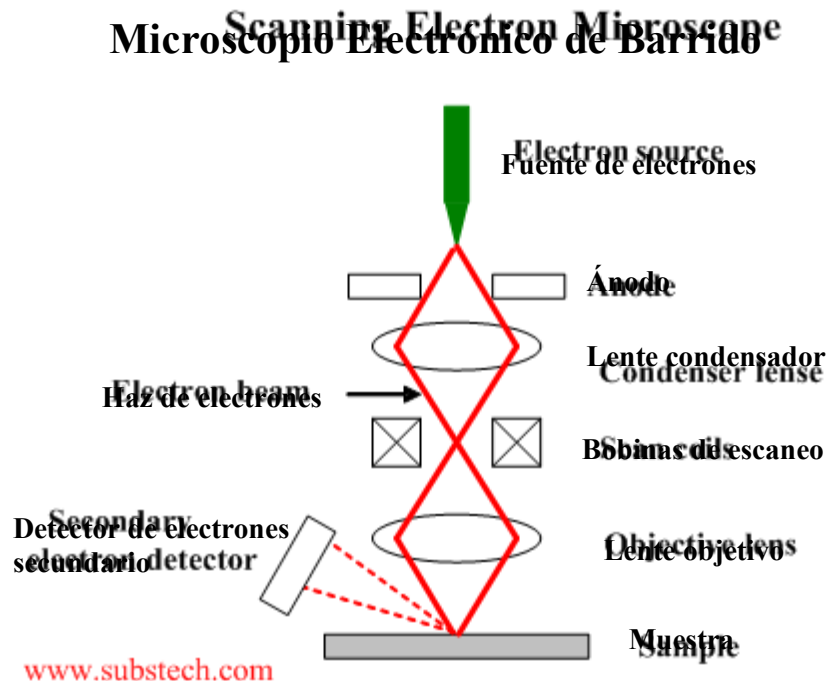


Figura 3 Diagrama de rayos de un microscopio electrónico de barrido. Ilustración modificada de SubsTech, traducida al español.

1.6.4 Difracción de Rayos X (DRX)

Es una técnica que proporciona mayoritariamente conocimientos sobre la distribución y la separación de los átomos en los materiales cristalinos y amorfos. Ésta caracterización ayuda a entender con mayor claridad las propiedades físicas de los metales, los polímeros, polvos, entre otros materiales que en su mayoría son sólidos. La difracción de rayos X es uno de los métodos más importantes para identificar sobretodo la/las estructura(s) que conforman un material⁵⁸.

Si el material va a ser utilizado para algún fin biológico, el análisis por DRX es una de las técnicas que más se utilizan actualmente debido a que da información acerca del grado de cristalinidad del material, éste influye en la estabilidad a largo plazo del mismo, y también en su bioactividad. Es importante resaltar el hecho de que al tener una cierta estructura cristalina en el material, su estabilidad se verá correlacionada, ya que los enlaces procuran ordenar los átomos, según el tipo de enlace, minimizando así la energía de enlace, o también llamada entalpía, y por lo tanto minimizando su reacción ante otros compuestos o condiciones.

1.6.5 Análisis Termogravimétrico (TGA)

En este tipo de análisis lo que se explora es la masa de la muestra (de preferencia sólida) que es colocada en un ambiente controlado donde se varía la temperatura o el tiempo en que va a aumentarse cada vez más la temperatura⁵⁸. El equipo de termogravimetría consta, de la manera más sencilla, de una microbalanza sensible (o termobalanza), un horno, un sistema de gas para dar un ambiente ya sea inerte o reactivo y una computadora para visualizar y guardar los datos obtenidos.

A pesar de que con este análisis se puede determinar la pérdida de masa a temperaturas específicas, éste no nos da información acerca de las especies que componen el material que la causan. La representación de la masa o del porcentaje de masa en función del tiempo se obtiene en un llamado termograma o curva de descomposición térmica.

1.6.6 Método Brunauer, Emmett y Teller (BET)

Esta técnica sirve para determinar el área superficial de un material poroso. El elemento fundamental de la teoría BET está asociado con la adsorción de un gas en la superficie de un material⁶². Dentro de los gases más comúnmente utilizados son nitrógeno y argón. Se empieza por

dosificar el gas (o adsorbante, ya que éste se irá adsorbiendo a la superficie del material poroso conforme aumenta la presión). Al ir dosificando poco a poco el gas, por ejemplo de nitrógeno, se puede ir predeterminando las presiones relativas, hasta llegar a una completa adsorción del gas, alcanzando un estado estable, en un proceso llamado equilibración, y el volumen a cada presión que queremos medir será grabado. Al irse dosificado el nitrógeno dentro de los tubos de análisis, los átomos se van a ir adsorbiendo a la superficie de la muestra, así como también a las paredes de los poros más grandes e irán llenando cualquier poro presente en ella. Los pozos más pequeños se irán rellorando con el adsorbato primero, siendo los microporos los primeros en llenarse de gas con poca presión relativa, y así sucesivamente con el adsorbato continuamente cubriendo la superficie externa del material. La gráfica de isoterma por adsorción de gas es completada hasta alcanzar la presión absoluta dosificada a la muestra, relativa a la saturación de la presión de vapor del adsorbato⁶³.

Todo este proceso va relacionado con las fuerzas de Van der Waals que son creadas por la película de adsorbato, que puede consistir de átomos, iones o moléculas en la superficie de una sustancia que adsorbe estas partículas. El proceso de adsorción puede ser físico, relacionada con las fuerzas de Van der Waals, o químico, resultado de la reacción química entre el sólido y el gas (adsorbato)⁶⁴⁻⁶⁶. Para un análisis completo de fisisorción, se requiere que la isoterma de adsorción se recolecte bajo condiciones de presión ascendente (adsorción) y presión descendente (desorción).

Hay seis isotermas de adsorción estándares para gases en sólidos de acuerdo a la IUPAC⁶⁷ como se muestra en la Figura 4.

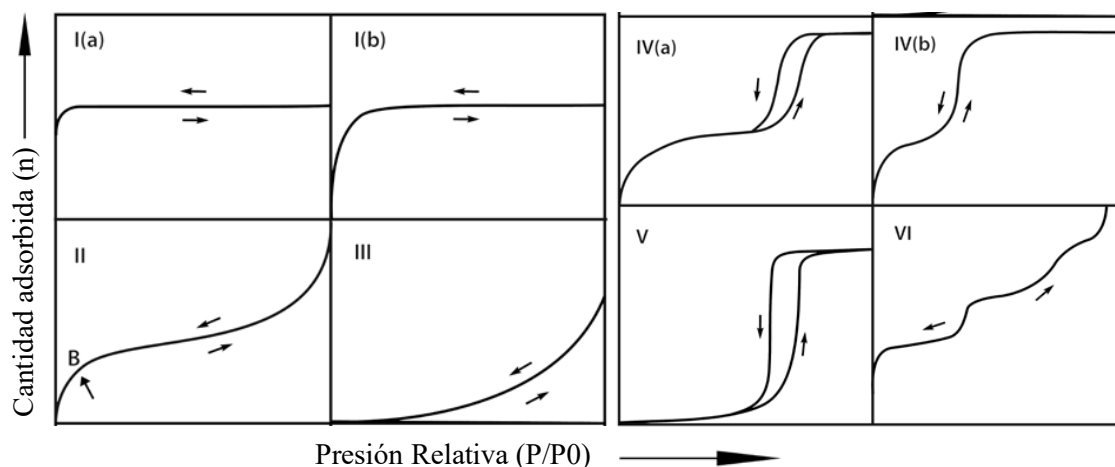


Figura 4 Clasificación de la IUPAC de isothermas de fisiorción. Imagen modificada de la original, traducida al español.

A temperaturas normalmente de 77K para el nitrógeno y de 87K para el argón, el punto de ebullición de cada elemento después de la calcinación y desgasificación (523–573K, 24 h, 10–3 Pa), las isothermas de Tipo I (a) son representativas por materiales microporosos que tienen sus microporos principalmente estrechos, o los llamados ultramicroporos (<0.7 nm); diferentes a las isothermas de Tipo I (b) que tienen microporos más anchos, como los supermicroporos (0.7 - 2 nm). Para materiales con poros en el rango de mesoporos (2-50 nm), las transiciones isotérmicas a los patrones de Tipo IV (b) y IV (a), y la diferencia entre cada isoterma está relacionado con la aparición de histéresis y la forma de la misma. La histéresis se asocia con la condensación retardada debido a la metaestabilidad de la multicapa adsorbida, en otras palabras, donde las curvas de adsorción y desorción no se superponen; y la presencia o ausencia de esta superposición proporciona también información sobre la calidad general de la isoterma y la estructura de poros del material.

Las isothermas de tipo V son un caso especial de adsorción en micro y/o mesoporos, donde las interacciones entre el adsorbente y el material son relativamente débiles. Las isothermas de los tipos II, III y VI están asociadas con materiales no porosos o macroporosos.

La IUPAC también tiene una clasificación para el tipo de histéresis presente en el material⁶⁷, como se muestra en la Figura 5.

Primero se tiene que identificar si la histéresis es Tipo H1 (rango estrecho de mesoporos uniformes donde los efectos de red son mínimos) o no, ya sea Tipo H2-H5, donde existen estructuras de poros complejas y donde los efectos de redes son importantes.

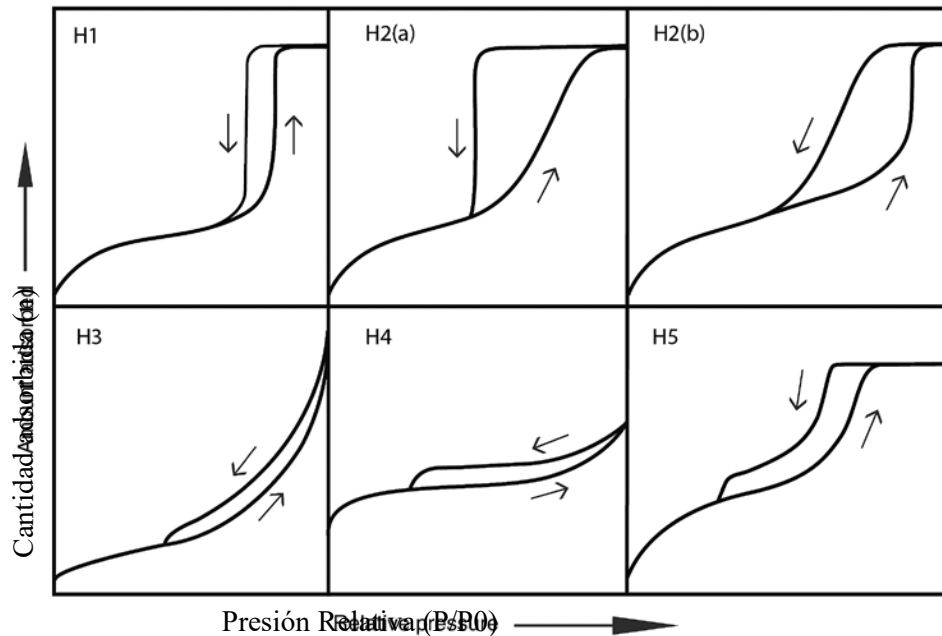


Figura 5 Clasificación de la IUPAC para los ciclos de histéresis. Imagen modificada de la original, traducida al español.

De acuerdo a algunas revisiones anteriores, los materiales con histéresis de Tipo H1 tienen una distribución del tamaño de poro que puede obtenerse fácilmente y de manera confiable utilizando métodos apropiados. Sin embargo, para materiales con histéresis tipo H2-H5, la línea de desorción retrasada puede deberse a varios fenómenos como bloqueo de poros, cavitación, entre otros⁶⁸.

Se conoce que los bucles de histéresis de tipo H2 están dados por estructuras de poros más complejas. Un rasgo característicos de los bucles H2 (a) son donde se muestra la rama de desorción muy empinada, que puede atribuirse al bloqueo/filtración de poros en un rango estrecho de cuellos de poros o a la evaporación inducida por cavitación. El bucle Tipo H2 (b) también está asociado con el bloqueo de poros pero, en comparación con la anterior, la distribución del tamaño del ancho del cuello es mucho mayor⁶⁷.

Para el tipo H3, los bucles de este tipo están dados por agregados no rígidos de partículas en forma de placa (por ejemplo, ciertas arcillas) pero también si la red de poros consiste en macroporos que no están completamente llenos de adsorbato. El bucle H4 es algo similar, pero la rama de adsorción ahora es un compuesto de los tipos I y II, pudiendo tener un material micro-mesoporoso⁶⁷.

El bucle tipo H5 es inusual, tiene una forma distintiva asociada con ciertas estructuras de poros que contienen mesoporos abiertos y parcialmente bloqueados.

Sin embargo, para obtener un mejor análisis de la distribución del tamaño de poro en el material se necesita utilizar métodos estadísticos que expliquen correctamente la condensación retardada en la línea o rama de adsorción, por ejemplo, el método más común utilizado para la determinación del tamaño de poro es el método BJH (Barrett-Joyner-Halenda)⁶⁹, y algunos métodos más sofisticados, que incluso pueden describir la configuración de la fase adsorbida a nivel molecular se desarrollan con base a cálculos DFT (Teoría Funcional de la Densidad)⁷⁰.

1.7 Proceso de liofilización

Según la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) define como liofilización o el secado por congelación, al proceso en el que se elimina el agua de un producto después de congelarlo y colocarlo al vacío, y este consta de tres pasos: congelación, secado primario (sublimación) y secado secundario (desorción)⁷¹. En la siguiente tabla (Tabla 3) se puede ver información acerca de sus ventajas y desventajas de utilizar este tipo de procedimiento.

TABLA 3 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE REALIZAR UNA LIOFILIZACIÓN DE ACUERDO A LA FDA

Ventajas	Desventajas
Facilidad de procesamiento de un líquido.	Mayor tiempo de manipulación y procesamiento.
Mejor estabilidad.	Necesidad de un diluyente estéril tras la reconstitución del producto.
Eliminación de agua sin calentamiento excesivo del producto.	Costo y complejidad del equipo.
Mayor estabilidad del producto en estado seco.	
Disolución rápida y fácil del producto.	

