



SEP
SECRETARÍA
DE EDUCACIÓN
PÚBLICA



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE ORIZABA

DIVISIÓN DE ESTUDIO DE POSGRADOS E INVESTIGACIÓN

TESIS PROFESIONAL

“Estudio de la deposición de puntos de plata sobre nanopartículas de dióxido de titanio para su posible aplicación como antimicrobial y antimicótico”

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA**

PRESENTA

Ing. Marco Antonio Olivares Ramírez

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Leticia López Zamora

CODIRECTOR DE TESIS

Dr. José Amír González Calderón



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Orizaba
División de Estudios de Posgrado e Investigación

Orizaba, Ver., 26/enero/2021
Asunto: Autorización de Impresión
OPCIÓN: I

**C. MARCO ANTONIO OLIVARES RAMÍREZ
CANDIDATO A GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA
PRESENTE**

De acuerdo con el Reglamento de Titulación vigente de los Centros de Enseñanza Técnica Superior, dependiente de la Dirección General de Institutos Tecnológicos de la Secretaría de Educación Pública y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Revisora le hizo respecto a su Trabajo Profesional titulado:

“ESTUDIO DE LA DEPOSICIÓN DE PUNTOS DE PLATA SOBRE
NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITANIO PARA SU POSIBLE APLICACIÓN COMO ANTIMICROBIAL Y
ANTIMICÓTICO”.

Comunico a Usted que este Departamento concede su autorización para que proceda a la impresión del mismo.

ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica®
Ciencia – Técnica - Cultura®



**DR. MARIO LEONCIO ARRIJOJA RODRÍGUEZ
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

ccp. Archivo



Avenida Oriente 9 No. 852
Col. Emiliano Zapata, C.P. 94320
Orizaba, Veracruz, México.
Teléfono: 272-110-53-60
Email: depi_orizaba@tecnm.mx
www.orizaba.tecnm.mx





"2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria"

Orizaba, Veracruz, **Diciembre 14, de 2020**

Asunto: Revisión de trabajo escrito

C. MARIO LEONCIO ARRIJOJA RODRÍGUEZ
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
PRESENTE.-

Los que suscriben, miembros del jurado, han realizado la revisión de la Tesis del (la) C.
MARCO ANTONIO OLIVARES RAMÍREZ

La cual lleva el título de:

**ESTUDIO DE LA DEPOSICIÓN DE PUNTOS DE PLATA SOBRE
NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITANIO PARA SU POSIBLE APLICACIÓN COMO
ANTIMICROBIAL Y ANTIMICÓTICO**

Y concluyen que se acepta.

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica®
CIENCIA - TÉCNICA - CULTURA®

PRESIDENTE: DRA. LETICIA LÓPEZ ZAMORA

FIRMA

SECRETARIO: DRA. ROSALÍA CERECERO ENRÍQUEZ

FIRMA

VOCAL: DR. EUSEBIO BOLAÑOS REYNOSO

FIRMA

VOCAL SUP.: DR. JOSÉ AMIR GONZÁLEZ CALDERÓN

FIRMA

FTI-TI-013



Declaración

Yo, Marco Antonio Olivarez Ramírez, certifico que esta tesis, que tiene una extensión de 116 cuartillas, ha sido escrita por mí y constituye el registro escrito del trabajo de tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Química bajo la asesoría y dirección de Dra. Leticia López Zamora y Dr. José Amir González Calderón y no ha sido sometida en ningún otra institución previamente.

Fui admitido como estudiante de la maestría en agosto del 2018 y mi trabajo de tesis fue liberado para su impresión el 15 de enero del 2021

También declaro que, al presentar esta tesis, el Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Orizaba tiene permiso para publicarla en formato electrónico bajo las regulaciones propias de la institución y que si existe algún acuerdo de confidencialidad de la información lo haré saber en forma escrita para que se omitan las secciones correspondientes.

Fecha: 15 de enero de 2021

Firma: 

Vo. Bo.

Asesor: Dra. Leticia López Zamora

Firma del asesor: 



"2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria"

OFICIO No. 342/DEPI/MCIQ/2020
Asunto: Carta de liberación de Plagio

Dra. OFELIA LANDETA ESCAMILLA
COORDINADOR DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN
INGENIERÍA QUÍMICA
PRESENTE

Por este conducto me permito informarle que en base a los resultados obtenidos por el software institucional de la institución es posible afirmar que el porcentaje de plagio de la tesis es menor al máximo permitido por el Consejo Académico. La tesis analizada corresponde al C. **Marco Antonio Olivares Ramírez** con número de control **M13010113**, perteneciente al programa de posgrado de **Maestría en Ciencias en Ingeniería Química** cuyo título de su tema de tesis es: **Estudio de la deposición de puntos de plata sobre nanopartículas de dióxido de titanio para su posible aplicación como antimicrobial y antimicótico** el cual está dirigido por la **Dra. Dra. Leticia López Zamora**.

En base a la descrito anteriormente, se establece la tesis como **LIBERADA DE PLAGIO**.

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo,

ATENTAMENTE
EXCELENCIA EN EDUCACION TECNOLOGICA®
Ciencia-Técnica-Cultura®

Dr. Oscar Osvaldo Sandoval González
Encargado Institucional para el Análisis de Plagio
C.p.p. Coordinación académica
C.p.p. Archivo

M00-PM-PLAGIO-F03



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero dar gracias a Dios por permitirme llegar hasta estas instancias y por tener la dicha de contar con mi familia en todo momento. Agradezco a mis padres Alicia y Arturo así como a mi hermano Javier por brindarme todo su apoyo, por motivarme a seguir adelante y sobre todo por el cariño y amor que me demuestran día a día. Tengo en cuenta todos los sacrificios que hicieron, los altibajos por los que atravesamos, gracias por todo eso y más.

A mis profesores de la MCIQ, que me formaron como profesionista al transmitirme sus conocimientos, experiencias, y por el esfuerzo en ayudarme a llegar a este punto. Agradezco a mi asesora, la Dra. Leticia, por confiar en mí desde un principio, por su paciencia, el apoyo y enseñanza. A mi coasesor, el Dr. Amir, por permitirme realizar la estancia en la UASLP, por la confianza, el apoyo, el consejo y por todo el conocimiento nuevo que adquirí. A mi coordinadora, la Dra. Ofelia, por su tolerancia y paciencia, por siempre estar a la disposición de cualquier situación y por su ayuda a lo largo del posgrado.

A mis amigos. César, por darme su apoyo incondicional aún en la distancia, por aconsejarme y por confiar en mí, siempre motivándome a ser mejor. A Héctor, Adolfo, Federico y Catalina, por brindarme una amistad tan bella e incondicional, por darme su compañía dentro y fuera de la escuela, por todos los momentos y vivencias que compartimos juntos. Adriana, por el tiempo y el apoyo que me dedicó cuando estuve en San Luis, por toda la confianza que tiene en mí como persona, por corregirme e incluso hasta regañarme para tomar buenas decisiones, por motivarme siempre a seguir adelante, creer en mí y por todas las vivencias juntos. Jessica, por su apoyo incondicional, por su compañía en el laboratorio de trabajo, por brindarme su consejo y por tan linda amistad. Sandra, por todas las pláticas, altibajos que pasamos en el laboratorio y por todos los momentos divertidos que compartimos. Luisa, por apoyarme siempre desde que entré al posgrado, por la compañía que me brindaba en el laboratorio, por las vivencias durante las clases que compartimos y por la confianza que tiene en mí. A mis amigos de posgrado, Omar, Pepe, Lily, Diana, Lupita, Jessica,

Pablo, que en algún momento compartimos bonitas historias. A Mariana y a mi equipo del Instituto de Física (UASLP), Marisa, Carlitos, Diego, Isidro, Juan, Lupita, Daniela, Marisol, Yung y Gregorio, por todo el apoyo que me brindaron desde el primer día que llegué, por la confianza, por las vivencias, por sus consejos y por todos los nuevos conocimientos que adquirí. A Miguel, Daniel, Israel y Mauricio, por esa amistad incondicional de tantos años, por su apoyo y consejo fuera de la escuela.

Por último, a mi Molly, quien se ha convertido en mi compañera fiel, que me acompaña a donde esté, que se desvela conmigo y que siempre me espera cuando no estoy en casa.

RECONOCIMIENTOS

- 2020 Cartel Profesional Estudio de la deposición de puntos de plata sobre nanopartículas de TiO_2 para su aplicación antimicrobial en *Staphylococcus aureus*. XLI Encuentro Nacional de la AMIDIQ, evento virtual realizado del 22 al 24 de octubre.
- 2020 Ciclo de conferencias Coloquio de Investigación Multidisciplinaria. Evento Internacional CIM-Orizaba-2020 del 19 al 23 de octubre.

PUBLICACIONES

- 2020 Marco Antonio Olivares Ramírez, Leticia López Zamora, José Amir González Calderón. Estudio de la deposición de puntos de plata sobre nanopartículas de TiO_2 para su aplicación antimicrobial en *Staphylococcus aureus*. Memorias del XLI Encuentro Nacional de la AMIDIQ, evento virtual realizado del 22 al 24 de octubre.
- 2020 M.A. Olivares Ramírez, L. López Zamora, J. A. González Calderón. Determinación de parámetros para mejorar el efecto bactericida de nanopartículas de Ag/TiO_2 contra *Escherichia coli*. JOURNAL CIM: Coloquio de Investigación Multidisciplinaria, revista electrónica indizada en Latindex con ISSN: 2007:8102. Evento Internacional CIM-Orizaba-2020 del 19 al 23 de octubre.

RESUMEN

Estudio de la deposición de puntos de plata sobre nanopartículas de dióxido de titanio para su posible aplicación como antimicrobial y antimicótico

Elaborada por: Ing. Marco Antonio Olivares Ramírez

**Dirigida por: Dra. Leticia López Zamora
Dr. José Amir González Calderón**

El siguiente trabajo presenta un estudio de la inhibición de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* y *Aspergillus niger* utilizando nanopartículas de TiO_2 modificadas superficialmente con APTES y dopadas con Ag, implementando la metodología de superficie de respuesta (MSR) enriquecida con un diseño experimental de tipo central compuesto CDC. El objetivo de este trabajo consistió en determinar bajo qué condiciones se favorece la inhibición de las bacterias y hongos seleccionados evaluando la deposición Ag sobre la superficie de TiO_2 para determinar la posible aplicación del compuesto TiO_2/Ag como un antimicrobial y antimicótico. El diseño experimental implementado contiene como variables independientes pH, concentración de AgNO_3 (% p/p) y sólidos de TiO_2 en solución (g/250 mL) y como variable de respuesta la longitud del diámetro del halo o zona de inhibición presentado sobre las placas sembradas con los microorganismos. Mediante análisis estadístico de los datos obtenidos se generaron polinomios de segundo grado que representan la relación que existe entre la respuesta y las variables consideradas, y a través de la MSR se determinaron las mejores condiciones en el proceso de dopaje. La caracterización de nanopartículas abarcó pruebas de Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), Microscopía de transmisión por electrones (TEM), Análisis termogravimétrico (TGA), Potencial Z y Resonancia magnética nuclear (RMN). Los resultados obtenidos indicaron que el nanocompuesto obtenido tiene propiedades adecuadas en la inhibición de los microorganismos empleados, lo que representa un amplio campo en la aplicación del material con un alto impacto antibacteriano.

ABSTRACT

Study of the deposition of silver points on titanium dioxide nanoparticles for their possible application as antimicrobial and antifungal

By: Ing. Marco Antonio Olivares Ramírez

**Advisor(s): Dra. Leticia López Zamora
Dr. José Amir González Calderón**

The following work presents a study of the inhibition of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* and *Aspergillus niger* using TiO₂ nanoparticles superficially modified with APTES and doped with Ag, implementing the response surface methodology (RSM) with an experimental design of central composite design type CCD. The objective of this work was to determine under what conditions the inhibition of selected bacteria and fungi is favored by evaluating Ag deposition on the TiO₂ surface to determine the possible application of the TiO₂/Ag compound as an antimicrobial and antifungal. The implemented experimental design contains as independent variables pH, AgNO₃ concentration (% w/w) and TiO₂ solids in solution (g/250 mL) and as response variable the length of the diameter of the halo or zone of inhibition presented on the plates seeded with microorganisms. By means of statistical analysis of the data obtained, second degree polynomials were generated that represent the relationship that exists between the response and the variables considered, and through the RSM the best conditions in the doping process were determined. The characterization of nanoparticles covered Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Transmission Electron Microscopy (TEM), Thermogravimetric Analysis (TGA), Z Potential and Nuclear Magnetic Resonance (NMR). The results obtained indicated that the nanocomposite obtained has adequate properties in the inhibition of the microorganisms used, which represents a wide field in the application of the material with a high antibacterial impact.

ÍNDICE

Resumen	vii
Abstract	viii
Lista de Figuras	xii
Lista de Tablas	xv
Nomenclatura	xvi
Introducción	1
CAPÍTULO 1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS	
1.1 Introducción a los nanomateriales	4
1.2 Nanotecnología	5
1.3 Nanomateriales	6
1.3.1 Tipos	6
1.3.2 Síntesis u obtención	9
1.3.3 Métodos de preparación de nanopartículas soportadas	11
1.4 Agentes de acoplamiento de silanos	11
1.5 Nanopartículas con capacidad bactericida	13
1.5.1 Nanopartículas de dióxido de titanio	14
1.5.2 Nanopartículas de plata	16
1.6 Técnicas de caracterización	18
1.6.1 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	18
1.6.2 Microscopía de transmisión por electrones (TEM)	20
1.6.3 Potencial Z	22
1.6.4 Resonancia magnética nuclear (RMN)	23
1.6.5 Análisis termogravimétrico (TGA)	25
1.7 Susceptibilidad antimicrobiana y antifúngica	26
1.7.1 Terminología de pruebas de susceptibilidad	27
1.8 Metodología de superficie de respuesta (MSR)	29
1.9 Antecedentes	30

CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1	Materiales	36
2.2	Modificación química de nanopartículas de TiO ₂	36
2.2.1	Proceso de silanización	36
2.3	Caracterización de nanopartículas de TiO ₂ modificadas	38
2.3.1	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	38
2.3.2	Microscopía de transmisión por electrones (TEM)	39
2.3.3	Potencial Z	39
2.3.4	Resonancia magnética nuclear (RMN)	40
2.3.5	Análisis termogravimétrico (TGA)	40
2.4	Diseño de experimentos	40
2.5	Deposición de nanopartículas de Ag en nanopartículas de TiO ₂ modificado	42
2.5.1	Proceso de dopaje entre Ag y TiO ₂	42
2.6	Caracterización de nanopartículas dopadas con Ag	43
2.6.1	Microscopía de transmisión por electrones (TEM)	43
2.7	Pruebas de susceptibilidad de disco (Método de Kirby-Bauer)	44
2.7.1	Medio de cultivo	44
2.7.2	Discos de papel filtro para impregnación de nanopartículas	44
2.7.3	Inóculo	45
2.7.4	Estándar de turbidez	45
2.7.5	Siembra de la muestra	45
2.7.6	Medición de los halos de inhibición	46
2.8	Prueba de susceptibilidad (HT-SPOTi, inhibición del crecimiento de cultivos puntuales de alto rendimiento)	47
2.8.1	Preparación de la placa	47
2.8.2	Incubación y observación	49
2.9	Metodología de superficie de respuesta (MSR)	49

CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1	Caracterización de nanopartículas de TiO ₂ modificadas	53
3.1.1	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	53
3.1.2	Microscopía de transmisión por electrones (TEM)	56
3.1.3	Potencial Z	57
3.1.4	Resonancia magnética nuclear (RMN)	59
3.1.5	Análisis termogravimétrico (TGA)	60
3.2	Deposición de nanopartículas de Ag en nanopartículas de TiO ₂ modificado	61
3.3	Evaluación de las pruebas de susceptibilidad	62
3.3.1	Evaluación de <i>Staphylococcus aureus</i>	62
3.3.2	Evaluación de <i>Escherichia coli</i>	69
3.3.3	Evaluación de <i>Candida albicans</i> y <i>Aspergillus niger</i> mediante pruebas de susceptibilidad	77
3.4	Caracterización de nanopartículas de TiO ₂ dopadas con Ag respecto a mayor y menor zona de inhibición de los resultados de la variable de respuesta del diseño experimental CDC.	79
3.4.1	Microscopía de transmisión por electrones (TEM)	79
	Conclusiones y Recomendaciones	87
	Anexos	91
	Referencias Bibliográficas	105

LISTA DE FIGURAS

Figura		Pag
1.1	Representación esquemática de la preparación de nanopartículas soportadas por el método de deposición/reducción convencional (Pineda <i>et al.</i> , 2011).	11
1.2	Diagrama de un espectrofotómetro por transformada de Fourier (Curia, 2010).	20
1.3	Esquema de un microscopio electrónico de transmisión (Faraldos y Goberna, 2002).	22
1.4	Gráfica de superficie de respuesta tridimensional con los contornos mostrados debajo del gráfico.	30
2.1	Metodología general para la optimización de la deposición de puntos de Ag sobre nanopartículas de TiO ₂ .	35
2.2	Etapas del proceso de silanización de nanopartículas de TiO ₂ .	36
2.3	Incorporación de TiO ₂ en Etanol (Proceso intercalado de agitación y sonicación)..	37
2.4	Secado en horno de TiO ₂ modificado	38
2.5	Etapas del proceso de deposición de nanopartículas de Ag en TiO ₂ .	42
2.6	Placa de la técnica HT-SPOTi.	48
3.1	Espectro FTIR de nanopartículas de TiO ₂ puro (sin modificar).	53
3.2	Espectro FTIR de nanopartículas de TiO ₂ silanizado (modificado).	54
3.3	Espectro FTIR de nanopartículas de TiO ₂ silanizado (modificado) en un rango de temperaturas de 30-446 °C.	55
3.4	Micrografías TEM a) TiO ₂ , b) TiO ₂ silanizado (modificado).	56
3.5	Potencial Z de las nanopartículas de TiO ₂ y de TiO ₂ modificado.	58
3.6	Espectro de RMN para ¹³ C	59
3.7	Espectro de RMN para ²⁹ Si	60

3.8	Análisis termogravimétrico de nanopartículas de TiO ₂ modificado.	61
3.9	Unidades experimentales de la deposición de Ag en TiO ₂ silanizado.	61
3.10	Superficies de respuesta de la evaluación de <i>S. aureus</i> , a) pH vs Concentración de AgNO ₃ (%p/p), b) pH vs sólidos de TiO ₂ (g), c) Concentración de AgNO ₃ (%p/p) vs Sólidos de TiO ₂ (g).	64
3.11	Gráficas de contorno de la evaluación de <i>S. aureus</i> , a) pH vs Concentración de AgNO ₃ (%p/p), b) Sólidos de TiO ₂ (g) vs pH, c) Concentración de AgNO ₃ (%p/p) vs Sólidos de TiO ₂ (g).	65
3.12	Superficie de respuesta de la evaluación de <i>S. aureus</i> , Concentración de AgNO ₃ (%p/p) vs Sólidos de TiO ₂ (g).	68
3.13	Gráfica de contorno de la evaluación de <i>S. aureus</i> , Concentración de AgNO ₃ (%p/p) vs Sólidos de TiO ₂ (g).	68
3.14	Superficies de respuesta de la evaluación de <i>E. coli</i> , a) Concentración de AgNO ₃ (% p/p) vs Sólidos de TiO ₂ (g), b) pH vs sólidos de TiO ₂ (g), c) pH vs Concentración de AgNO ₃ (% p/p).	71
3.15	Gráficas de contorno de la evaluación de <i>E. coli</i> , a) Concentración de AgNO ₃ (%p/p) vs Sólidos de TiO ₂ (g), b) pH vs Sólidos de TiO ₂ (g), c) pH vs Concentración de AgNO ₃ (%p/p).	72
3.16	Superficie de respuesta de la evaluación de <i>E. coli</i> , Concentración de AgNO ₃ (%p/p) vs Sólidos de TiO ₂ (g).	75
3.17	Gráfica de contorno de la evaluación de <i>E. coli</i> , Concentración de AgNO ₃ (%p/p) vs Sólidos de TiO ₂ (g).	75
3.18	Placa de <i>Aspergillus niger</i> .	78
3.19	Placa de <i>Candida albicans</i> .	78
3.20	Micrografía TEM de la unidad experimental No.6 del CDC de dos factores.	80