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Síntesis verde de nanopartículas de oro (AuNP) usando hojas de toronjil (*Melissa officinalis*)

Existen muchos métodos para sintetizar nanopartículas de oro, pero hay un grupo especial donde las AuNP pueden sintetizarse mediante un método verde, que recientemente ha sido un método preferido debido a sus ventajas, ya que es no-tóxico, biocompatible, ecológico, su procedimiento es de bajo costo, sintetizando un producto estable. En este método, los recursos son biológicos como plantas, frutas, algas y hongos, entre otros.

En esta síntesis, la fuente biológica aplicada fue el extracto de hojas *Melissa officinalis*. Es un procedimiento con duración de 2 días.

Para la preparación del extracto, las hojas secas de *M. officinalis* se mezclaron con agua destilada y alcohol isopropílico, se calentaron y se agitaron durante 20 minutos a 60°C. El extracto se añadió a la fuente de oro (HAuCl₄) a 3mM y se agitó vigorosamente durante 2 horas. Después de un día, la solución se diluyó en una proporción de 1:3, se centrifugó a 8000 rpm durante 20 minutos, el sobrenadante se eliminó agregando más tarde la misma cantidad de agua, luego se sonicó durante 5 minutos.

Es necesario realizar este procedimiento al menos 3 veces hasta que la solución tome su color común de rosa o rojo para las nanopartículas de oro.

2.2 Síntesis verde de nanopartículas de plata (AgNP) usando *Melissa officinalis*

Al igual que la anterior síntesis, la fuente biológica utilizada fue el extracto de hojas de *Melissa officinalis*. Para la preparación del extracto, las hojas secas de *M. officinalis* se mezclaron con agua destilada y alcohol isopropílico, se calentaron y se agitaron durante 20 minutos a 60°C. El extracto se añadió a la fuente de plata, esta ocasión ahora es Nitrato de plata y se agitó vigorosamente durante 2 horas. Después de un día, la solución se diluyó en una proporción de 1:3, se centrifugó a 8000 rpm durante 20 minutos, el sobrenadante se eliminó agregando más tarde la misma cantidad de agua, luego se sonicó durante 5 minutos. En este caso, es necesario realizar este procedimiento al menos 3 veces hasta que la solución tome un color común anaranjado para las nanopartículas de plata.

2.3 Síntesis de titania mesoporosa (M-TiO₂)

La síntesis química es una de las más comunes para generar M-TiO₂ y uno de los métodos más utilizados es a través de sol-gel. La titania mesoporosa en este trabajo fue sintetizada con base al método de Borjas-García *et. al.* (2018)⁷², que es una combinación del método sol-gel y los métodos hidrotermales suaves que utilizan precursores de alcóxido.

La titania mesoporosa se preparó usando varias soluciones y reactivos como el butóxido de titanio, trietanolamina (TEAOH), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) e hidróxido de sodio como precursor de titanio (que es un material alcalino). Como reductor de la reacción, se usa NaOH.

Es importante resaltar que las condiciones ambientales para realizar esta síntesis deben de ser rigurosas y muy específicas. Debido la rápida hidrolización del TBOT, se tiene que trabajar en una caja de guantes a una humedad relativa de por lo menos 10% o menos. Esta caja de guantes fue proveída y utilizada dentro de las instalaciones del centro de Geociencias de la UNAM, Campus Juriquilla, en el Laboratorio de Geoquímica de Aguas. Se organizó una cita con la responsable del laboratorio, M. en C. María Carolina Muñoz Torres.

Este procedimiento tiene una duración de entre 4-5 días.

Primero se prepara la solución de TEAH-TBOT dentro de la caja de guantes. Todo el material necesario para la preparación de la solución debe de estar ya adentro antes de dejar trabajando la caja para que disminuya su humedad relativa con sílica y una bomba de vacío.

Ya llegando a la humedad relativa deseada (por debajo del 10%) se pesó exactamente las siguientes cantidades de los reactivos al añadirse a una botella de vidrio:

- TEAH 18.645 g
- TBOT 21.26 g

Una vez añadidas las 2 soluciones, se tapa la botella con una taparosca y se cubre con parafilm. Se saca la solución de la caja de guantes titania y se deja en agitación constante por 24 – 36 hrs.

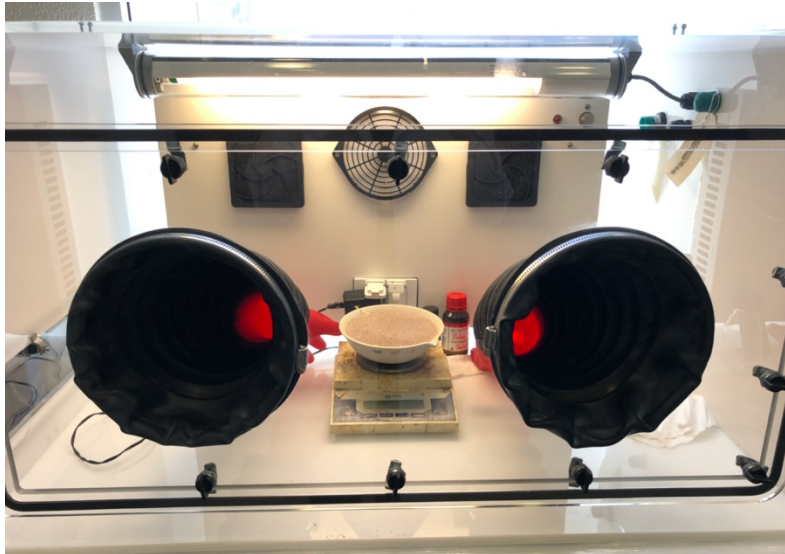


Figura 6 Caja de guantes del Centro de Geociencias en el laboratorio de Geoquímica de Aguas.

Se prosigue a la preparación de la titania mesoporosa (M-TiO₂).

En otra botella de vidrio se añadieron los siguientes compuestos, con la misma rigurosidad de pesar exactamente los reactivos, así como en la solución de TEAH-TBOT.

Se añadió el CTAB (polvo) con el peso exacto de 0.911g. Después se agregaron 3.19g de la solución de TEAH-TBOT. Se agitó constantemente, se le añadieron 5.0g de agua destilada, y se continuó agitando por 30 minutos más.

Después de este tiempo, se añadió cada 30 segundos una gota de una solución de 1.6g de NaOH con 4.0g de agua destilada. Es importante que sólo se añada 1 gota.

Al terminarse la solución de NaOH, se tapó la botella de vidrio y se cubrió con parafilm, para dejarla bajo agitación lento por 1 día a 40°C.

Exactamente al día siguiente, a la misma hora que se puso a agitar la solución, se quitó de la parrilla y de agitación; se puso a calcinar a 100°C por 24hrs.

Al día siguiente se sacó del horno la botella y se removió el líquido amarillo resultante del proceso, cuidando de no quitar la muestra blanca sólida.

La muestra resultante se disolvió con 100mL de agua destilada y se mezcló completamente. La solución se dividió en 2 tubos Falcon para ponerlos a centrifugar por 20 minutos a 2,000rpm.

Una vez terminada la centrifugación, se removía el supernadante, se añadía de nuevo 100mL a la solución resultante y se volvía a centrifugar por el mismo tiempo e intensidad.

Este proceso se repitió por lo menos 5 veces, hasta que se llegó a un pH de 7. Una vez llegado a ese pH se removió el supernadante de la muestra y se dejó calentando en el horno a 80°C por 24hrs. Al día siguiente se sacaron los tubos Falcon del horno y se dejaron enfriar. Una vez estando a temperatura ambiente, con ayuda de un mortero, se molían las muestras sólidas obtenidas hasta obtener un polvo uniforme y sin grumos. Una vez molido, se disponía en un vial marrón y se pesaba la muestra resultante.

Todo este proceso se tuvo que hacer varias veces para así disponer del material necesario para los siguientes procedimientos y caracterizaciones.

2.4 Síntesis del compuesto de titania mesoporosa -nanopartículas de oro (M-TiO₂-AuNP)

Para esta síntesis se realizaron 2 tipos de protocolos.

El primer procedimiento fue parecido al realizado para la síntesis de M-TiO₂, pero por triplicado. Se añadió el CTAB (polvo) con el peso exacto de 0.911g a 3 contenedores de vidrio, respectivamente, así como 3.19g de la solución de TEAH-TBOT. Se agitó constantemente, se le añadieron 5.0g de agua destilada, y se continuó agitando por 30 minutos más.

Después de este tiempo, se añadió cada 30 segundos una gota de una solución de 1.6g de NaOH con 4.0g de agua destilada a cada uno de los contenedores. Es importante que sólo se añada 1 gota. El paso diferente ahora fue que al terminarse la solución de NaOH, se dejó agitando la solución por un par de minutos y después se añadieron 3 volúmenes diferentes de AuNP (previamente sintetizadas) a cada contenedor de vidrio, respectivamente, de la misma forma que se agregó la solución de NaOH, 1 gota cada 30 segundos. Los volúmenes de AuNP fueron los siguientes: 1mL, 2.5mL y 4mL de AuNP.

Una vez agregadas las AuNP, se taparon las botellas de vidrio y se cubrieron con parafilm, para dejarlas bajo agitación lenta por 1 día a 40°C. Lo que se hizo después fue igual al procedimiento de la síntesis de M-TiO₂.

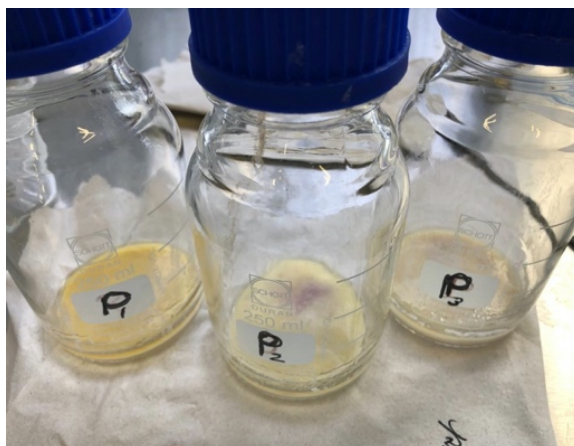


Figura 7 Muestra de M-TiO₂ por triplicado con 3 distintos volúmenes de AuNP: P1 con 1mL, P2 con 2.4mL y P3 con 4mL. Muestras obtenidas después de la calcinación a 100°C por 24hrs.

El segundo protocolo que se hizo fue utilizando la M-TiO₂ (polvo) y las AuNP ya sintetizadas. En un vaso de precipitados de 10mL se añadieron 200mg de M-TiO₂ y 1mL of AuNP. Se cubrió con parafilm y aluminio para evitar que recibiera cualquier tipo de iluminación y se dejó bajo agitación horizontal por 1 día, con el equipo Corning® LSE™ Agitador orbital de baja velocidad, con plataforma plana, 120V. Se dejó a 60rpm. Se hizo lo mismo pero para diferentes volúmenes de AuNP: 1mL, 2.5mL y 4mL.

Al día siguiente se quitaba la muestra de la agitación, se quitaba el sobrenadante, cuidando de no tocar la parte sólida de la base, y se dejaba secando a temperatura ambiente por 1-2 días. Después se colocaba la muestra seca sólida en un tupo Eppendorf, pesando el producto final. Estos procedimientos se realizaban cada vez que se necesitaba más muestra de la misma, así como también se variaban ciertas características de cada uno, como la cantidad de cada una de las muestras, la temperatura, el tiempo de agitación entre otras.

A su vez, algunas de las muestras de M-TiO₂ se calcinaban a distintas temperaturas en la mufla. Esto para obtener diferentes fases de la muestra y analizar sus propiedades posteriormente. Las temperaturas fueron: 560°C, 700°C y 800°C. Las condiciones en la mufla fueron que la rampa se incrementara en 5°C cada minuto, hasta alcanzar los 560°, los 700° o los 800°C; después la temperatura se mantenía constante por 1 hora, y luego disminuía. Terminado el proceso se dejaba enfriar y se almacenaba en tubos Eppendorf.

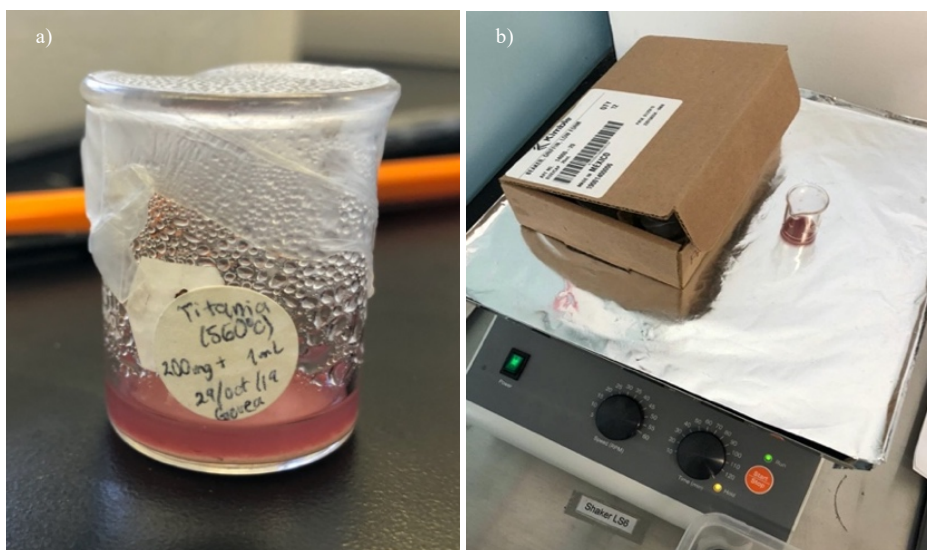


Figura 8 Preparación de la mezcla de M-TiO₂-AuNP en un a) vaso de precipitado con 200mg de M-TiO₂ (calcínada a 560°C) con 1mL de AuNP y b) sobre el agitador orbital del laboratorio de polímeros del Dr. Josué D. Mota Morales.