3.21	Micrografía TEM de la unidad experimental No.1 del CDC de dos factores.	80
3.22	Análisis TEM/EDS de la unidad experimental No.6 del CDC de dos factores: a) morfología de TiO ₂ /Ag, b) distribución de Ag, c) distribución de O ₂ y d) distribución de Ti.	81
3.23	Análisis TEM/EDS de la unidad experimental No.1 del CDC de dos factores: a) morfología de TiO ₂ /Ag, b) distribución de Ag, c) distribución de O ₂ y d) distribución de Ti.	81
3.24	Micrografía TEM de la unidad experimental No.13 del CDC de dos factores.	83
3.25	Micrografía TEM de la unidad experimental No.5 del CDC de dos factores.	83
3.26	Análisis TEM/EDS de la unidad experimental No.13 del CDC de dos factores: a) morfología de TiO ₂ /Ag, b) distribución de Ag, c) distribución de O ₂ y d) distribución de Ti.	84
3.27	Análisis TEM/EDS de la unidad experimental No.5 del CDC de dos factores: a) morfología de TiO ₂ /Ag, b) distribución de Ag, c) distribución de O ₂ y d) distribución de Ti.	84

LISTA DE TABLAS

Tabla		Pag
1.1	Materiales y tamaño de nanoestructuras (Posadas, 2017).	8
1.2	Intervalos de la región del infrarrojo del espectro (Curia, 2010).	19
2.1	Niveles del diseño experimental de las variables estudiadas.	42
3.1	Resultados de la variable de respuesta para <i>S. aureus</i> .	62
3.2	Resultados de la variable de respuesta para <i>S. aureus</i> del diseño experimental de dos factores.	66
3.3	Resultados de la variable de respuesta para <i>E. coli</i> .	70
3.4	Resultados de la variable de respuesta para <i>E. coli</i> del diseño experimental de dos factores.	73
3.5	Análisis químico TEM/EDS de partículas de TiO ₂ modificado y dopado con Ag de la unidad experimental 6 y 1.	82
3.6	Análisis químico TEM/EDS de partículas de TiO ₂ modificado y dopado con Ag de la unidad experimental 13 y 5.	85

NOMENCLATURA

APTES	3-Aminopropiltriétoxissilano
Ag	Plata
AgNO ₃	Nitrato de plata
DCC/CDC	Diseño central compuesto
EDS	Espectroscopía de rayos X de energía dispersiva
FTIR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
IEP	Punto isoeléctrico
MSR	Metodología de superficie de respuesta
NM	Nanomaterial
NMs	Nanomateriales
NPs	Nanopartículas
PZC	Punto de carga cero
RMN	Resonancia magnética nuclear
TEM	Microscopía de transmisión por electrones
TGA	Análisis termogravimétrico
TiO ₂	Dióxido de Titanio
XPS	Espectroscopía de fotoelectrones de rayos X

INTRODUCCIÓN

Existen diversos nanomateriales basados en óxido de metal y polímeros nanocompuestos reportados a lo largo de varios años, esto se debe a sus diversas propiedades (Karak, 2019). En la última década, se han empleado nanopartículas (NPs) en el campo de las ciencias biomédicas, en fármacos, imágenes, diagnóstico, tratamiento de enfermedades y para desarrollo de antimicrobianos (Rao *et al.*, 2019).

El interés que se tiene por los nanomateriales basado en dióxido de titanio (TiO₂) es a causa de las propiedades fisicoquímicas que este posee. Se utiliza principalmente en las industrias textil, papelera, cosmética y alimentaria (Rao *et al.*, 2019), así mismo en fotocatalisis, ingeniería de energía solar, degradación de contaminantes orgánicos de agua y aire, eliminación de iones de metales pesados de soluciones para la desintoxicación y como agente antibacteriano (Haider *et al.*, 2017; Harikishore *et al.*, 2014; Natarajan *et al.*, 2016; Seery *et al.*, 2007).

El TiO₂ se ha empleado para la degradación de microorganismos, en especial las Gram positivas como *S. aureus*, sin embargo tiene una limitante, su uso práctico, dado que solo es fotoactivo con irradiación ultravioleta ($\lambda < 380$ nm) (Pham y Lee, 2015; Harikishore *et al.*, 2014; Seery *et al.*, 2007; Wahyuni *et al.*, 2019). Se ha reportado que la modificación de TiO₂ con metales de transición disminuye el proceso de recombinación al formar estructuras y nuevas interfaces que mejoran la eficiencia fotocatalítica (Amin *et al.*, 2009; Vallejo *et al.*, 2016). Una solución interesante es la creación de nanosistemas con una estructura Ag-TiO₂ (Afanasyev *et al.*, 2016). En comparación con otros iones metálicos, el TiO₂ dopado con plata (Ag) tiene un amplio espectro de actividad antibacteriana y es seguro debido a su naturaleza no tóxica (Shi *et al.*, 2020), así mismo ha recibido especial atención por su bajo costo de síntesis y alta disponibilidad (Rao *et al.*, 2019). Por lo tanto, el estudio de TiO₂ modificado con Ag tiene un valor práctico significativo (Xu *et al.*, 2019).

La plata (Ag) es el agente más estudiado y del que se dispone mayor información en cuanto a su mecanismo de actividad antimicrobiana (Ávalos *et al.*, 2013; Hassanien y

Khatoon, 2019), la cual es mucho más alta que la de otros metales (Natarajan *et al.*, 2016), es activo contra las bacterias Gram-negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*) y Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* y algunas especies de la familia *Streptococcus*) (Dhanalekshmi y Meena, 2014; Vallejo *et al.*, 2016), también existen reportes sobre la actividad antimicrobiana contra *Microbacterium foliorum*, *Bacillus subtilis* y *Rhodococcus equi* (Thuy *et al.*, 2013).

Para preparar nanocompuestos de óxido de metal adecuados para materiales antibacterianos, es necesario dispersar las nanopartículas sin agregación en aglutinantes orgánicos. Debido a la relación superficie/tamaño de partícula, las nanopartículas tienden a aglomerarse fuertemente. Para lograr una dispersión adecuada de la matriz polimérica de nanopartículas, se recomienda el uso de agentes de acoplamiento para la modificación superficial de las nanopartículas. Una modificación de superficie idónea en las nanopartículas, conduce a una mejor dispersión y compatibilidad entre ellas (López-Zamora *et al.*, 2018; Qiao *et al.*, 2015), por lo tanto el proceso de silanización es importante como punto de inicio para este trabajo.

Existen diversas publicaciones sobre la síntesis y uso de nanopartículas de TiO_2/Ag como agente antibacteriano (Amin *et al.*, 2009; Ali *et al.*, 2018; Dhanalekshmi y Meena, 2014; Alimunnisa *et al.*, 2017; Quiñones-Jurado *et al.*, 2014), sin embargo aún se encuentran algunas limitantes relacionadas con la adecuada deposición del metal, y la dispersión idónea de las nanopartículas, por lo tanto lo que se busca con este trabajo es estudiar el proceso de deposición de nanopartículas de Ag sobre el TiO_2 empleando APTES como agente de acoplamiento para producir el nanocompuesto TiO_2/Ag con propiedades antibacterianas mejoradas las cuales se evaluarán por medio de técnicas de susceptibilidad utilizando metodología de superficie de respuesta con un diseño experimental de tipo central compuesto. Los resultados obtenidos determinarán la posible aplicación del compuesto TiO_2/Ag como un antimicrobial y antimicótico en diversos campos.

CAPÍTULO 1
FUNDAMENTOS TEÓRICOS

CAPÍTULO 1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

1.1 Introducción a los nanomateriales

Los nanomateriales, la nanociencia y la nanotecnología se han convertido en términos comunes, no sólo en la investigación sino también en la vida diaria. La historia de los nanomateriales (NMs) comenzó inmediatamente después del Big Bang cuando se formaron nanopartículas y nanoestructuras en los primeros meteoritos. Más tarde, la naturaleza creó muchas otras nanopartículas y nanoestructuras. En los últimos años, la investigación de NMs ha despertado un gran interés por parte de científicos e ingenieros de todo el mundo. El término nanomaterial (NM) generalmente se refiere a materiales con dimensiones externas o una estructura interna, medidos en nanoescala que exhiben propiedades únicas adicionales o diferentes. Los NMs pueden exhibir propiedades ópticas, mecánicas, magnéticas, conductoras únicas, diferentes de las mismas sustancias químicas en un tamaño más grande. Una mejor comprensión de las propiedades de los nanomateriales es de gran utilidad para sintetizar nuevos materiales en el futuro y tiene el potencial de mejorar la calidad de vida. Los NMs se están comercializando lentamente, comenzando a emerger como productos básicos y se utilizan en muchas aplicaciones y productos tecnológicos innovadores, incluida una amplia gama de productos de consumo. Sin embargo, los diferentes tipos de NMs (es decir, orgánicos, inorgánicos, de carbono y compuestos) muestran diferentes características físicas, químicas y biológicas, que pueden aprovecharse para aplicaciones específicas (Sudha *et al.*, 2018).

Los nanomateriales son los materiales que tienen al menos una dimensión en un régimen a nanoescala, más específicamente dentro de 100 nm. El término "nano" indica la dimensión de los materiales (es decir, un nanómetro nm actualmente tiene la aceptación en el sistema internacional de 1×10^{-9} m) (Almendárez y González, 2011; Ávalos *et al.*, 2013; Felipe y Rodríguez, 2012; Gajanan y Tijare, 2018; Kabir *et al.*, 2018; Karak, 2019).