2.5 Caracterización de los materiales

2.5.1 Caracterización por microscopía de escaneo láser confocal (CLSM)

Las AuNP sintetizados se caracterizaron por microscopía de escaneo láser confocal (CLSM) con el Microscopio Laser Scanning ZEISS LSM880/Axion Observer 7 del Laboratorio Nacional de Microscopía del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA), UNAM a cargo del M. en C. Gustavo Molina. Para la preparación de la muestra, se dispusieron 2 gotas de la solución en un portaobjetos, por separado. Este portaobjetos se colocó en una desecadora durante al menos 4 horas, hasta que las gotas se secan.

2.5.2 Caracterización por espectroscopía UV-Visible

Para esta caracterización, las soluciones tanto de AuNP como de AgNP se analizaron mediante espectroscopía UV-Visible por medio del equipo Metash UV-6000 (PC) UV/VIS Ultravioleta y Visible espectrofotómetro, Shangai InstrumentsTM. La longitud de onda para capturar la absorbancia fue de 200 a 900nm.

La preparación de la muestra fue con base a diluciones, ya que era necesario reducir la concentración de la muestra para evitar el mayor ruido posible en el análisis.

Se hicieron cuatro diluciones de la original. Las diluciones para 1 ml fueron 25uL:975uL, 70uL:930uL, 50uL:950uL, 100uL:900uL, siendo predominante el volumen de agua destilada. Se estableció que se utilizaran mayoritariamente las diluciones de 25uL:975uL, y 50uL:950uL, ya que exhibían mejores gráficas de absorbancia.

2.5.3 Caracterización por microscopía electrónica de barrido (SEM)

El equipo utilizado para esta caracterización fue el microscopio electrónico de barrido de ultra alta resolución Hitachi SU-8230 del Laboratorio Nacional de Microscopía del CFATA, UNAM a cargo del Dr. Rodrigo Esparza. Para esta caracterización no era necesario preparar las muestras previamente, solamente se depositaron pequeñas muestras tanto de la titania mesoporosa (sin nanopartículas) y el composito de M-TiO₂-AuNP sobre un porta muestras de aluminio.

2.5.4 Caracterización por difracción de Rayos X (DRX)

Para esta caracterización se utilizó el difractómetro Rigaku, modelo Ultima IV, el cual cuenta con dos detectores, uno convencional de centelleo y uno ultra rápido de estado sólido (D/teX Ultra), del Laboratorio Nacional de Difracción de Rayos X del CFATA, UNAM a cargo del Dr. Erick Rivera y de la Dra. Beatriz Millán.

Para las muestras de M-TiO₂ (sin AuNP) y M-TiO₂-AuNP se utilizó el DTeX con un barrido de 2° por minuto entre los ángulos de 4° y 80°. Se midieron en un porta muestras ZBH-15 (cero background) no oxidable en el microscopio electrónico de barrido de ultra alta resolución Hitachi SU-8230. Para esta caracterización no era necesario preparar las muestras previamente, solamente se depositaron pequeñas muestras tanto de la titania mesoporosa (sin nanopartículas) y el composito de M-TiO₂-AuNP sobre un porta muestras de Aluminio.

2.5.5 Análisis Termogravimétrico (TGA)

Este análisis se realizó con el equipo de METTLER TOLEDO STAR[®], del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA), UNAM a cargo del Dr. José Luis Miranda. Se trabajó con un rango de temperatura de 25°C a 500°C, con una temperatura de calentamiento de 10°C/min por un periodo de 52 minutos. Las nanopartículas fueron depositadas en un portamuestras Alumina 70ul.

Para el caso de las nanopartículas de oro se trabajó con un peso inicial de 7.61mg de muestra liofilizada. Para las nanopartículas de plata se utilizaron 5.0mg de muestra igualmente liofilizada. Se obtuvieron datos con el termograma convencional, del cambio del peso de las muestras [mg] a través de este cambio de temperatura en el tiempo, así como el termograma diferencial con el cambio de masa respecto a la temperatura [mW].

2.5.6 Método de análisis BET (Brunauer, Emmet, Teller)

Las muestras fueron analizadas en la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por medio del equipo de Quantachrome, modelo Quantasorb Jr. para polvos y monolitos pequeños. Teniendo como Gas de Absorción el nitrógeno molecular (N₂).

2.6 Tratamiento de liofilización a nanopartículas

Para obtener muestras sólidas de las nanopartículas sin tener algún tipo de solución acuosa, se sometieron al método de liofilización, llevado a cabo en el Instituto de Neurobiología (INB) en el Laboratorio B-02 del Dr. Manuel Aguilar Ramírez.

La liofilización (o criodesecación) se realizó para poder obtener una muestra sólida de las nanopartículas para así tener un mayor control en adjuntarla con la titania mesoporosa. A su vez, se hizo así para poder analizarse termogravimétricamente.



Figura 9 Muestras de AuNP y AgNP sintetizadas previo a su liofilización. Volumen de las muestras: 250mL

El proceso de liofilización de las nanopartículas consistió en lo siguiente con ambas muestras de nanopartículas, AuNP y AgNP, realizándose el mismo protocolo. Para la preparación de la muestra a liofilizar, previamente sintetizada y con un volumen de 250mL, se dividió homogéneamente en 2 recipientes de vidrio. Ambos contenedores eran especiales del equipo de liofilización (LABCONCO™ 77540 Secador por congelación / Liofilizador), y tenían cada uno sus propias

tapas de plástico con una boquilla que iría conectada al aparato. Esta boquilla, para evitar que el producto seco ingresara al equipo, se le colocó un filtro de papel. Ambas muestras líquidas se cristalizaron por completo con ayuda del uso de hielo seco y se conectaron al equipo, cuidando de que ambas tapas cerraran por completo el contenedor. Es importante resaltar que el equipo debe estar previamente con las siguientes condiciones: a una temperatura de -25°C y a 10 atm de presión. Las muestras tardan en liofilizarse entre 1 y 2 días, aproximadamente.



Figura 10 Muestra de AuNP después de un día de liofilización, apunto de secarse completamente. Equipo del laboratorio B-02 del Dr. Manuel Aguilar en el INB.

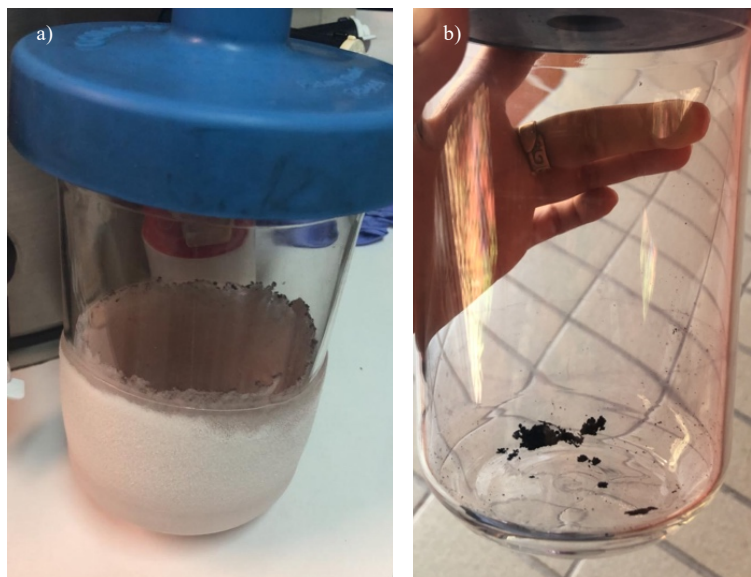


Figura 11 Muestra de AuNP donde a) muestra de AuNP previo a la liofilización tras haber sido congelada con ayuda de hielo seco y acetona b) misma muestra después de haber sido liofilizada.

2.7 Pruebas antimicrobiales. Ensayos en placa.

Las cepas bacterianas y fúngicas se cultivaron en el laboratorio de bioingeniería del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Campus Querétaro, siendo el responsable de tal laboratorio el Dr. Sujay Paul. Estas cepas se analizaron en busca de actividad antimicrobial y antimicótica, por el método de agar de difusión en disco, el cual prueba la efectividad de los antibióticos en un microorganismo específico.

Un cultivo bacteriano puro se suspende en un tampón, se estandariza la turbidez y se frota uniformemente en una placa de cultivo. A continuación, se coloca sobre la superficie del agar un disco de papel filtro que contiene el compuesto a analizar, en este caso las muestras previamente sintetizadas. Se preparan discos de aproximadamente 6 mm de diámetro, que se colocan en una placa de Petri y se esterilizan en un horno de aire caliente. El asa utilizada para administrar los compositos está hecha de alambre de calibre 20 y tiene un diámetro de 2 mm. Esto entrega 0.005 ml de solución a cada disco.

El compuesto se difunde desde el papel filtro al agar, siendo la concentración del compuesto más alta junto al disco, disminuyendo a medida que aumenta la distancia desde el disco.

Si el compuesto es eficaz contra microbios a una determinada concentración, no crecerán colonias donde la concentración en el agar sea mayor o igual que la concentración eficaz. A esta zona se le conoce como zona de inhibición.

El *screening* o cribado de las muestras se realizó mediante un ensayo de placa de la respuesta antimicrobial y fúngica, respectivamente, con pequeñas cantidades de las siguientes muestras, distribuidas en las placas de Petri:

1. Titania mesoporosa (M-TiO₂) pura (no mezclada con nanopartículas)
2. M-TiO₂ con 1mL de nanopartículas de oro (AuNP)
3. M-TiO₂ sintetizada con 2.5mL de AuNP
4. M-TiO₂ sintetizada con 4mL de AuNP
5. AuNP puras (sin mezclar con M-TiO₂)
6. AgNP puras (sin mezclar con M-TiO₂)

Se trabajó con 3 tipos de cepas bacterianas y 2 tipos de hongos. Las bacterias fueron *Citrobacter*, *E. Coli* y *Klebsiella*; y los hongos *Trichoderma* y *Fusarium*.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterizaciones por microscopía de escaneo láser confocal (CLSM)

Esta técnica no es muy común utilizarla para caracterizar nanopartículas metálicas como tal, sino es que es más utilizada para poder obtener una mejor imagen de microscopía de un tejido gracias a las propiedades de las nanopartículas. Sin embargo, el análisis del puro nanomaterial presenta múltiples ventajas; por ejemplo, puede proporcionar un análisis de la generación y agrupación de nanopartículas de plata y oro de origen químico (su proceso de síntesis), así como también obtener información acerca de las propiedades de tamaño y densidad de las mismas. En este sentido, las nanopartículas de oro sintetizadas presentaron una emisión de color verde típica de nanopartículas metálicas⁷³, mostradas en la Figura 12(a), siendo este color también escogido por su mejor visualización de las nanopartículas. Esto va acorde también con los análisis posteriores de la caracterización por espectroscopía UV-Vis demostrando que la absorbancia mayor de las nanopartículas se da en una longitud de onda correspondiente al color verde. Por ello, la solución a simple vista transmite un color rojo, color complementario al verde⁷⁴.

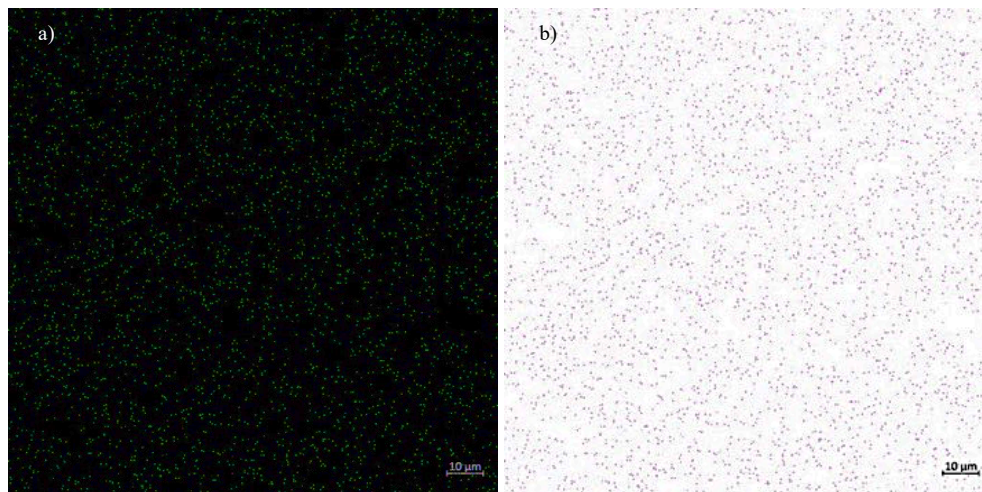


Figura 12 Imágenes de CLSM de las nanopartículas de oro (AuNP) donde a) se presenta una de las distancias recorridas por el láser

tamaño del diámetro de las AuNP.

Las imágenes muestran una dispersión de nanopartículas uniforme, con tamaño homogéneo y en estado coloidal. Sin embargo, la visualización de AuNP coloidales bajo esta caracterización se sabe que es efectiva después de los 40nm de diámetro⁷³.

3.2 Caracterizaciones por espectroscopía UV-Visible

La formación de AuNP y de AgNP depende fuertemente de las condiciones de síntesis utilizadas. La formación y reproducibilidad de distintas síntesis pudieron ser monitoreadas mediante espectroscopia UV-Vis. En la figura 13 se muestran las gráficas obtenidas después del análisis de las muestras de AuNP, bajo dos condiciones: nanopartículas sintetizadas por síntesis verde (sin sonicar) y nanopartículas igualmente sintetizadas pero sometidas a sonicación por 5 segundos con una sono-punta (a máxima intensidad). Estas dos muestras se diluyeron con 950uL de agua destilada y 50uL de la solución de nanopartículas.

Se observó que para el primer lote de partículas, sintetizadas por medio de un método verde, el plasmón correspondía a partículas esféricas (Figura 13a), ya que generó partículas que absorbían mayoritariamente a 551 nm, lo que correspondería a nanopartículas de forma esférica de un diámetro aproximado de 70nm⁷⁵.

Para un segundo lote de nanopartículas las cuales fueron sonicadas (Figura 13b), se observó que conservaban su plasmón, pero a una longitud de onda menor, 544nm, lo que correspondería a un diámetro menor de nanopartículas esféricas de entre 40-50nm.