1.2 Nanotecnología

Nanotecnología es la palabra que se utiliza para describir las ciencias y las técnicas que se encuentran relacionadas a nivel nanoescala, en otras palabras, longitudes muy pequeñas, esto permite trabajar y manipular moléculas y átomos estructuralmente. Lo anterior posibilita la fabricación de nuevos materiales a partir del reordenamiento de átomos y moléculas de forma consecutiva uno a uno (Felipe y Rodríguez, 2012).

El prefijo nano, del griego *νάνος*, que significa “enano”, significa una milmillonésima parte (10^{-9}). Entonces la nanotecnología hace referencia al diseño, producción y caracterización de nanoestructuras, nanoaparatos y nanosistemas, implicando la escala nanométrica. Esta tecnología facilita la separación, consolidación y deformación de materiales (átomo por átomo o bien molécula por molécula), mismos que pueden tener una amplia gama de aplicaciones en diversos campos (Almendárez y González, 2011; Ávalos *et al.*, 2013; Chong, 2004; Delgado-Ramos, 2014; Gajanan y Tijare, 2018; Jaimes *et al.*, 2017; Martín y Serena, 2009; Quintili, 2012; Salerno *et al.*, 2008; Sudha *et al.*, 2018)

En 1959 Richard P. Feynman, ganador del primer premio Nobel de Física, habló por primera vez acerca de esta tecnología en una conferencia titulada “There is plenty of room at the bottom” en donde describe el potencial y las posibilidades de adentrarse en el estudio del área que abarca lo nanométrico. (Felipe y Rodríguez, 2012; Janett *et al.*, 2015).

La manipulación de la materia a nivel nanoescala promete un amplio campo en diversas aplicaciones e innovaciones, abarcando nuevos y diversos materiales en áreas como la textil, química, medicina, farmacéutica, alimentaria, automotriz, cosmética, aeroespacial, biotecnología, tecnologías de la información y la energética. El incremento de manera exponencial acerca del interés en este tipo de materiales provoca que aumente el número de investigaciones que se realizan sobre estos temas (Ávalos *et al.*, 2013; Almendárez y González, 2011).

1.3 Nanomateriales

Los materiales en escala nanométrica presentan propiedades únicas y diferentes si se contrastan estos mismos materiales pero en escala macroscópica, lo que genera que la ciencia estudie y dedique especial atención en la fabricación y en el comportamiento de este tipo de materiales para descubrir nuevas formas y propiedades diferentes (Sudha *et al.*, 2018).

El término nanomaterial abarca partículas naturales o en su defecto sintéticas con al menos una dimensión menor a 100 nm (Almendárez y González, 2011; Ávalos *et al.*, 2013; Felipe y Rodríguez, 2012; Gajanan y Tijare, 2018; Kabir *et al.*, 2018; Karak, 2019).

El estudio y una mejor comprensión de las propiedades de los nanomateriales conduce a tener una ruta más amplia para crear o sintetizar nuevos materiales incluso con el potencial de mejorar la calidad de vida (Harikishore *et al.*, 2014; Sudha *et al.*, 2018).

1.3.1 Tipos

La organización de los nanomateriales depende del modo de síntesis, de la morfología e incluso de la forma. Las características principales de la morfología incluyen planitud, esfericidad y relación de aspecto. Las morfologías de relación de aspecto (pequeño) abarcan la forma esférica, ovalada, cúbica, de prisma, helicoidal o de columna, por otro lado, las de alta relación de aspecto alcanzan la forma de zigzag, hélices y cinturones. Es necesario delimitar adecuadamente la diversidad de los nanomateriales, por lo que se requiere que exista alguna clasificación. Una manera apropiada de clasificar los nanomateriales es en función de sus propiedades físicas y químicas (Sudha *et al.*, 2018).

Según el número de dimensiones en el orden nanométrico, los nanomateriales se pueden clasificar en cuatro tipos básicos (Sudha *et al.*, 2018).

- Materiales de dimensión cero (0D):

Las tres dimensiones se encuentran en tamaño nanométrico, es decir, todas sus características o dimensiones son inferiores a 100 nm. A este tipo de materiales también se le conoce como puntos cuánticos. Incluyen grupos atómicos y filamentos. De forma general, pueden ser amorfos o cristalinos, monocristalinos o policristalinos, elementos químicos simples o compuestos, y pueden exhibir varias formas.

De una dimensión (1D):

Este tipo tiene longitud variable, sin embargo, conserva una dimensión de escala nanométrica, por ejemplo, los nanoalambres o nanocables, nanotubos y nanofibras. Al igual que los nanomateriales de dimensión cero, los nanomateriales con 1 dimensión pueden ser amorfos o cristalinos, simples o policristalinos, metálicos, cerámicos o poliméricos. Incluyen chips de computadora y recubrimientos. Las películas delgadas de nanoestructuras 1D se pueden depositar de forma controlada y deben tener un solo átomo de espesor, esta es denominada monocapa.

- De dos dimensiones (2D):

Estos materiales cuentan con áreas de tamaño indefinido, conservando su espesor inferior a los 100 nm, como se da en el caso de las películas delgadas. Las partículas libres con una gran relación de aspecto, con dimensiones en el rango de nanoescala, también se consideran nanomateriales 2D. En este sistema, los electrones están confinados dentro de una dimensión, lo que indica que los electrones no pueden moverse libremente dentro de la dimensión asociada. El espesor atómico les ofrece una alta flexibilidad mecánica y transparencia óptica, lo que los convierte en un material interesante en la fabricación de dispositivos electrónicos.

- De tres dimensiones (3D):

Los sólidos tridimensionales están formados por unidades nanométricas. Incluyen materiales nanofásicos, estos consisten en granos de tamaño nanométrico equiaxial. Las nanoestructuras 3D no se limitan a la nanoescala en todas las dimensiones y generalmente se conocen como nanomaterial en masa. Los nanomateriales 3D

tienen tres dimensiones arbitrarias superiores a 100 nm. En estos materiales 3D, los electrones están completamente deslocalizados, lo que indica que todos los electrones se moverán libremente dentro de todas las dimensiones dentro del mismo material en cuestión.

En la Tabla 1.1 se proporcionan algunas dimensiones típicas de los nanomateriales, en donde se describe el tamaño aproximado, el tipo de nanoestructura y ejemplos de los mismos (Posadas, 2017).

Tabla 1.1 Materiales y tamaño de nanoestructuras (Posadas, 2017).

<i>Nano-estructuras</i>	<i>Tamaño</i>	<i>Material</i>
Clusters, NPs, puntos cuánticos	Radio 1 – 10 nm	Aislantes, semiconductores, metales, materiales magnéticos
Otras NPs	Radio 1 – 100 nm	Cerámicos, óxidos
Nanobiomateriales	Radio 5 – 10 nm	Membranas proteínicas
Nanocables	Diámetro 1 – 100 nm	Metales, semiconductores, óxidos, sulfuros, nitruros
Nanotubos	Diámetro 1 – 100 nm	Carbono, BN, GaN
Nanobiorodillos	Diámetro 5 nm	ADN
Arreglos bidimensionales de NPs	Área varios $\text{nm}^2 - \mu\text{m}^2$	Metales, semiconductores, materiales magnéticos
Superficies y películas delgadas	Espesor de 1 – 100 nm	Aislantes, metales, semiconductores, ADN
Redes tridimensionales de NPs	Varios nm en tres dimensiones	Metales, semiconductores, materiales magnéticos

La forma y composición química del material es de gran importancia para sus aplicaciones posteriores. La Agencia del Medio Ambiente de EUA, EPA por sus siglas en inglés, clasifica a los nanomateriales en función de su composición en 4 tipos (Felipe y Rodríguez, 2012):

- **A base de carbono:** nanomateriales compuestos en gran parte por carbono, suelen tener formas como esferas huecas, elipsoides o tubos. Los nanomateriales de carbono con forma elipsoidal o esférica se conocen como fullerenos o fulerenos, mientras que los cilíndricos reciben el nombre de nanotubos.
- **A base de metales:** nanomateriales que incluyen puntos cuánticos, estos abarcan nanopartículas de oro, plata y óxidos metálicos, como por ejemplo, el dióxido de titanio (TiO₂).
- **Dendrímeros:** polímeros de tamaño nanométrico contruidos a partir de unidades ramificadas. La superficie de un dendrímero tiene numerosos extremos de cadena, que se pueden adaptar para desempeñar funciones químicas específicas.
- **Compositos:** Los compuestos combinan las nanopartículas con otras nanopartículas o con materiales de mayor tamaño. Las nanopartículas, como arcilla a nanoescala, ya se están añadiendo a numerosos productos, desde piezas de automóviles hasta materiales de empaquetado, para mejorar propiedades mecánicas, térmicas, etc.

1.3.2 Síntesis u obtención

Para obtener nanomateriales existen dos procesos básicos. El *top-down* (de arriba hacia abajo), este proceso inicia a partir de un material en escala macroscópica, hasta llegar a nanomaterial. El *top-down* implementa por lo general un proceso físico y/o mecánico de molienda o trituración para posteriormente, una estabilización de la partícula que se obtuvo, utilizando un agente protector de tipo coloidal. Existen diferentes métodos físicos utilizados para la síntesis de nanomateriales, como lo son: técnicas y métodos en aerosol, litografía, láser y campos ultrasónicos. Los métodos *top-down* proporcionan confiabilidad para obtener dispositivos con alto grado de complejidad, sin embargo, la desventaja de esto, es que se requieren grandes cantidades de energía y generación de residuos. Es posible fabricar chips para

computadoras, láser, espejos con alta calidad óptica, entre otras cosas (Mendoza y Rodríguez, 2007; Quintili, 2012; Zanella, 2012).