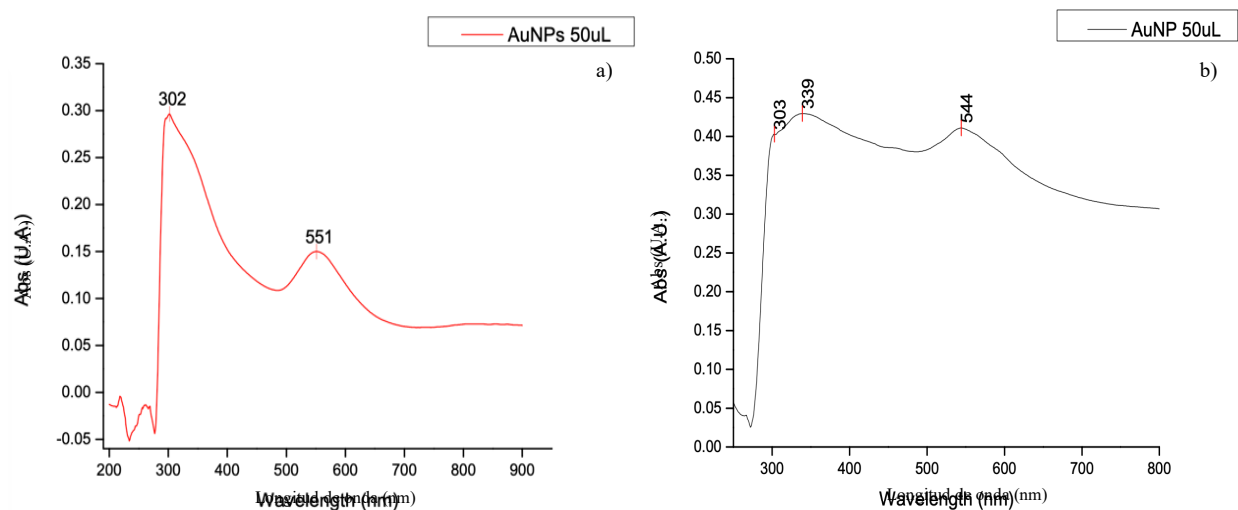


Figura 13 Espectros de las nanopartículas de oro diluidas con 950uL de agua destilada y 50uL de la solución a) sin sonicar y b) sonicadas por una sono-punta.

Para otro lote de partículas, ahora nanopartículas de plata (AgNP), se tomaron los espectros antes del lavado de la solución obtenida del extracto de toronjil (Figura 14a) y después del lavado de las muestras repitiendo 2 y 3 veces el ciclo de lavado (Figura 14b). Este procedimiento es típico de la síntesis de nanopartículas por método verde.

Al ir aumentando los lavados se reducía la tonalidad común de las AgNP, de color naranja. Esto podría indicarse que se tienen nanopartículas muy pequeñas dentro de la solución. Esto se puede observar tras realizar la caracterización de espectroscopía UV-Vis de ambas muestras lavadas.

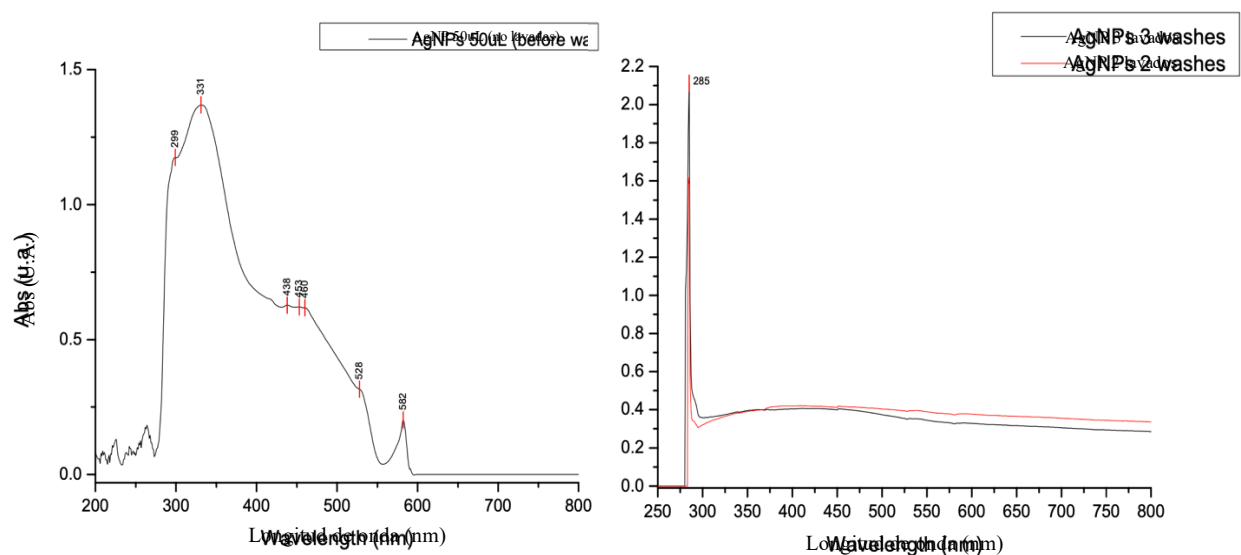


Figura 14 Espectros obtenidos de la caracterización por espectroscopía UV-Vis de las nanopartículas de plata (AgNP) a) no lavadas y b) procesadas por 2 y 3 ciclos de lavado

Los datos obtenidos de los espectros de las AgNP lavadas las cuales obtuvieron un máximo de absorción a 285nm para ambos lotes concuerdan con los datos obtenidos por el equipo de Solomon *et. al.* (2007) pudiendose estimar la formación de nanopartículas de plata con tamaños entre 10-14 nm, esto con base a las características espectrales del mismo estudio⁷⁶.

En el caso del espectro obtenido antes de lavar la solución, al tener aún residuos orgánicos por parte del extracto de toronjil, se observan distintos picos a distintas longitudes de onda. Los datos obtenidos en las longitudes de onda de 438-460nm concuerdan con los datos obtenidos de Kumar *et. al.* (2017), éstos representan la absorbancia del nitrato de plata a una concentración 3mM, concentración a la cual se preparó el precursor de plata para mezclarse con el extracto de toronjil.

También se analizaron los espectros de 25mg de titania mesoporosa diluida en 1mL de agua, así como también 25mg de titania mesoporosa sintetizada con 1, 2.5 y 4mL de AuNP por el primer método, respectivamente, diluidas con 1mL de agua cada una. En este caso se realizó la caracterización por UV-Vis para analizar su transmitancia, en lugar de la absorbancia, que es el logaritmo recíproco de la transmitancia. En la Figura 15 se pueden observar los 4 diferentes espectros de las muestras. Algo que resaltar en esta caracterización, fuera de analizar las bandas a las distintas longitudes de onda de los distintos materiales, fue que la mayoría de los espectros presentaban las mismas bandas a las mismas longitudes de onda, solo que con diferente intensidad. Esto podría indicar que no hubo como tal una absorción de las AuNP sobre la superficie de los poros de la titania mesoporosa, debido a la igualdad de espectros. Esto después se comprobó por medio de la caracterización SEM. Este espectro de absorbancia concuerda con el recíproco de los resultados obtenidos por Hong Pan *et. al.* (2005), que analizaron la transmitancia de películas de titania mesoporosa⁷⁷.

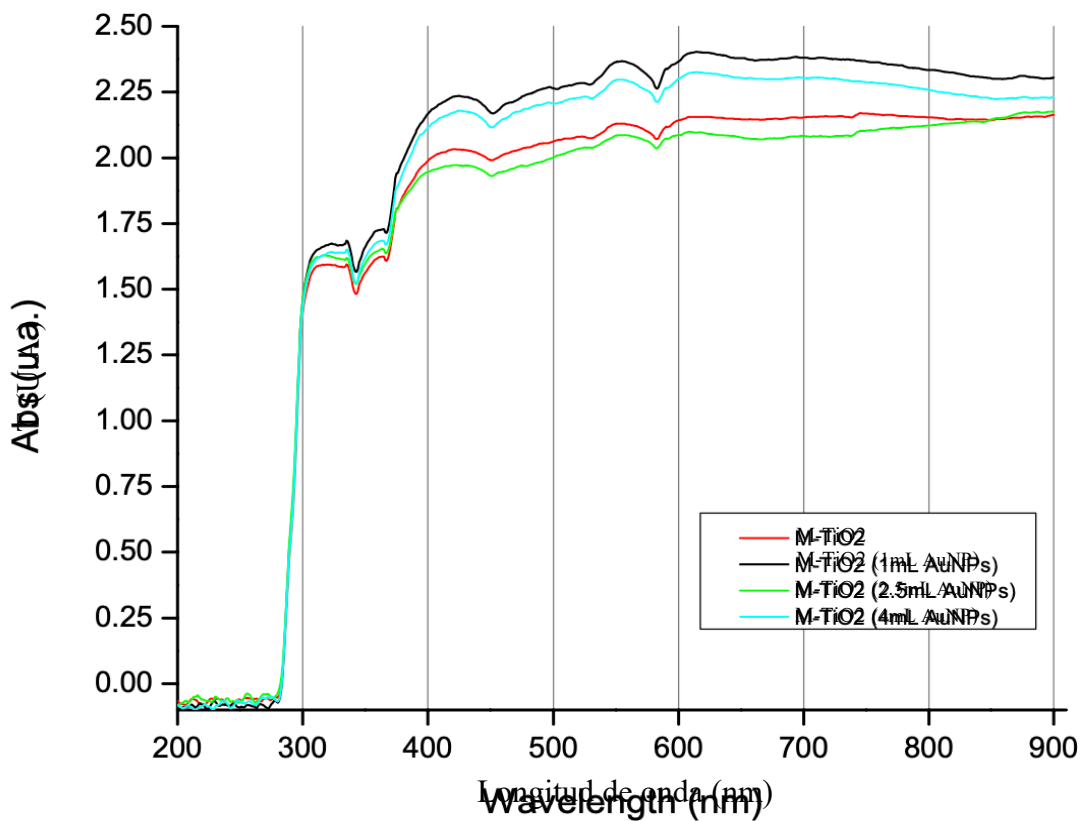


Figura 15 Espectros de UV-Vis obtenidos de titania mesoporosa sintetizada sin nanopartículas y la titania mesoporosa sintetizada con 1, 2.5 y 4mL de AuNP.

3.3 Caracterización por microscopía electrónica de barrido (SEM)

La técnica de SEM se utilizó para caracterizar la morfología superficial de la titania mesoporosa con y sin nanopartículas agregadas. Como se muestra en la Figura 16, la topografía de la M-TiO₂ sin nanopartículas denota una textura rugosa de un material poroso, con un diámetro aproximado de 50 ± 5 nm.

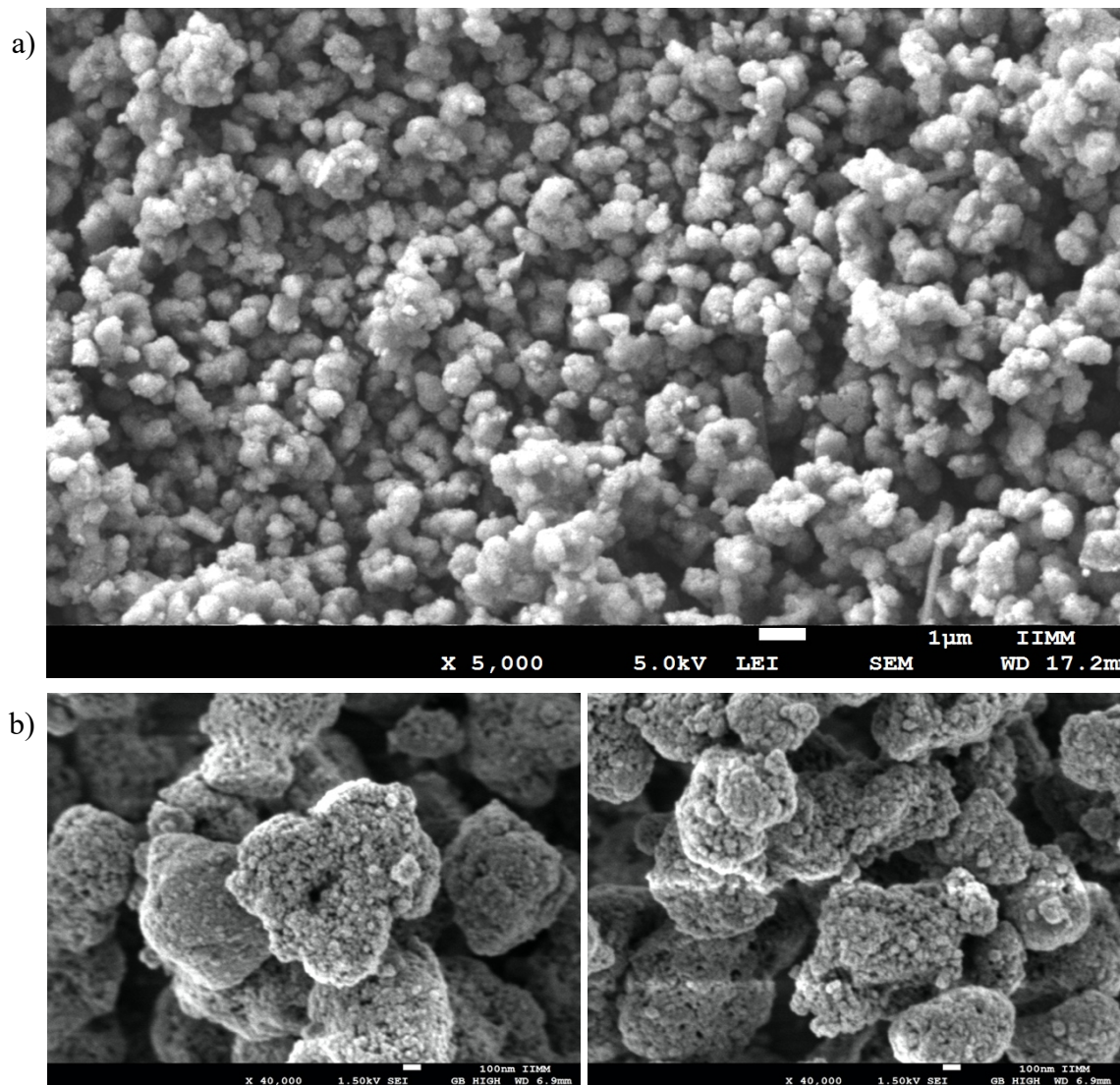


Figura 16 Imágenes en SEM de la titania mesoporosa sintetizada a 100°C a un enfoque de a) 5,000x con un detector de electrones secundarios a alto ángulo (LEI) y b) 40,000x con un detector de electrones secundarios de bajo ángulo (SEI), y en dos locaciones distintas dentro del material mesoporoso.