El *bottom-up* (de abajo hacia arriba), es el segundo proceso básico. En este tipo se comienza por la condensación de átomos o moléculas, ya sea que se encuentren en fase gaseosa o en solución, con el fin de llegar hasta nanomaterial. Descrito de otra forma, se refiere a la construcción de estructuras átomo por átomo o molécula por molécula, que pueden ser separadas en tres partes (Mendoza y Rodríguez, 2007):

- **Síntesis química.** Este método genera las materias primas en forma de moléculas o partículas, con el fin de usar como productos y para fabricar materiales más complejos.
- **Autoensamble.** En este caso la organización de los átomos y/o moléculas se da por sí solo en el interior de las nanoestructuras por medio de interacciones tanto físicas como químicas en las unidades. Cabe mencionar que el llamado autoensamble se ha dado en la naturaleza en todo momento debido a que es la base de formación de cualquier organismo vivo. El uso en la industria es reciente, produciendo pocos residuos y utilizando pequeñas cantidades de energía. Hasta la fecha gracias a esta técnica solo se han creado sistemas simples, sin embargo para que exista una mejora es necesario mejorar los conocimientos en termodinámica y cinética en escala nanométrica.
- **Ensamble posicional.** Para este método los átomos y/o moléculas son manipulados y colocados de forma organizada, es decir, uno por uno. Debido a la complejidad del método, no es recomendable en procesos industriales.

A parte de los procesos descritos anteriormente, es posible organizar los métodos de síntesis en físicos, químicos y biológicos. Con esto se puede obtener diversos nanomateriales respecto a forma, tamaño e incluso composición química (Cuberes, 2006).

1.3.3 Métodos de preparación de nanopartículas soportadas

La preparación de nanopartículas se puede dar por diversos métodos, estos incluyen: Metodologías fisicoquímicas generales como impregnación, reducción, coprecipitación, precipitación y deposición, además de otros procesos fisicoquímicos más específicos y complejos, entre los cuales destacan la deposición fotoquímica, la deposición por ultrasonido, láser, fluidos supercríticos, plasma, irradiación por microondas y molienda mecánica (Linares *et al.*, 2011; Gedanken, 2004; Zhang y Erkey, 2006; Luque *et al.*, 2009).

Por lo general, la preparación de nanopartículas soportadas se lleva a cabo por el método de deposición/reducción convencional, la Figura 1.1 ilustra una representación del método mencionado, el primer paso consiste en la impregnación del soporte con la sal del precursor metálico, en seguida la reducción en corriente de hidrogeno (H_2) ó con agentes reductores tales como el boro, el hidruro de sodio, la hidracina, alcoholes, etc. (Pineda *et al.*, 2011).



Figura 1.1 Representación esquemática de la preparación de nanopartículas soportadas por el método de deposición/reducción convencional (Pineda *et al.*, 2011).

1.4 Agentes de acoplamiento de silanos

La terminología de agente de acoplamiento de silano, por lo general describe a especies que contienen silicio, estos tienen la capacidad de formar enlaces químicos entre materiales diferentes, en especial en materiales compuestos de polímeros reforzados. La función y el efecto del agente de acoplamiento de silano son bien conocidos. Una cantidad pequeña de agente de acoplamiento en la interfaz tiene un efecto significativo en el rendimiento y en las propiedades mecánicas del material

compuesto. Se han realizado estudios acerca de su mecanismo de acción entre dos materiales distintos y se proponen explicaciones como los enlaces químicos y la absorción física. La teoría indica que el agente de acoplamiento contiene un grupo funcional químico que puede formar un enlace covalente con la superficie del grupo silanol u otro relleno inorgánico, además contiene un grupo funcional diferente por el cual las moléculas poliméricas se unen actuando como un puente que conecta la fase inorgánica con la orgánica (Blum, 2003).

- *Silanos organofuncionales (Organosilanos)*

El organosilano se considera un material híbrido orgánico/inorgánico a nivel molecular, este compuesto se ha aplicado sobre diferentes materiales para modificar su superficie en una gran diversidad de campos de aplicación. Tienen una fórmula que los define $R_{(4-x)}Si(OR')_x$, en donde $x = 1 - 3$, OR' es el grupo alcoxi hidrolizable y R es el grupo orgánico funcional. Estos organosilanos se utilizan en varios campos, como en el descubrimiento de nuevos fármacos, agentes biomédicos y electrónica, así como en una amplia gama de productos industriales, cosméticos y de cuidado personal, como selladores, adhesivos, revestimientos, aislantes eléctricos, aditivos en tintas y humectantes. Sirven como puentes entre materiales inorgánicos y orgánicos (minerales, cargas, metales y celulosa) y en matrices orgánicas/poliméricas (caucho, termoplásticos). Con el aumento de nanomateriales y nanocompuestos, los organosilanos como modificadores de superficie han recibido un gran interés de investigación, ya que la mayoría de estas aplicaciones requieren que las nanopartículas sean químicamente estables, uniformes y bien dispersas en los medios. Hay informes con respecto al aumento de la dureza y la resistencia a la abrasión de los compuestos híbridos orgánicos/inorgánicos, en los cuales se utilizaron como rellenos nanopartículas modificadas con organosilanos en diferentes aplicaciones (Culler *et al.*, 1983; De Jaeger y Gleria, 2007; Chen y Yakovlev, 2010; Qiu *et al.*, 2020).

- *Aminopropiltriethoxisilano (APTES)*

El agente de acoplamiento aminosilano primario, γ -aminopropiltriétoxissilano (γ -APTES), es un agente comúnmente utilizado debido a su grupo amino, la característica es que el sílice en terminación con el grupo amino se puede emplear como relleno en caucho y plástico para aumentar la resistencia a la tracción, la resistencia a la abrasión y mejorar el comportamiento reológico. En muchas aplicaciones, se desea una alta cobertura superficial de grupos amino para tener un gran número de sitios activos en la superficie para mejorar el rendimiento de las nanopartículas (Jaksa *et al.*, 2014; Qiao *et al.*, 2015).

Los grupos silanol estarán disponibles para reaccionar con grupos hidroxilos dentro de las superficies de las partículas o en superficies planas. EL γ -APTES, al hidrolizarse, puede dar lugar también a compuestos cíclicos en los que el átomo de nitrógeno interacciona con el átomo de silicio o con uno de los grupos silanol. El grupo amino en el extremo del agente de acoplamiento puede ser funcionalizado con técnicas generales de bioconjugación para reaccionar químicamente con la matriz polimérica. El agente de acoplamiento γ -APTES es estable en agua y forma una solución clara en un amplio intervalo de concentración (Wang *et al.*, 2011; Rodríguez *et al.*, 2001; Culler *et al.*, 1983)

1.5 Nanopartículas con capacidad bactericida

En consecuencia al incremento del desarrollo de la resistencia bacteriana y fúngica frente a diversas enfermedades, los investigadores que trabajan en el campo de farmacología están orientados en encontrar nuevos tipos de agentes o materiales antibacterianos. La nanotecnología crece constantemente en desarrollar nuevos materiales de este tipo debido a la alta relación superficie-volumen en conjunto con las propiedades físicas y químicas únicas de los nanomateriales (Tri *et al.*, 2019).

Los materiales antibacterianos tienen una clasificación si se considera la composición química, se pueden organizar en dos grupos: materiales orgánicos y los materiales inorgánicos. Los materiales orgánicos empleados para la desinfección cuentan con algunas desventajas, entre las cuales se encuentra la toxicidad para el

cuerpo humano, de aquí que exista un interés en desinfectantes inorgánicos, como por ejemplo, las nanopartículas de óxido metálico (Dhanalekshmi y Meena, 2014; Betancur *et al.*, 2016).

Ejemplos de nanopartículas inorgánicas antibacterianas son la plata (Ag), el óxido de zinc (ZnO), el dióxido de titanio (TiO₂) y el cobre (Cu). Estas generan gran interés en investigación atribuida a la alta estabilidad que mantienen al entrar en contacto con sistemas biológicos. Los agentes inorgánicos antibacterianos tales como los metales y los óxidos de metal tienen ciertas ventajas en comparación con los compuestos orgánicos, entre las cuales se encuentran la estabilidad, bioseguridad, durabilidad, resistencia a temperatura, toxicidad, selectividad, entre otras características (Dhanalekshmi y Meena, 2014; Betancur *et al.*, 2016).

1.5.1 Nanopartículas de dióxido de titanio

El TiO₂ existe en tres estructuras cristalinas: la anatasa (tetragonal, $a = 0.3785$ nm, $c = 0.9514$ nm) que tiene una banda de 3.2 eV, rutilo (tetragonal, $a = 0.4593$ nm, $c = 0.2959$ nm) que posee una banda de 3.02 eV, y brookita (ortorrómbica, $a = 0,9182$ nm, $b = 0,5456$ nm, $c = 0,5143$ nm) con una banda de 2,96 eV. Este óxido no se considera tóxico, y se ha empleado en tratamientos ambientales como la purificación de agua y aire, en desinfección y esterilización de agua, esto es atribuido a sus propiedades y estabilidad química. También es considerado por diversos autores, como un semiconductor, es un material inocuo que presenta elevada resistencia a la fotocorrosión, es estable en soluciones acuosas, no tiene alto costo, es abundante en la naturaleza y cuenta con una excelente actividad fotocatalítica (esta actividad es la sensibilidad a la luz UV y se describe como una reacción electroquímica y fotoelectroquímica que da inicio cuando la radiación es capaz de excitar a un semiconductor a tal grado que hacer que se comporte como un conductor bajo la radiación UV). Existen diversas rutas para obtener o sintetizar TiO₂, estas incluyen la síntesis a la llama, la deposición química de vapor, la precipitación y el método sol-gel de alcóxido (Ali *et al.*, 2018; Amin *et al.*, 2009; Angkaew y Limsuwan, 2012; Betancur *et al.*, 2016; Dhanalekshmi y Meena, 2014; Haider *et al.*, 2017; Li *et al.*,

2011; Lionas *et al.*, 2018; Natarajan *et al.*, 2018; Pham y Lee, 2015; Tri *et al.*, 2019; Vallejo *et al.*, 2016; Vargas *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2012).

Recientemente, el interés en los nanomateriales que están basados en TiO₂ ha crecido de forma constante, esto es en función las propiedades fisicoquímicas que lo caracterizan. Estos nanomateriales se utilizan para la fotocatalisis, la ingeniería de energía solar, la purificación de agua y aire de contaminantes orgánicos, la eliminación de iones de metales pesados de soluciones para la desintoxicación y como agentes antibacterianos. El TiO₂ también es compatible con los tejidos humanos, lo que propicia su uso en el campo de la medicina (Afanasyev *et al.*, 2016; Haider *et al.*, 2017; Harikishore *et al.*, 2014; Natarajan *et al.*, 2016; Seders *et al.*, 2012).

Se ha empleado TiO₂ en la degradación de diversas bacterias y microorganismos (utilizado como agente antibacteriano), en específico las gram positivas como *S. aureus*. Sin embargo, hay dos desventajas en la aplicación de esta tecnología que se encuentra basada en TiO₂. La primera es que este tipo de material solo es fotoactivo bajo irradiación ultravioleta ($\lambda < 380$ nm), lo que limita el uso de TiO₂ como catalizador activo por la luz solar, que como se sabe, la mayoría de esta consiste en luz visible y en radiación infrarroja, y únicamente alrededor del 5% de la luz UV, la segunda desventaja es que el proceso por lo general presenta poca eficiencia cuántica, con rápida recombinación de lo que se conoce como par electrón-hueco fotogenerado (Harikishore *et al.*, 2014; Pham y Lee, 2015). Se han utilizado varios métodos para mejorar su absorción de luz visible, estas técnicas incluyen la modificación de la superficie a través de la sensibilización de materiales orgánicos o semiconductores, la modificación del espacio de banda creando vacantes de oxígeno o la subvalencia de oxígeno a través del dopaje con algunos no metales (como el nitrógeno) o metales (Angkaew y Limsuwan, 2012; Harikishore *et al.*, 2014).

Existen investigaciones que reportan que la modificación de TiO₂ con metales de transición (incluidos la plata, el platino, el rutenio y el paladio) disminuye el proceso

de recombinación al formar heteroestructuras y nuevas interfaces que mejoran la eficiencia fotocatalítica (Amin *et al.*, 2009; Vallejo *et al.*, 2016). Una solución interesante es la creación de nanosistemas con una estructura Ag-TiO₂, no solo porque el TiO₂ es un material prometedor con propiedades electrónicas y ópticas deseables, sino también porque la plata muestra algunas actividades únicas en detección química y biológica en comparación con otros metales nobles. Por lo tanto, el estudio de TiO₂ modificado con Ag tiene un valor práctico significativo (Afanasyev *et al.*, 2016; Liang *et al.*, 2011).

1.5.2 Nanopartículas de plata

Se ha encontrado recientemente que las partículas de Ag tienen una amplia aplicación en el desarrollo de procesos biológicos y farmacéuticos, así mismo se han empleado como material de revestimiento o recubrimiento en dispositivos médicos, en materiales ortopédicos y ayudas tópicas para la reparación de heridas, entre otros usos (Hoppens *et al.*, 2014; Vallejo *et al.*, 2016).

En años recientes, las nanopartículas de plata (AgNPs) han generado un gran interés y atención en las aplicaciones en donde pueden tener lugar, entre las cuales están la optoelectrónica, óptica, catálisis, sensores, ropa, pinturas, cosméticos, bactericidas, biofungicidas, aplicaciones biomédicas, en la industria médica, en la farmacéutica y en la alimentaria. Debido a ello, es necesario que los materiales o productos elaborados con este tipo de nanopartículas garanticen la seguridad tanto de las personas como del medio ambiente (Ávalos *et al.*, 2013).

Una de las características principales de las AgNPs es su elevada relación de área de superficie a volumen, esto favorece la generación de nuevas propiedades mecánicas, químicas, eléctricas, ópticas, magnéticas, electroópticas y magnetoópticas de las nanopartículas que son diferentes de sus propiedades generales. También es conocido que la plata coloidal posee propiedades antibacterianas, además de no ser tóxica y amigable con el medio ambiente. Otro dato es que los iones de Ag tienen un papel vital y más ventajas que los antibióticos

convencionales que se utilizan normalmente (Dhanalekshmi y Meena, 2014; Thuy *et al.*, 2013).

De los diferentes métodos utilizados para sintetizar las nanopartículas de Ag, se ha comprobado que desde el enfoque biológico se considera más rentable ya que es amigable con el medio ambiente, tiene la facilidad para la síntesis a gran escala y en parte no es necesario emplear altas presiones, energía, temperatura y productos químicos tóxicos, esto genera que el enfoque biológico tenga más ventajas al respecto. Además el uso de plantas para la síntesis de nanopartículas también sugiere que es mejor que otras, debido a que elimina el proceso complejo de mantenimiento de cultivos celulares (Thuy *et al.*, 2013).

Se sabe que la Ag es el agente que ha sido más estudiado y por lo tanto se tiene una mayor información acerca de su mecanismo de actividad antibacteriana (que en comparación con otros metales, es más alta), es activa contra bacterias gram negativas como *Escherichia coli* y gram positivas como *Staphylococcus aureus*, también hay estudios que describen la actividad antibacteriana de estas nanopartículas específicamente contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbacterium foliorum*, *Bacillus subtilis* y *Rhodococcus equi* (Dhanalekshmi y Meena, 2014; Hassanien y Khatoon, 2019; Natarajan *et al.*, 2016; Thuy *et al.*, 2013; Vallejo *et al.*, 2016). Existe gran controversia acerca del mecanismo de acción, sin embargo de manera general se describen como: la liberación de forma gradual de iones de Ag que inhiben la producción de adenosin trifosfato (ATP) y la replicación del ADN, que son factores fundamentales para la supervivencia de la célula, otro mecanismo se atribuye a la capacidad que tienen las nanopartículas para provocar daño directo a la membrana celular y por último la producción de especies reactivas de oxígeno que generan estrés oxidativo y por consiguiente muerte de la célula (Betancur *et al.*, 2016). Otra característica de la producción de nanopartículas de Ag resulta en la obtención de una gran área de superficie, esta propiedad es importante en la inhibición de crecimiento bacteriano (Amin *et al.*, 2009).

1.6 Técnicas de caracterización

La caracterización de los nanomateriales se lleva a cabo por medio de diferentes técnicas, algunas convencionales y algunas otras un poco más complejas. Estas técnicas son importantes para comprender y estudiar las estructuras en nanoescala así como la interfaz de los diferentes componentes (Almendárez y González, 2011; Karak, 2019; Sudha *et al.*, 2018). En las siguientes secciones se describen las principales.

1.6.1 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

El espectroscopía FTIR es una técnica muy común utilizada para identificar la presencia de diferentes grupos funcionales químicos en nanomateriales funcionalizados, polímeros y sus interacciones. El principio de funcionamiento de ésta espectroscopía se basa en la excitación de los modos de vibración y rotación de los enlaces entre los átomos al ser irradiados con un haz de luz infrarroja (Curia, 2010). Al absorber la radiación electromagnética, las frecuencias de vibración de los enlaces aumentan, lo que resulta en una transición electrónica entre el estado fundamental y varios estados excitados. Estas frecuencias de absorción representan las excitaciones de las vibraciones de los enlaces químicos y, por lo tanto, son específicas para el tipo de enlace químico y el grupo de átomos involucrados en la vibración (Kačuráková y Wilson, 2001; Meng *et al.*, 2014; Piqué y Vázquez, 2012).

La región del infrarrojo del espectro abarca la radiación con números de onda comprendidos entre 12800 y 10 cm^{-1} , que corresponden a longitudes de onda de 0,78 a 1000 μm según las técnicas experimentales y las aplicaciones, la región infrarroja total puede subdividirse en tres regiones denominadas infrarrojo *cercano*, *medio* y *lejano*. La Tabla 1.2 ejemplifica los límites aproximados de cada una de esas regiones.

En esta técnica, cada una de las moléculas dependiendo las características de sus propios enlaces, absorberá la radiación de una o varias longitudes de onda de manera específica, lo que facilitará su identificación. Los espectros de absorción,

emisión y reflexión dentro del espectro infrarrojo, de las estructuras moleculares, se pueden describir tomando en cuenta que el conjunto es el resultado de diversos cambios en la energía, mismos que fueron producidos en las transiciones de las moléculas de un estado de energía vibracional y rotacional a otro (Curia, 2010).

Tabla 1.2 Intervalos de la región del infrarrojo del espectro (Curia, 2010).

Región	Intervalo de la longitud de onda (λ), μm	Intervalo de número de onda ($\tilde{\nu}$), cm^{-1}	Intervalo de frecuencias (ν), Hz
Cercano	0,78 a 2,5	12800 a 4000	$3,8 \times 10^{14}$ a $1,2 \times 10^{14}$
Medio	2,5 a 50	4000 a 200	$1,2 \times 10^{14}$ a $6,0 \times 10^{12}$
Lejano	50 a 1000	200 a 10	$6,0 \times 10^{12}$ a $3,0 \times 10^{11}$
La más utilizada	2,5 a 15	4000 a 670	$1,2 \times 10^{14}$ a $2,0 \times 10^{13}$

Para que exista la interacción de la radiación en el infrarrojo, cada molécula debe asumir un cambio neto en el momento dipolar, esto es a consecuencia del movimiento de vibración o rotación. Bajo las circunstancias anteriores, el campo eléctrico alterno de la radiación puede interactuar con la molécula y así provocar cambios en la amplitud de alguno de sus movimientos. Si la frecuencia de la radiación coincide de igual manera con la frecuencia de la vibración de la molécula, existe una transferencia neta de la energía que origina un cambio en la amplitud de la vibración molecular, esto origina la absorción de la radiación (Curia, 2010).

De manera general, el FTIR es una técnica valiosa, no invasiva, rentable y simple para identificar los diferentes grupos funcionales presentes en las moléculas estabilizadas o funcionalizadas en nanomateriales y nanocompuestos (Kačuráková y Wilson, 2001; Meng *et al.*, 2014; Piqué y Vázquez, 2012).