3.4 Caracterizaciones por difracción de rayos X (DRX)

Para la caracterización en DRX se analizaron 3 tipos de muestras: M-TiO₂ sintetizada a 100°C, M-TiO₂ calcinada a 560°C y el compuesto de M-TiO₂-AuNP obtenido por el segundo método de síntesis (solución de nanopartículas de oro a una concentración agregada a 200mg de M-TiO₂ y dejada bajo agitación horizontal por 24hrs).

Se correlacionaron los espectros de las muestras M-TiO₂ sintetizada a 100°C y M-TiO₂ calcinada a 560°C, mostrados en la Fig 16. Los patrones XRD de ambas muestras exhiben los mismos picos de difracción a 28.06°, 48.17° y 61.87° de 2θ. Estos ángulos pueden indicar una mezcla de fases propias de la titania, anatasa y rutilo^{78,79}. La muestra sin calentar muestra picos típicos de la fase anatasa. Sin embargo, al ir subiendo la temperatura de calcinación se van formando picos a los ángulos típicos ya documentados de la fase rutilo, estos se empiezan a notar alrededor de los ángulos de 25° y 34°⁷⁸. Para los ángulos a 9.01° y 18.11° son ángulos típicos de TiO₂ con una concentración de glicerolato a base de metal⁸⁰, siendo de más baja concentración la muestra sin calentar.

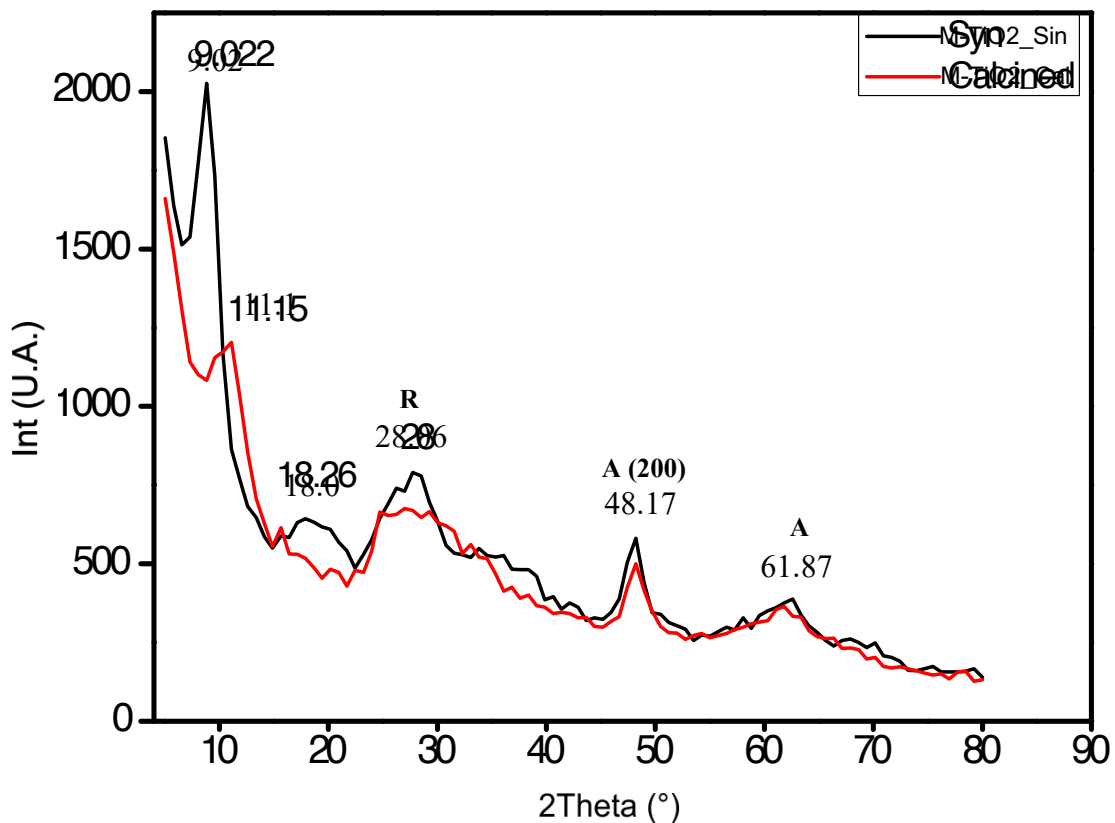


Figura 17 Difractogramas correspondientes de las muestras de M-TiO₂ sintetizada a 100°C (M-TiO₂_Sin; línea negra) y M-TiO₂ calcinada a 560°C (M-TiO₂_Cal; línea roja).

También se correlacionaron los espectros de las muestras $M\text{-TiO}_2$ sintetizada a 100°C y el compuesto de $M\text{-TiO}_2\text{-AuNP}$, mostrados en la Fig 17. De igual manera ambas muestras exhiben los mismos picos de difracción a 9.01° , 18.11° , 28.08° , 37.42° , 48.01° y 62.05° de 2θ , pero a diferente intensidad, predominando la fase anatasa en las muestras. Estos resultados fueron correlacionados con previos estudios relacionados a la composición de estas muestras^{81,82}.

Sólo el pico de difracción a 9.01° es más intenso en la muestra sin nanopartículas que la compuesta por ellas. El espectro de difracción entre los 15° y los 80° es más intenso en el compuesto que en el de la muestra de solamente $M\text{-TiO}_2$. Para el caso del ángulo de 25.06° , sólo la muestra del compuesto lo empieza a denotar, en comparación con la de la titania pura, ángulo previamente que denota una fase rutilo⁷⁸. Para los ángulos a 9.01° y 18.11° pasa lo mismo que la difracción anterior, son ángulos típicos de TiO_2 con una concentración más baja de grupos de glicerol⁸⁰.

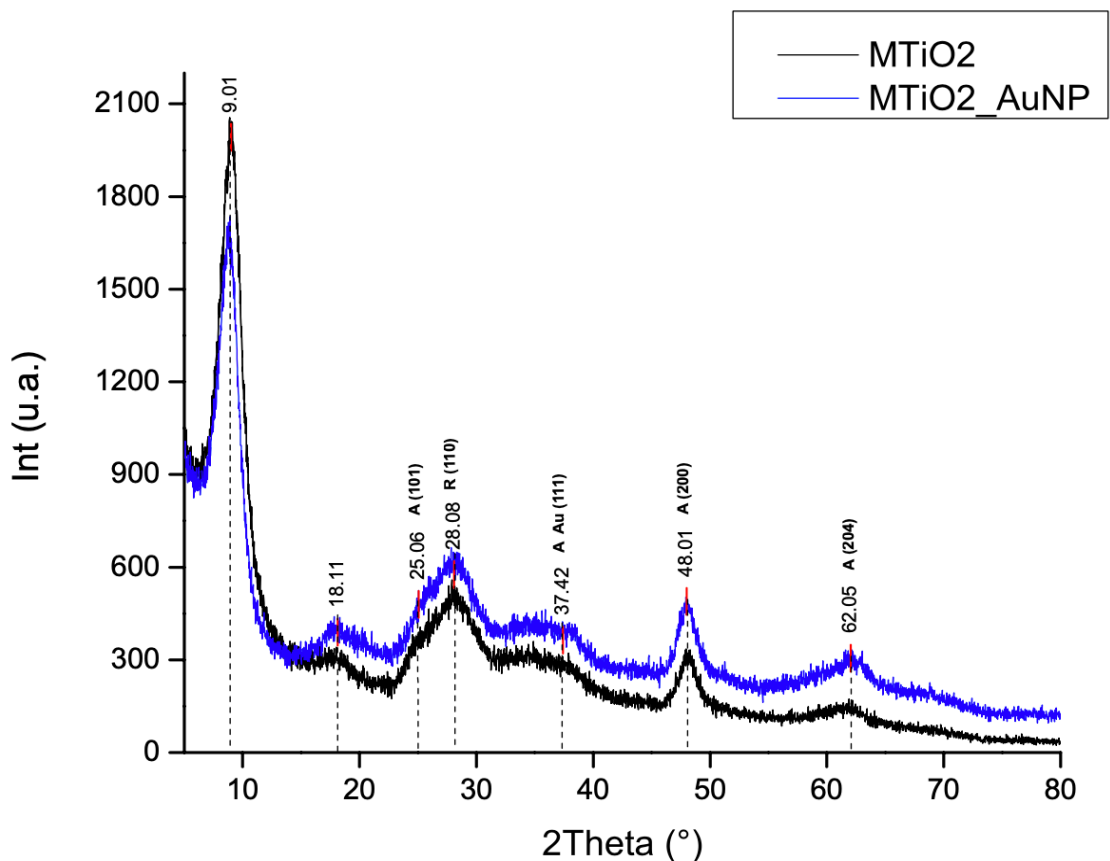


Figura 18 Difractogramas correspondientes de las muestras de $M\text{-TiO}_2$ sintetizada a 100°C ($M\text{-TiO}_2$; línea negra) y compuesto de $M\text{-TiO}_2\text{-AuNP}$ sintetizado por el primer método ($M\text{-TiO}_2\text{-AuNP}$; línea azul).

3.5 Análisis Termogravimétrico (TGA)

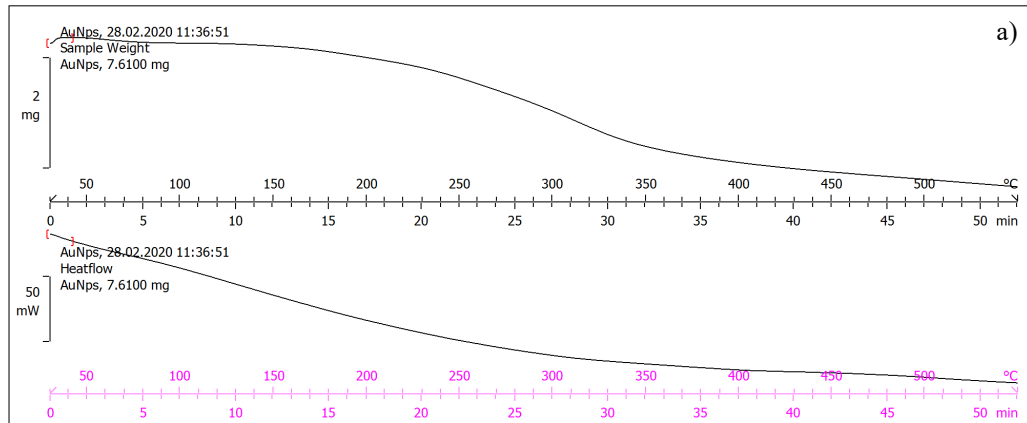
El análisis termogravimétrico obtenido tanto de las nanopartículas liofilizadas de oro como de plata (AuNP y AgNP, respectivamente) se muestra a continuación por medio de 2 tipos de gráficas. La primera fue la gráfica obtenida directamente del equipo que muestra tanto el termograma convencional con el aumento de temperatura a través del tiempo en un solo eje, y el decremento de peso y flujo de calor de la muestra, o termograma diferencial por medio de calorimetría diferencial de barrido (DSC). La segunda gráfica muestra el cambio de peso de la muestra a lo largo del tiempo y una gráfica pequeña contenida dentro de esta que muestra la derivada de la masa en función de la temperatura, pudiendo identificar la temperatura a la cual ocurren los cambios importantes de masa, es decir, donde se registra la descomposición.

La Figura 19 muestra gráficos de TGA y DSC para pirólisis y combustión a una velocidad de calentamiento de 10°C/min. El espectro TGA de las AuNP mostró una pérdida de peso significativa de éstas cuando se calentaron de 25°C a 550°C (Figuras 19a y 19c), lo que indica que, a una temperatura más alta, los compuestos orgánicos del extracto de hoja de toronjil que se encontraban aún con las AuNP quedaron completamente degradados. La Figura 19a muestra que la curva DSC casi coincide con la primera pérdida de peso en la curva TGA, observándose que la descomposición de las AuNP comienza alrededor de los 12 minutos, a 150°C. En la Figura 19c se muestra que hay un aumento de peso al principio, esto es debido al efecto después de la evaporación del disolvente, ascendiendo a sólo aproximadamente el 1.29% de la masa de muestra inicial. Después se observa una descomposición después de los 150°C que representa sólo una pérdida de masa del 34.21% (aproximadamente 2.6mg).

La curva roja en el caso de las AuNP (Figura 19c), dentro del rango de temperatura 50°-150°C se registra un aumento en la curva debido al aumento de muestra, teniendo después un efecto de evaporación del disolvente, como ya se mencionó anteriormente. La descomposición o pérdida de peso en la curva TGA se va observando después de los 100°C, lo que corresponde a la pérdida de agua. Lo importante de resaltar aquí es que aproximadamente a los 325°C - 350°C se observa la aparición de un pico endotérmico, lo que podría corresponder a la presencia de metal, en este caso de oro.

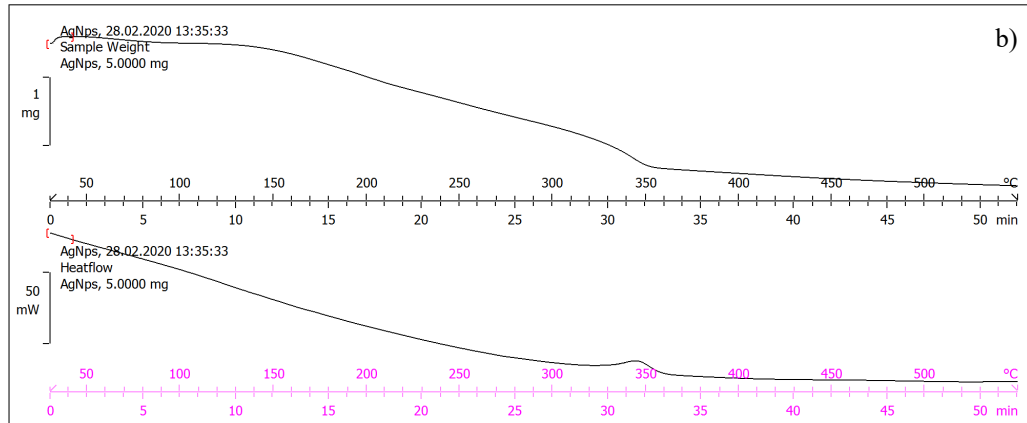
De igual manera, el espectro TGA de las nanopartículas de plata (AgNP) muestra una pérdida de peso significativa (Figuras 19b y 19d), lo que indica que también los compuestos orgánicos presentes en la muestra quedaron completamente degradados. En este caso, la cantidad de muestra cargada en el TGA fue de aproximadamente 5.0mg. En la Figura 19b se observa un aumento de peso al principio, esto es también al efecto después de la evaporación del disolvente, ascendiendo a sólo aproximadamente el 1.77% de la masa de muestra inicial, observándose en la Figura 19d. En las AgNP, la primera descomposición de éstas comienza alrededor de los 7 minutos, entre los 100°C y los 300°C, y una segunda en el rango de los 300°C - 350°C. Para la primera descomposición representa una pérdida de masa del 26.10% (1.3mg), mientras que para la segunda hay una pérdida de masa del 13.58% (0.5mg); esto se puede ver más detenidamente en la Figura 19d.

La curva roja, derivada de la masa de las AgNP con respecto a la temperatura (en Figura 19d), denota que también hay un aumento al principio de la curva correlacionado al aumento de muestra, así como también su decaimiento por el efecto de evaporación del disolvente. Sin embargo, la primera pérdida de peso es alrededor de los 100°C, lo que corresponde a la pérdida de agua; a casi los 350°C se observa la aparición de nuevo del pico endotérmico, pero a diferencia de las nanopartículas de oro, las de plata definen un pico más fino y mejor denotado. Este pico igualmente puede corresponder a la presencia de metal, plata.



Lab: METTLER

STAR^e SW 13.00



Lab: METTLER

STAR^e SW 13.00

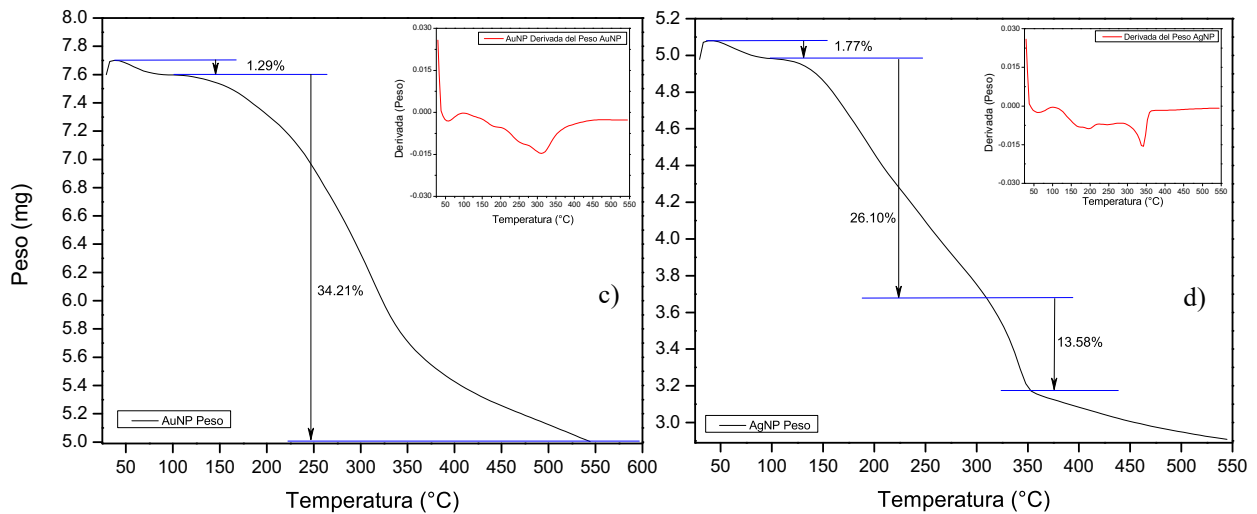


Figura 19 Termogramas de (a,c) nanopartículas de oro y (b,d) nanopartículas de plata. En las figuras 19.a y 19.b se observan las gráficas de TGA y DSC de ambos tipos de nanopartículas, respectivamente, con un peso inicial 7.6mg (AuNP) y 5.0mg (AgNP). En las figuras 19.c y 19.d se muestra la pérdida de peso por parte de las nanopartículas y su porcentaje de peso perdido (línea azul), así como en cada una de las figuras en la esquina superior derecha se muestra la gráfica de la derivada de la masa con respecto a la temperatura.

3.6 Método de análisis BET (Brunauer, Emmett, Teller)

La isoterma de fisisorción de nitrógeno diatómico (N_2) y la gráfica de distribución de tamaño de poro de la muestra de titania mesoporosa sintetizada sin nanopartículas de oro, se representan en las Figuras 20 y 21, respectivamente. Las áreas de superficie BET (Brunauer, Emmett, Teller) varían de 10 a 25 m^2/g , respecto a los datos obtenidos (ver Tabla 4). La muestra expone una isoterma de tipo IV (a) característica de los materiales porosos (77,78), con un bucle de histéresis tipo H2 (b) asociado con poros bloqueados, pero con un ancho de cuello grande (77), pudiéndose ver como poros estrechos en forma de hendidura.

Para la determinación de la distribución de tamaño de poro de la muestra, así como el volumen promedio de ellos se determinó por medio del Método BJH (Barrett-Joyner-Halenda).

La distribución de los radios de poro y el volumen acumulativo de los mismos presentan un volumen alrededor de los 0.25 – 0.30 cc/g (centímetros cúbicos/g) que va relacionado a lo expresado en la Tabla 4, así como picos centrados entre 3 y 13nm, los cuales resultan en radios de poro correspondientes con los tamaños de mesoporos esperados (Figura 21).

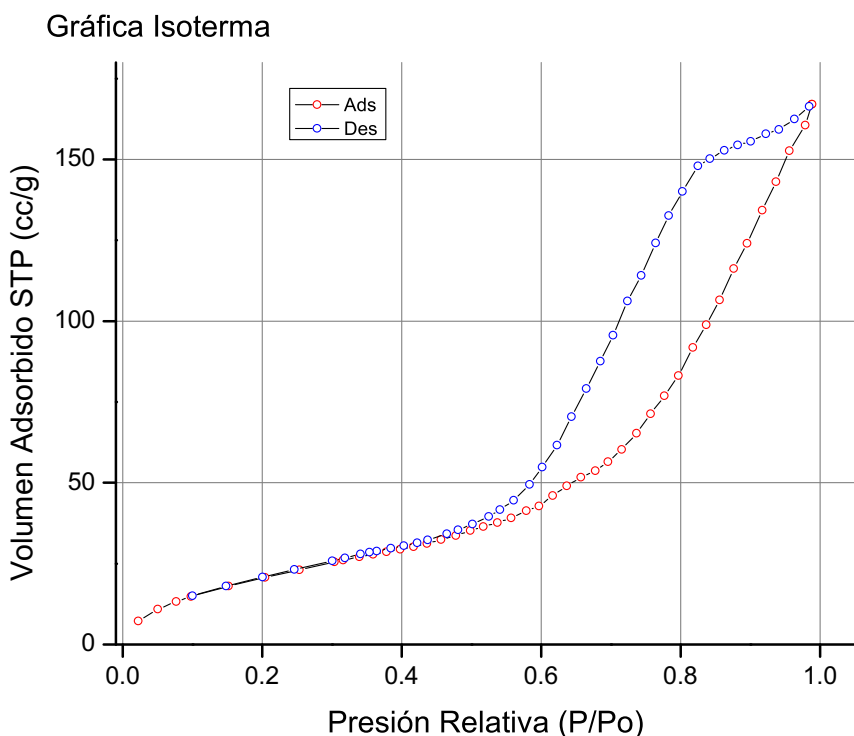


Figura 20 Isothermas de fisisorción de N_2 de la muestra de titania mesoporosa ($M-TiO_2$). La línea roja muestra la adsorción del gas sobre la superficie del material a diferentes presiones relativas. La línea azul representa la desorción de los mismos átomos adsorbidos sobre la muestra.

Gráfica - BJH Desorción dV(logr)

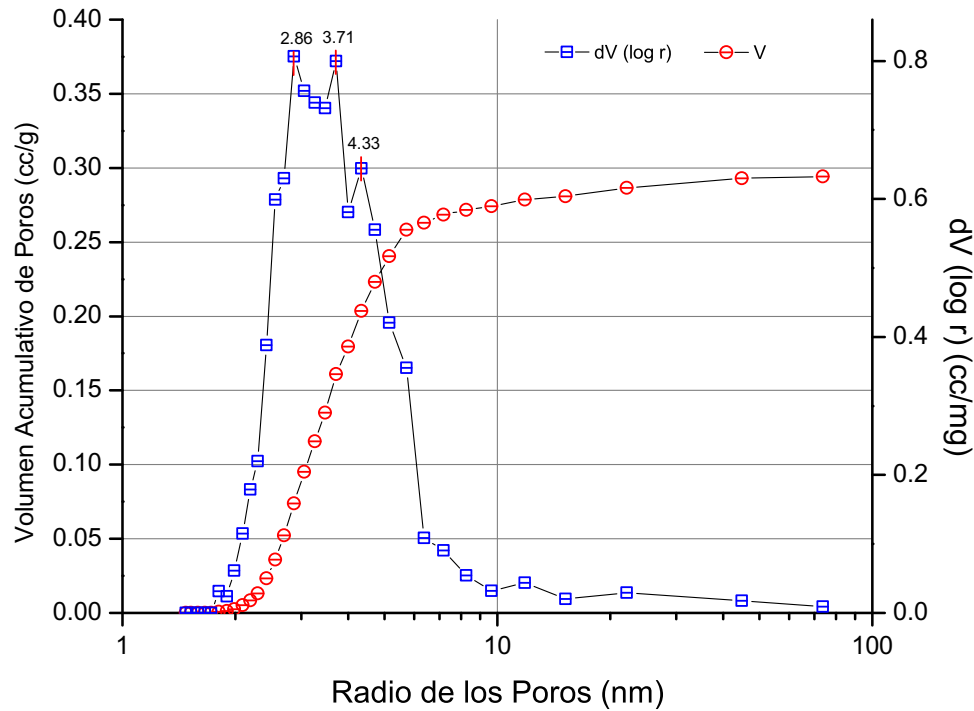


Figura 21 Diagrama de distribución de tamaño de poro de la muestra de titania mesoporosa (M-TiO₂). La línea roja representa el volumen acumulado de poros respecto al radio de los mismos. La línea azul representa el volumen de cada poro respecto a su radio.

TABLA 4 DATOS BET OBTENIDOS DE LA MUESTRA DE TITANIA MESOPOROSA

Área superficial BET (m ² /g)	Volumen de Poro (cc/g)	Tamaño de poro (nm)
10.9058	0.050217	3.8790
13.2866	0.0766313	4.9977
14.8065	0.0978613	5.8619
18.0442	0.151895	7.9415
20.7090	0.204221	9.9151
23.0640	0.253051	11.7525
25.5058	0.303586	13.6750

3.7 Ensayos de Placa

Para los ensayos en placa se utilizaron distintas cepas de bacterias y hongos en placas Petri con 6 diferentes tipos de muestras de materiales, dispuestas de manera separada dentro de ella, los cuales fueron enumerados de la siguiente forma:

1. Titania mesoporosa (M-TiO₂) pura (no mezclada con nanopartículas)
2. M-TiO₂ con 1mL de nanoparticulas de oro (AuNP)
3. M-TiO₂ sintetizada con 2.5mL de AuNP
4. M-TiO₂ sintetizada con 4mL de AuNP
5. AuNP puras (sin mezclar con M-TiO₂)
6. AgNP puras (sin mezclar con M-TiO₂)

En la Figura 22 se muestran 3 placas de Petri que contienen la misma bacteria de *E. Coli*, En cada una de las placas se dispusieron las 6 muestras previamente mencionadas. Las placas se nombraron 39G, 73 y 25. Como se ve en la imagen, las muestras de materiales de M-TiO₂ pura, la M-TiO₂ con 1mL, 2.5mL y 4mL de AuNP (muestras del 1-4) fueron las que mostraron una frontera antibacterial ante esta cepa de *E. Coli* en comparación con la de solamente tener AuNP y AgNP (muestras 5 y 6). Esto resulta interesante puesto que se sabe que las AgNP tienen muy buena respuesta antimicrobial.

*Figura 22 Ensayo en placa de las diferentes cepas bacterianas de E. Coli dispuestas en 3 placas de Petri con nombres: 39G, 73 y 25. Cada placa de Petri contiene pequeñas cantidades los 6 tipos diferentes de nanomateriales en el disco como se resume:
1) M-TiO₂, 2) M-TiO₂ con 1mL de AuNP, 3) M-TiO₂ con 2.5mL de AuNP, 4) M-TiO₂ con 4mL de AuNP, 5) AuNP puras y 6) AgNP puras.*

Se utilizó la cepa de *Citrobacter* con el mismo conjunto de las 6 muestras. Se frotaron dos cepas diferentes (blanco y negro) en 2 placas de Petri. En la figura 23 se muestra que el compuesto con 1mL, 2.5mL y 4mL de AuNP (muestras 2-4) mostró una zona de inhibición más alta que el otro material.