Espectrofotómetro con transformada de Fourier: Para ejemplificar, un esquema óptico de un espectrofotómetro basado en la transformada de Fourier se ilustra en la Figura 1.2. En el punto A se genera el rayo infrarrojo (fuente de radiación), este es

Faraldos y Goberna, 2002). Esta técnica es empleada para caracterizar materiales nanométricos, por ejemplo, para poder observar la dispersión de los reforzantes en el seno de una matriz polimérica, en donde se ha observado como a medida que la dispersión de los reforzantes (como nanotubos de carbono) mejora debido a algún tratamiento químico, o bien al mismo proceso de mezclado, también lo hacen algunas propiedades como son los módulos dinámicos, temperaturas de descomposición, entre otros (Almendárez Camarillo y González Calderón, 2011).

El TEM está basado en la irradiación que genera un haz de electrones a causa del calentamiento de una fuente de tungsteno, este es acelerado en alto vacío y enfocado por campos magnéticos sobre una muestra con densidad corriente uniforme cuya energía se encuentra generalmente dentro del intervalo entre 100-200 KeV. Una fracción de los electrones son transmitidos, otra parte son dispersados y finalmente otra parte de esos electrones da lugar a interacciones que producen diversos fenómenos, tales como la emisión de luz, los electrones Auger, rayos X, entre otros, al chocar con la muestra en cuestión se generan señales que están directamente relacionadas con la estructura y la morfología de la muestra observada, al ser tan pequeña la longitud de onda de los electrones se facilita una resolución de imagen por debajo de 0.1 nm (Smart y Moore, 2005; Faraldos y Goberna, 2002).

La generación de una micrografía de TEM implica electrones que se transmiten a través de la muestra sobre la cual incidió el haz de electrones. De acuerdo a esta interacción, existe una clasificación de electrones: no desviados, desviados elásticamente y los inelásticos. El haz que atraviesa directamente la muestra es detectado formando una proyección bidimensional (campo claro), o se detecta el haz difractado (campo oscuro) (Smart y Moore, 2005).

Para el caso de la microscopía de campo oscuro, los elementos que poseen mayor número atómico pueden dispersar los electrones de forma más eficaz y a mayores ángulos de desviación de los átomos ligeros, esto ocasiona un mayor contraste en las imágenes o micrografías de TEM (Faraldos y Goberna, 2002).

Existen dos ventajas de TEM en comparación con otras técnicas de microscopía. La primera es la magnificación y la resolución, y la segunda, es que tiene la capacidad de generar una imagen e información acerca del patrón de difracción de la muestra en un mismo análisis. Como ya se describió, los estudios de TEM proporcionan información sobre el tamaño, la forma y la distribución de los nanomateriales, sin embargo también la relación de aspecto, diámetros internos y externos (por ejemplo de nanotubos), la uniformidad en la estructura, entre otras cosas (Karak, 2019; Cao y Wang, 2011).

La Figura 1.3 ilustra un ejemplo de un microscopio electrónico de transmisión con las partes principales que lo conforman.



Figura 1.3 Esquema de un microscopio electrónico de transmisión (Faraldos y Goberna, 2002).

1.6.3 Potencial Z

Varias de las propiedades más importantes de los sistemas coloidales se encuentran directa o indirectamente determinadas por la carga eléctrica (o potencial) de las partículas. Las moléculas dipolares y la adsorción de iones también son

determinadas por esta carga y distribución de potencial. La distribución de potencial tiene la capacidad de determinar la energía de interacción entre las partículas, que por lo general, es responsable de la estabilidad de las partículas frente a la coagulación y de algunos otros aspectos del comportamiento de flujo de la suspensión coloidal. De igual forma es posible correlacionar el potencial zeta con el comportamiento de sedimentación de los sistemas coloidales y el comportamiento de la flotación de los minerales (Hunter, 1981).

En el momento es que partículas están suspendidas en solución poseen carga positiva o negativa. La presencia de iones de carga opuesta a la superficie de las partículas rodea a las mismas para mantener una carga eléctrica neutra. De esta manera se forma una doble capa eléctrica, donde la concentración de los iones de carga opuesta disminuye gradualmente en función que se alejan de la superficie. La estabilidad de las partículas es influida por la carga de la superficie y el potencial Z (pZ) es un índice de carga. Si el potencial zeta es alto, las partículas son estables por la alta repulsión electrostática entre ellas. En caso contrario, un bajo potencial zeta (valores aproximados a cero) incrementa la probabilidad de que las partículas colisionen formando agregados. La medición indirecta del potencial Z se realiza aplicando un campo eléctrico a las partículas cargadas en la suspensión, estas se mueven al electrodo opuesto de acuerdo a la carga superficial de las mismas. (López-Zamora *et al.*, 2018).

1.6.4 Resonancia magnética nuclear (RMN)

También conocida como espectrometría de resonancia magnética nuclear, es una técnica que describe las propiedades magnéticas de ciertos núcleos. Además de la carga y de la masa, mismas que poseen todos los núcleos, muchos isótopos tienen espín o momento angular. Debido a que una carga giratoria provoca un campo magnético, este momento angular está relacionado con un momento magnético. Las propiedades magnéticas de los núcleos fueron postuladas por primera vez por Pauli para explicar ciertas características estructurales de los espectros atómicos. El fenómeno de resonancia magnética nuclear se conoce desde hace mucho tiempo en

los haces moleculares mismos que se han aprovechado de forma eficaz para proporcionar información de las propiedades nucleares de cada elemento estudiado (Bovey, 1988).

Dependiendo del entorno químico local, los diferentes protones en una molécula resuenan a frecuencias ligeramente diferentes. Dado que tanto este desplazamiento como la frecuencia de resonancia fundamental son directamente proporcionales a la fuerza del campo magnético, el desplazamiento de frecuencia se convierte en un campo independiente de valor adimensional conocido como desplazamiento químico. El *desplazamiento químico* se reporta como una medida relativa de algunas frecuencias de resonancia de referencia. (Para los núcleos ^1H , ^{13}C , y ^{29}Si , se usa como referencia el tetrametilsilano o TMS.) Esta diferencia entre la frecuencia de la señal y la frecuencia de la referencia se divide por la frecuencia de la señal de referencia para obtener el desplazamiento químico. Los desplazamientos de frecuencia son muy pequeños en comparación con la frecuencia RMN fundamental. Un desplazamiento de frecuencia típico podría ser de 100 Hz, en comparación con una frecuencia RMN fundamental de 100 MHz, por lo que el desplazamiento químico se expresa generalmente en partes por millón (ppm) (Xu *et al.*, 2019).

Mediante la comprensión de los diferentes entornos químicos, el desplazamiento químico puede ser utilizado para obtener información estructural sobre la molécula en una muestra. La conversión de los datos en bruto a esta información se llama *asignación del espectro*. Un campo magnético distribuido en un espacio tridimensional agregado al campo magnético estático original da como resultado una organización espacial de los núcleos con diferentes frecuencias de resonancia, frecuencias de giro y fases. En seguida a través de diferentes métodos, se puede graficar la distribución de intensidad de diferentes señales de ubicación para obtener imágenes de RMN. En general, los protones y los neutrones forman un núcleo, y los núcleos con un número impar de protones y/o neutrones tienen un momento magnético y se consideran activos por RMN (Bovey, 1988; Xu *et al.*, 2019).

1.6.5 Análisis termogravimétrico (TGA)

La termogravimetría abarca el estudio de cambio de masa de una muestra en función del tiempo o de la temperatura bajo una atmósfera controlada. Una degradación térmica inducida de un material compuesto se relaciona con su estabilidad térmica, misma que funciona como un indicativo acerca de qué tan bien el compuesto puede funcionar en condiciones extremas considerando altas temperaturas. A lo largo de la medición existen cambios físicos como la cristalización, fusión o transición vítrea en la cual no existe un cambio de masa y algunos otros como la desorción, absorción, sublimación, vaporización, oxidación, reducción y descomposición se conocen por un cambio inicial en la masa del material o la muestra. Todos los cambios descritos tienen un papel importante en la caracterización térmica de la muestra (Muneer *et al.*, 2020).

La respuesta termogravimétrica de los materiales compuestos también puede ser evaluada al comparar cuantitativamente las temperaturas alcanzadas con un porcentaje de pérdida de peso específico al establecer una tasa de aumento. La ganancia o pérdida de la masa depende de la atmósfera, puede ser estática o dinámica. Los gases utilizados, según corresponda, se clasifican de la siguiente manera: oxidantes (O_2 , aire), reductores (H_2 y CO), inertes (N_2 , He y Ar) y corrosivos (Cl_2 , F_2 , SO_2 y HCN) (Muneer *et al.*, 2020).

Esta técnica de TGA se ha utilizado ampliamente para estudiar el comportamiento del carbón durante la pirólisis a diferentes velocidades de calentamiento así como algunos otros parámetros. Así mismo es usada para caracterizar estabildades térmicas, oxidativas y de descomposición de la materia bajo condiciones distintas de presión y temperatura, con esto, examinar la cinética de procesos fisicoquímicos, contenidos de rellano o la humedad de algunos materiales y los efectos que tienen algunas atmósferas reactivas sobre los materiales. En general es una técnica útil para el estudio de materiales poliméricos, películas, pinturas y de varios compuestos (Vimal *et al.*, 2013).

1.7 Susceptibilidad antimicrobiana y antifúngica

Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana y antifúngica son muy importantes y fundamentales en los laboratorios de microbiología, ya que proporcionan una medida in vitro de la respuesta bacteriana o fúngica ante un agente antimicrobiano para predecir la eficiencia del mismo y obtener más información del comportamiento de los microorganismos (Smith y Kirby, 2019).