*Figura 23 Cajas de Petri con la cepa bacteriana de Citrobacter con los 6 tipos diferentes de materiales:
1) M-TiO₂, 2) M-TiO₂ con 1mL de AuNP, 3) M-TiO₂ con 2.5mL de AuNP,
4) M-TiO₂ con 4mL de AuNP, 5) AuNP puras y 6) AgNP puras.*

La siguiente cepa analizada para determinar la actividad antimicrobiana fue la bacteria *Klebsiella*. Se utilizó el mismo conjunto de nanomateriales para comprobar la eficacia en dos cepas diferentes (346 Azul y 33 Azul). Se observó que en una cepa la M-TiO₂ pura muestra una amplia zona de inhibición mientras que en la otra cepa el compuesto de M-TiO₂ con 4mL de AuNP mostró ser más eficiente (muestras 1 y 4, respectivamente).

*Figura 24 Placas de Petri (34G Azul y 33 Azul) con la cepa bacteriana de Klebsiella y las 6 muestras de materiales sintetizados:
1) M-TiO₂, 2) M-TiO₂ con 1mL de AuNP, 3) M-TiO₂ con 2.5mL de AuNP,
4) M-TiO₂ con 4mL de AuNP, 5) AuNP puras y 6) AgNP puras.*

Además, verificamos la respuesta antifúngica de los nanomateriales preparados anteriormente, la Figura 25 es de la cepa *Trichoderma* y la Figura 26 corresponde a la especie *Fusarium*. Se utilizaron los mismos conjuntos de nanomateriales para comprobar su eficacia frente a estas dos cepas de hongos. Ninguna zona de inhibición fu visible para ninguna de las cepas.

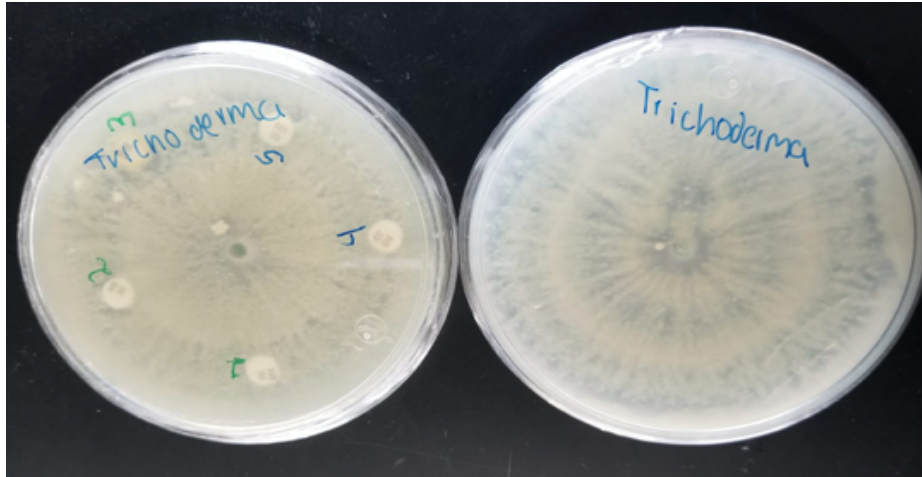


Figura 25 Placas de Petri con la cepa del hongo *Trichoderma* con las 6 muestras de materiales: 1) $M-TiO_2$, 2) $M-TiO_2$ con 1mL de AuNP, 3) $M-TiO_2$ con 2.5mL de AuNP, 4) $M-TiO_2$ con 4mL de AuNP, 5) AuNP puras y 6) AgNP puras.

Figura 26 Placas de Petri con la cepa del hongo *Fusarium* con las 6 muestras de materiales: 1) $M-TiO_2$, 2) $M-TiO_2$ con 1mL de AuNP, 3) $M-TiO_2$ con 2.5mL de AuNP, 4) $M-TiO_2$ con 4mL de AuNP, 5) AuNP puras y 6) AgNP puras.

En la Tabla 5 se muestra de una manera más clara cuales fueron los materiales que tuvieron más actividad antibacteriana y antifúngica ante cada una de las cepas.

TABLA 5 ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL Y ANTIFÚNGICA QUE MOSTRARON ALGUNOS DE LOS 6 DISTINTOS MATERIALES UTILIZADOS EN CADA UNA DE LAS CEPAS

	Materiales	<i>E.Coli</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Trichoderma</i>	<i>Fusarium</i>
1	M-TiO ₂	Sí		Sí		
2	M-TiO ₂ – 1mL AuNP	Sí	Sí			
3	M-TiO ₂ – 2.5mL AuNP	Sí	Sí			
4	M-TiO ₂ – 4mL AuNP	Sí	Sí	Sí		
5	AuNP					
6	AgNP					

Como se puede observar en la tabla, los que presentaron mayor actividad antibacterial y antifúngica fueron los materiales compuestos entre titania mesoporosa y nanopartículas de oro a un volumen mayor a 2mL (materiales 3 y 4).

CONCLUSIONES

El método por síntesis verde utilizado para sintetizar tanto nanopartículas de oro como de plata, AuNP y AgNP, respectivamente, generó una síntesis libre de químicos, fácil y barata. Las AuNP y AgNP sintetizadas eran de forma esférica, bien dispersas y estables, lo cual se confirmó por medio de SEM, DRX microscopía confocal y espectroscopía UV-vis.

A su vez, se observó que el extracto de las hojas de toronjil (*Melissa officinalis*) actuó también como agente estabilizador, por lo que no se requirió el uso de subproductos para estabilizar las nanopartículas, tales que son utilizados para funcionalizarlas y cubrir su superficie, manteniéndolas estables por más tiempo.

Empleando el proceso de síntesis del composito M-TiO₂-AuNP por medio del análogo de síntesis de alcóxidos para la titania mesoporosa no dio un resultado deseado puesto que los análisis demostraron que no hubo una adsorción de nanopartículas de oro sobre la titania. A su vez, de ésta última se pudo observar una prevalencia de la fase activa anatasa a calcinaciones bajas (menores a 600°C) sin embargo, se ve una tendencia a formar una fase rutilo al ir incrementando las temperaturas de calcinación en un proceso posterior de la síntesis del material, esto comprobándose mediante la técnica de caracterización por Difracción de Rayos X.

El sonicar las nanopartículas de oro para reducir su tamaño no afectó su morfología, como se pudo mostrar con las caracterizaciones por UV-Vis, la banda de absorción máxima solamente se redujo a una longitud de onda menor, observándose que el plasmón de ambos lotes de partículas mostraban un patrón típico de nanopartículas de oro esféricas. Se obtuvieron nanopartículas de oro con tamaño medio de 40 a 50 nm, lo que correspondería estar dentro del rango del tamaño de diámetro del mesoporo de la titania mesoporosa, el cual se comprobó más adelante por medio del análisis BET.

Al emplear el segundo proceso de síntesis de composito se demostró que hay una mejor adsorción de las nanopartículas sobre la M-TiO₂, demostrándose por medio de la caracterización por difracción de rayos X (DRX), la cual mostró espectros con mayor intensidad al utilizar nanopartículas de oro, esto debido a la resonancia de plasmones superficiales localizados gracias

a que es una nanoestructura plasmónica. Estas muestras fueron las que se utilizaron posteriormente en los ensayos de placa.

Por medio de la caracterización SEM se pudo observar la superficie del material, mostrando para el caso de la titania mesoporosa poros bien distribuidos. Corroborándose después por medio de la caracterización BET.

Utilizamos la técnica de liofilización para obtener nanopartículas de oro y plata en forma sólida que luego se utilizaron para la preparación del material compuesto.

El análisis termogravimétrico (TGA) proporcionó información esencial sobre el comportamiento de las muestras de nanopartículas metálicas (oro y plata) al incrementar la temperatura en un rango determinado de tiempo; es una herramienta valiosa para comprender los eventos térmicos asociados con los nanomateriales. Se encontró que al perder un porcentaje de peso alrededor de los 34 - 40%, se puede asociar a los residuos orgánicos de las muestras obtenidas por medio de síntesis verde aún presentes incluso después del tratamiento de lavado y de liofilización de las muestras.

El análisis por medio del método de BET fue fundamental para saber la distribución de volumen de los poros y del radio de los mismos de la muestra de titania mesoporosa, comprobándose que se tenían radios de poro dentro del rango de los mesoporos (2-50nm).

Los ensayos antimicrobianos se llevaron a cabo con una muestra que se preparó previamente simplemente mezclando diferentes alicuotas de nanopartículas de oro sintetizados en M-TiO₂.

El estudio inicial de la prueba de difusión en disco demostró que los nanomateriales resultaron eficaces para cepas bacterianas, mientras que con las cepas fúngicas no hubo un efecto antifúngico pronunciado. Como observamos, en el ensayo del disco hubo incluso una buena demostración por parte de la M-TiO₂ pura de una buena zona de inhibición para las especies de *Klebsiella* y con otras especies bacterianas; sin embargo, el material compuesto con mayor concentración de AuNP estaba funcionando mejor.

Para las especies de hongos puede que al haber una mayor concentración del nanomaterial llegué a funcionar mejor la respuesta antifúngica; empero, este es sólo un estudio preliminar para verificar

las propiedades antimicrobianas de los nanomateriales y están mostrando algunos resultados prometedores. Se requieren más estudios de optimización variando la concentración de nanomateriales y también comprobando la eficacia antimicrobiana de los compuestos con otras cepas microbianas.

El TiO_2 se considera un valioso agente antimicrobiano debido a su actividad fotocatalítica y propiedades de autolimpieza. Como sabemos, la implantación es un aspecto desafiante de la ciencia médica, ya que los materiales del implante se mantienen dentro del cuerpo de forma permanente o durante períodos más largos para aliviar el dolor y el sufrimiento. Sin embargo, los implantes a menudo se tratan como materiales extraños dañinos y son rechazados por el sistema inmunológico humano. La excelente biocompatibilidad del TiO_2 poroso y sus propiedades antimicrobianas, las estructuras 3D se han propuesto como materiales prometedores para reducir la infección crónica relacionada con los implantes. La consistencia y eficacia de la nanoconstrucción de bioingeniería es un tema muy importante y requieren una comprensión profunda de los nanomateriales. A través de este proyecto intentamos potenciar el desempeño antimicrobiano del nanocompuesto diseñado para su posible aplicación biomédica.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme el espacio para desarrollar este proyecto, así como también al Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Campus Querétaro; al Dr. Sujay Paul por su apoyo en los ensayos de placa; al Dr. José Luis Miranda por el apoyo brindado en la síntesis de nanopartículas de oro así como en la caracterización de muestras por Termogravimetría; al Dr. Rodrigo Alonso Esparza por el apoyo en la caracterización de muestras por medio de SEM; al M. en C. Gustavo A. Molina por el apoyo en la caracterización de muestras por microscopía confocal; al Dr. Ravichandran Manisekaran por su apoyo brindado para la liofilización de muestras así como al Dr. Manuel Aguilar Ramírez y a su equipo de laboratorio por facilitarme el uso del equipo de liofilización así como también su apoyo al instruirme cómo usarlo; al Dr. Josué D. Mota y a su equipo de laboratorio por su apoyo en permitirme usar el agitador orbital y otras herramientas de laboratorio, así como instruirme en cómo utilizar el equipo; a la Dra. Miriam Estevez por el apoyo brindado para la corrección del protocolo de tesis así como este documento; y a la Dra. Padmavati Sahare, mi tutora, porque sin su apoyo constante no hubiera podido llegar a completar este proyecto.

REFERENCIAS.

1. Guzong, Cao; Wang Y. *Nanostructures and Nanomaterials: Synthesis, Properties, and Applications.*; 2004. doi:10.1155/2013/101836
2. Callister WD. *Materials Science and Engineering: An Introduction.* Vol 226. John Wiley & Sons, Inc.; 2007.
3. Sayes CM, Wahi R, Kurian PA, et al. Correlating nanoscale titania structure with toxicity: A cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. *Toxicol Sci.* 2006;92(1):174-185. doi:10.1093/toxsci/kfj197
4. Atefyekta S, Ercan B, Karlsson J, et al. Antimicrobial performance of mesoporous titania thin films: Role of pore size, hydrophobicity, and antibiotic release. *Int J Nanomedicine.* 2016;11:977-990. doi:10.2147/IJN.S95375
5. Shukla R, Bansal V, Chaudhary M, Basu A, Bhonde RR, Sastry M. Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: A microscopic overview. *Langmuir.* 2005;21(23):10644-10654. doi:10.1021/la0513712
6. Li Y, Schluesener HJ, Xu S. Gold nanoparticle-based biosensors. *Gold Bull.* 2010;43(1):29-41. doi:10.1007/BF03214964
7. Zhang Y, Shareena Dasari TP, Deng H, Yu H. Antimicrobial Activity of Gold Nanoparticles and Ionic Gold. *J Environ Sci Heal - Part C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2015;33(3):286-327. doi:10.1080/10590501.2015.1055161
8. Hasirci V, Hasirci N. Introduction. In: *Fundamentals of Biomaterials.* Springer New York; 2018:1-14. doi:10.1007/978-1-4939-8856-3_1
9. Harding JL, Reynolds MM. Combating medical device fouling. *Trends Biotechnol.* 2014;32(3):140-146. doi:10.1016/j.tibtech.2013.12.004
10. Pişkin E. Review Biodegradable Polymers as Biomaterials. *J Biomater Sci Polym Ed.* 1995;6(9):775-795. doi:10.1163/156856295X00175
11. Shelke NB, James R, Laurencin CT, Kumbar SG. Polysaccharide biomaterials for drug delivery and regenerative engineering. *Polym Adv Technol.* 2014;25(5):448-460. doi:10.1002/pat.3266

12. Dhandayuthapani B, Yoshida Y, Maekawa T, Kumar DS. Polymeric scaffolds in tissue engineering application: A review. *Int J Polym Sci.* 2011;2011. doi:10.1155/2011/290602
13. Jeong B, Bae YH, Kim SW. Thermoreversible gelation of PEG-PLGA-PEG triblock copolymer aqueous solutions. *Macromolecules.* 1999;32(21):7064-7069. doi:10.1021/ma9908999
14. Fusaro L, Calvo Catoira M, Ramella M, et al. Polylysine Enriched Matrices: A Promising Approach for Vascular Grafts. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8:0-13. doi:10.3389/fbioe.2020.00281
15. Stratton S, Shelke NB, Hoshino K, Rudraiah S, Kumbar SG. Bioactive polymeric scaffolds for tissue engineering. *Bioact Mater.* 2016;1(2):93-108. doi:10.1016/j.bioactmat.2016.11.001
16. Kurtz S, Ong K, Lau E, Mowat F, Halpern M. Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030. *J Bone Jt Surg - Ser A.* 2007;89(4):780-785. doi:10.2106/JBJS.F.00222
17. Cobelli N, Scharf B, Crisi GM, Hardin J, Santambrogio L. Mediators of the inflammatory response to joint replacement devices. *Nat Rev Rheumatol.* 2011;7(10):600-608. doi:10.1038/nrrheum.2011.128
18. Hubbell JA, Langer R. Translating materials design to the clinic. *Nat Mater.* 2013;12(11):963-966. doi:10.1038/nmat3788
19. Fattahi P, Yang G, Kim G, Abidian MR. A review of organic and inorganic biomaterials for neural interfaces. *Adv Mater.* 2014;26(12):1846-1885. doi:10.1002/adma.201304496
20. Farra R, Sheppard NF, McCabe L, et al. First-in-human testing of a wirelessly controlled drug delivery microchip. *Sci Transl Med.* 2012;4(122):122ra21. doi:10.1126/scitranslmed.3003276
21. Nichols SP, Koh A, Storm WL, Shin JH, Schoenfisch MH. Biocompatible materials for continuous glucose monitoring devices. *Chem Rev.* 2013;113(4):2528-2549. doi:10.1021/cr300387j
22. Philbert MA, Sayes CM. Nanotoxicology. In: *Comprehensive Toxicology, Second Edition.* Vol 2. Elsevier Inc.; 2010:707-715. doi:10.1016/B978-0-08-046884-6.00240-2

23. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol.* 2008;20(2):86-100. doi:10.1016/j.smim.2007.11.004
24. Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: Therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med.* 2012;18(7):1028-1040. doi:10.1038/nm.2807
25. Newsholme P, Cruzat VF, Keane KN, Carlessi R, De Bittencourt PIH. Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes. *Biochem J.* 2016;473(24):4527-4550. doi:10.1042/BCJ20160503C
26. Ward WK. A review of the foreign-body response to subcutaneously-implanted devices: The role of Macrophages and cytokines in biofouling and fibrosis. In: *Journal of Diabetes Science and Technology.* Vol 2. ; 2008:768-777. doi:10.1177/193229680800200504
27. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(1):23-35. doi:10.1038/nri978
28. Grainger DW. All charged up about implanted biomaterials. *Nat Biotechnol.* 2013;31(6):507-509. doi:10.1038/nbt.2600
29. Sussman EM, Halpin MC, Muster J, Moon RT, Ratner BD. Porous implants modulate healing and induce shifts in local macrophage polarization in the foreign body reaction. *Ann Biomed Eng.* 2014;42(7):1508-1516. doi:10.1007/s10439-013-0933-0
30. Moriarty TF, Zaat SAJ, Busscher HJ. Biomaterial-associated infection: A perspective from the clinic. In: *Biomaterials Associated Infection: Immunological Aspects and Antimicrobial Strategies.* Springer New York; 2013:1-566. doi:10.1007/978-1-4614-1031-7
31. Gristina AG. Biomaterial-centered infection: Microbial adhesion versus tissue integration. *Science (80-).* 1987;237(4822):1588-1595. doi:10.1126/science.3629258
32. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol.* 2004;2(2):95-108. doi:10.1038/nrmicro821
33. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(4):999-1007. doi:10.1128/AAC.45.4.999-1007.2001
34. Moore SL, Payne DN. Types of Antimicrobial Agents. In: *Russell, Hugo and Ayliffe's*

Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization: Fourth Edition.
Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd; 2008:8-97. doi:10.1002/9780470755884.ch2

35. Musil J. Flexible antibacterial coatings. *Molecules*. 2017;22(5):813. doi:10.3390/molecules22050813
36. Vasilev K, Cavallaro A, Zilm P. Antibacterial materials and coatings. *Molecules*. 2018;23(3). doi:10.3390/molecules23030585
37. Brook LA, Evans P, Foster HA, et al. Highly bioactive silver and silver/titania composite films grown by chemical vapour deposition. *J Photochem Photobiol A Chem*. 2007;187(1):53-63. doi:10.1016/j.jphotochem.2006.09.014
38. Stensberg MC, Wei Q, McLamore ES, Porterfield DM, Wei A, Sepúlveda MS. Toxicological studies on silver nanoparticles: Challenges and opportunities in assessment, monitoring and imaging. *Nanomedicine*. 2011;6(5):879-898. doi:10.2217/nmm.11.78
39. Escobar A, Muzzio N, Coy E, et al. Antibacterial Mesoporous Titania Films with Embedded Gentamicin and Surface Modified with Bone Morphogenetic Protein 2 to Promote Osseointegration in Bone Implants. *Adv Mater Interfaces*. 2019;6(9):1801648. doi:10.1002/admi.201801648
40. Mo S Di, Ching WY. Electronic and optical properties of three phases of titanium dioxide: Rutile, anatase, and brookite. *Phys Rev B*. 1995;51(19):13023-13032. doi:10.1103/PhysRevB.51.13023
41. Wu KCW, Yamauchi Y, Hong CY, et al. Biocompatible, surface functionalized mesoporous titania nanoparticles for intracellular imaging and anticancer drug delivery. *Chem Commun*. 2011;47(18):5232-5234. doi:10.1039/c1cc10659g
42. Zhang J, Guo W, Li Q, Wang Z, Liu S. The effects and the potential mechanism of environmental transformation of metal nanoparticles on their toxicity in organisms. *Environ Sci Nano*. 2018;5(11):2482-2499. doi:10.1039/c8en00688a
43. Giese B, Klaessig F, Park B, et al. Risks, Release and Concentrations of Engineered Nanomaterial in the Environment. *Sci Rep*. 2018;8(1):1-18. doi:10.1038/s41598-018-19275-4
44. Hochella MF, Mogk DW, Ranville J, et al. Natural, incidental, and engineered

- nanomaterials and their impacts on the Earth system. *Science* (80-). 2019;363(6434). doi:10.1126/science.aau8299
45. Irvani S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chem.* 2011;13(10):2638-2650. doi:10.1039/c1gc15386b
 46. Ponnuchamy K, Jacob JA. Metal nanoparticles from marine seaweeds - A review. *Nanotechnol Rev.* 2016;5(6):589-600. doi:10.1515/ntrev-2016-0010
 47. Hulkoti NI, Taranath TC. Biosynthesis of nanoparticles using microbes-A review. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2014;121:474-483. doi:10.1016/j.colsurfb.2014.05.027
 48. Kuppusamy P, Yusoff MM, Maniam GP, Govindan N. Biosynthesis of metallic nanoparticles using plant derivatives and their new avenues in pharmacological applications – An updated report. *Saudi Pharm J.* 2016;24(4):473-484. doi:10.1016/j.jsps.2014.11.013
 49. Thakkar KN, Mhatre SS, Parikh RY. Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 2010;6(2):257-262. doi:10.1016/j.nano.2009.07.002
 50. Dahl M, Liu Y, Yin Y. Composite titanium dioxide nanomaterials. *Chem Rev.* 2014;114(19):9853-9889. doi:10.1021/cr400634p
 51. Lee SL, Scott J, Chiang K, Amal R. Nanosized metal deposits on titanium dioxide for augmenting gas-phase toluene photooxidation. *J Nanoparticle Res.* 2009;11(1):209-219. doi:10.1007/s11051-008-9469-x
 52. Chiarello GL, Aguirre MH, Selli E. Hydrogen production by photocatalytic steam reforming of methanol on noble metal-modified TiO₂. *J Catal.* 2010;273(2):182-190. doi:10.1016/j.jcat.2010.05.012
 53. Abdel-Raouf N, Al-Enazi NM, Ibraheem IBM. Green biosynthesis of gold nanoparticles using *Galaxaura elongata* and characterization of their antibacterial activity. *Arab J Chem.* 2017;10:S3029-S3039. doi:10.1016/j.arabjc.2013.11.044
 54. Sahayaraj K, Rajesh S. Bionanoparticles: Synthesis and antimicrobial applications. *Sci against Microb Pathog* 2011:228-244. <https://www.researchgate.net/publication/216807433>. Accessed April 29, 2020.

55. Camacho AS. Journal Nano Science and Technology » Focusing nanoplasmonics. *J Nano Sci Technol*. 2017;8-11. <http://www.journalnano.org/?p=98>. Accessed April 30, 2020.
56. Zielińska-Jurek A. Progress, challenge, and perspective of bimetallic TiO₂-based photocatalysts. *J Nanomater*. 2014;2014:1-17. doi:10.1155/2014/208920
57. Maier SA. *Plasmonics: Fundamentals and Applications*. Springer US; 2007. doi:10.1007/0-387-37825-1
58. Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR. *Principios de Análisis Instrumental*. Sexta Ed. (Sergio Cervantes González, ed.). Cengage Learning, Inc.; 2008.
59. Lichtman JW. Microscopía confocal | Investigación y Ciencia | Investigación y Ciencia. <https://www.investigacionyciencia.es/revistas/investigacion-y-ciencia/la-vida-cotidiana-en-el-neolitico-195/microscopa-confocal-2991>. Accessed May 1, 2020.
60. Pawley JB. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. Third. Springer US; 2006. doi:10.1007/978-0-387-45524-2
61. Labrada G, Peña AI. Microscopio Electrónico de Barrido (SEM). [linan-ipicyt.mx](http://www.linan-ipicyt.mx). http://www.linan-ipicyt.mx/Microscopio_de_Barrido.html. Published 2017. Accessed May 1, 2020.
62. Hiemenz PC, Rajagopalan R, Rajagopalan R. *Principles of Colloid and Surface Chemistry, Revised and Expanded*. CRC Press; 2016. doi:10.1201/9781315274287
63. BET surface area. MCA Services. [http://www.mcaservices.co.uk/bet surface area.htm](http://www.mcaservices.co.uk/bet%20surface%20area.htm). Accessed June 22, 2020.
64. Mortimer RG. *Physical Chemistry*. 3rd Editio. London; 2008.
65. Brunauer S. The Adsorption of Gases and Vapors. Volume I: Physical Adsorption. *Read books*. 2008;1:524. doi:10.1021/ed021p52.1
66. Hubbard AT. *Encyclopedia of Surface and Colloid Science, Third Edition.*; 2015. doi:10.1081/e-escs3
67. Thommes M, Kaneko K, Neimark A V., et al. Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem*. 2015;87(9-10):1051-1069. doi:10.1515/pac-2014-1117

68. Sotomayor FJ, Cychosz KA, Thommes M. Characterization of Micro/Mesoporous Materials by Physisorption: Concepts and Case Studies. *Acc Mater Surf Res*. 2018;3(2):34-50.
69. Lowell S, Shields JE, Thomas MA, Thommes M. *Characterisation of Porous Solids and Powders*.; 2004. doi:10.1007/978-1-4020-2303-3
70. Parr RG, Weitao Y. *Density-Functional Theory of Atoms and Molecules*.; 1994. doi:10.1524/zpch.1995.191.part_2.277a
71. Guides I. Lyophilization of Parenteral (7/93). 2015:1-23. <https://www.fda.gov/inspections-compliance-enforcement-and-criminal-investigations/inspection-guides/lyophilization-parenteral-793>. Accessed May 2, 2020.
72. Borjas-Garcia SE, Sahare P, Dasgupta-Schubert N, et al. Synthesis of Mesoporous Titania by Using Alkoxide Precursor and CTAB as Template. *Microsc Microanal*. 2018;24(S1):394-395. doi:10.1017/s1431927618002465
73. Klein S, Petersen S, Taylor U, Rath D, Barcikowski S. Quantitative visualization of colloidal and intracellular gold nanoparticles by confocal microscopy. *J Biomed Opt*. 2010;15(3):036015. doi:10.1117/1.3461170
74. No Author. Color Wheel - Color Calculator | Sessions College. Sessions College. <https://www.sessions.edu/color-calculator/>. Published 2018. Accessed May 2, 2020.
75. No Author. Gold Nanoparticles: Properties and Applications | Sigma-Aldrich. *Sigma-Aldrich Co*. 2016. <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/materials-science/nanomaterials/gold-nanoparticles.html>. Accessed May 4, 2020.
76. Solomon SD, Bahadory M, Jeyarajasingam A V, Rutkowsky SA, Boritz C, Mulfinger L. Synthesis and study of silver nanoparticles. *J Chem Educ*. 2007;84(2):322-325. doi:10.1021/ed084p322
77. Pan JH, Lee WI. Selective control of cubic and hexagonal mesophases for titania and silica thin films with spin-coating. *New J Chem*. 2005;29(6):841-846. doi:10.1039/b417310d
78. Mendoza-Anaya D, Salas P, Angeles-Chávez C, Pérez-Hernández R, Castaño VM. Caracterización microestructural y morfología de TiO₂ para aplicaciones termoluminiscentes. *Rev Mex Fis*. 2004;50(SUPPL.):12-16.

79. Innocenzi P, Malfatti L, Kidchob T, et al. Correlative analysis of the crystallization of sol-gel dense and mesoporous anatase titania films. *J Phys Chem C*. 2010;114(51):22385-22391. doi:10.1021/jp1042766
80. Pan L, Ai M, Huang C, et al. Manipulating spin polarization of titanium dioxide for efficient photocatalysis. *Nat Commun*. 2020;11(1):1-9. doi:10.1038/s41467-020-14333-w
81. Gennequin C, Lamallem M, Cousin R, et al. Total oxidation of volatile organic compounds on Au/Ce-Ti-O and Au/Ce-Ti-Zr-O mesoporous catalysts. In: *Journal of Materials Science*. Vol 44. Springer; 2009:6654-6662. doi:10.1007/s10853-009-3631-4
82. Khan MM, Kalathil S, Lee J, Cho MH. Enhancement in the photocatalytic activity of Au@TiO₂ nanocomposites by pretreatment of TiO₂ with UV light. *Bull Korean Chem Soc*. 2012;33(5):1753-1758. doi:10.5012/bkcs.2012.33.5.1753