Existen diversos métodos para la medición de susceptibilidad de las bacterias y hongos. La técnica de dilución en agar para determinar la concentración mínima inhibitoria, MIC por sus siglas en inglés, proporciona resultados confiables y reproducibles, sin embargo requiere de tiempos prolongados y la metodología es compleja en comparación con otras. La dilución en caldo solo es apta para el grupo *B. fragilis*, sin embargo el gradiente por lo general es variable, lo que genera resultados menos confiables. El método de difusión en disco o también conocido como difusión en placa sugiere una solución idónea, dado que se lleva a cabo de manera rutinaria para analizar patógenos comunes y de rápido crecimiento con resultados confiables (Dubreuil *et al.*, 2020).

Las pruebas de difusión en disco basadas únicamente en la presencia o ausencia de una zona de inhibición sin tener en cuenta el tamaño de la zona no son aceptables para determinar la susceptibilidad antimicrobiana. Solo se pueden obtener resultados confiables con pruebas de difusión en disco que utilizan el principio de metodología estandarizada y mediciones de diámetro de zona correlacionadas con concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) con cepas que se sabe que son susceptibles o resistentes a varios agentes antimicrobianos o antifúngicos. El método estandarizado actualmente recomendado por Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI por sus siglas en inglés, (se basa en el método originalmente descrito por Bauer *et al.*, 1966), es el método de difusión en disco más ampliamente descrito para el cual los estándares interpretativos han sido desarrollados y respaldados por datos de laboratorio y clínicos (Cockerill *et al.*, 2012).

1.7.1 Terminología de pruebas de susceptibilidad

Categoría interpretativa de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos:

es una clasificación basada en la respuesta in vitro de un organismo a un agente antimicrobiano a niveles correspondientes en los tejidos o en niveles en sangre alcanzables con las dosis generalmente recetadas de ese agente. A continuación se describen algunas definiciones de la terminología de susceptibilidad (Cockerill *et al.*, 2012).

- **Susceptible:** Este término implica que los aislamientos realizados son inhibidos por las concentraciones que regularmente alcanza el agente antimicrobiano cuando se usa una dosis conocida.
- **Intermedio:** En este caso, el término incluye a los aislamientos con concentraciones de inhibición mínimas del agente antimicrobiano, mismo que son parecidos a los niveles de concentración de sangre usualmente conocidos, las tasas de respuesta son más bajas que los susceptibles.
- **Resistente:** El presente término se define como los aislamientos que no son inhibidos por las concentraciones del agente antimicrobiano, mismos que fueron utilizados con dosis normales. Estos representan los diámetros de zona de inhibición en el que el mecanismo de resistencia microbiana es probable, y la eficacia del agente contra el microorganismo no se ha demostrado con resultados confiables.
- **No susceptible:** Por último, este término es para los aislamientos para los cuales no hay un criterio de interpretación susceptible debido a que no hay cepas resistentes. Los aislamientos que tienen concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) por encima o diámetros de zona por debajo del valor indicado para el punto de ruptura susceptible se indican como “no susceptibles”.
- **Punto de corte/criterio interpretativo:** concentración inhibitoria mínima (MIC) o valor de diámetro de zona inhibición utilizado para indicar susceptibles, intermedios y/o resistentes como se definió anteriormente.

Uno de los grandes avances de la humanidad es la medicina. Sin embargo las enfermedades infecciosas siguen siendo hoy en día una de las causas de muerte más frecuente en el mundo. Es por ello que el estudio de la inhibición y/o eliminación de microorganismos no se ha detenido. A continuación se describen algunos microorganismos más comunes que son considerados patógenos (microorganismos que infectan otros organismos, provocando daños y lesiones).

Escherichia coli: bacteria gram negativa en forma de bacilo, es anaerobio facultativo de la familia *Enterobacteriaceae*. Por lo general, esta bacteria coloniza el intestino del ser humano y es considerado un microorganismo de flora natural, sin embargo hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño, produciendo enfermedades como la diarrea. *Escherichia coli* es una de las principales causas de infecciones en la sangre en todo el mundo y es responsable de una importante morbilidad, mortalidad y gastos sanitarios en pacientes (García-Hernández *et al.*, 2011; Holland *et al.*, 2020; Rodríguez-Ángeles, 2002).

Staphylococcus aureus: bacteria gram positiva en forma de coco que mide cerca de 1 μm de diámetro, no móvil, aerobios facultativo y fermentador de glucosa. Este tipo de bacteria normalmente habita en la piel y las membranas mucosas. Es causa común de infecciones en la piel y tejidos blandos, bacteremia, endocarditis, infecciones del tracto génito-urinario. Son sumamente resistentes a la meticilina y otros antibióticos que antes eran eficaces contra el tratamiento de las infecciones. Este microorganismo tiene características genéticas que le han permitido convertirse en una de las bacterias más importantes en la clínica y en las enfermedades transmitidas por alimentos (Grace y Fetsch, 2018; Velázquez-Meza, 2005; Zendejas-Manzo, *et al.*, 2014).

Candida albicans: Es un hongo unicelular que en estado de saprofito se encuentra en forma de levadura, células redondeadas u ovaladas de 2 a 4 μm , con paredes finas, su reproducción es asexual y se realiza mediante blastosporas que se forman por brotes o gemación simple. En estado parasitario forma filamentos con extremos

redondeados de 3 a 5 μm de diámetro, de longitud variable, los brotes no se separan de la célula madre y toman así una forma cilíndrica, formando pseudomicelios. Es un hongo comensal con potencial patogenicidad y es la principal especie fúngica de la microbiota intestinal. De todas las especies, *Candida albicans* es la que se aísla con mayor frecuencia en boca, señalándose en un rango de 90% de patogenicidad en relación a otras de su especies (Godoy, *et al.*, 2001; Rueda-Gordillo y Hernández-Solís, 2008).

1.8 Metodología de superficie de respuesta (MSR)

La metodología de superficie de respuesta, o MSR, es una colección de técnicas matemáticas y estadísticas útiles en el modelado y análisis de problemas en los que una respuesta de interés recibe la influencia de diversas variables en donde el objetivo es optimizar la respuesta. Por lo general la superficie de respuesta se representa gráficamente y para ayudar a visualizar dicha superficie con frecuencia se grafican los contornos de la superficie de respuesta como se muestra en la Figura 1.4. En la gráfica de contorno se trazan las líneas de respuesta constante en el plano X_1, X_2 , en donde cada contorno corresponde a una altura en particular de la superficie de respuesta (Montgomery, 2017).

En la mayoría de los problemas de MSR, se desconoce la relación entre la respuesta y las variables independientes. Por lo tanto, el primer paso de la MSR es encontrar una aproximación adecuada de la verdadera relación funcional entre la respuesta y las variables independientes. Por lo general se emplea un polinomio de orden inferior en alguna región de las variables independientes. Si la respuesta está bien modelada por una función lineal de las variables independientes, entonces la función de aproximación es el modelo de primer orden. Si existe curvatura en el sistema, entonces debe usarse un polinomio de orden superior, como el modelo de segundo orden. En casi todos los problemas de MSR se usa uno de estos modelos o ambos, siempre y cuando el modelo polinomial sea una aproximación razonable de la verdadera relación funcional en el espacio completo de las variables independientes (Montgomery, 2017).

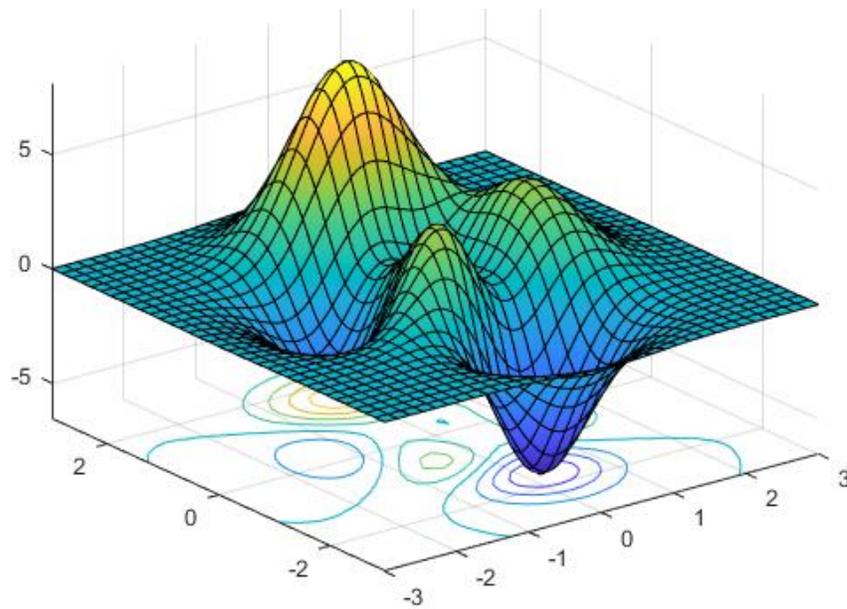


Figura 1.4 Gráfica de superficie de respuesta tridimensional con los contornos mostrados debajo del gráfico.

El ajuste y análisis de una superficie de respuesta se ve favorecida bajo la elección idónea de un diseño experimental, el cual es un conjunto específico de combinaciones de los niveles de las k variables, mismas que son consideradas para llevar a cabo el experimento (González-Calderón et al., 2018).

1.9 Antecedentes

Ali *et al.* (2018), informaron las actividades fotocatalíticas y antibacterianas del fotocatalizador de $\text{Ti}_{1-x}\text{Ag}_x\text{O}_2$ ($0.00 < x < 0.08$) nanométrico sintetizado por el método sol-gel. La difracción de rayos X (DRX) y los espectros de Raman revelan una estructura de anatasa de fase única para todas las muestras sustituidas, descartando la presencia de cualquier fase secundaria. Esto está bien respaldado por micrografías de TEM que muestran que las formas de las nanopartículas no son esféricas. El espectro UV visible ilustra que un borde de absorción se desplaza hacia la región visible. El 4.0% en moles de TiO_2 dopado con Ag muestra una degradación del 96% del azul de metileno (MB) dentro de los 60 min bajo irradiación con luz visible y exhibe el mayor rendimiento fotocatalítico. El catalizador activo tiene una

excelente estabilidad y durabilidad, manteniendo su alta eficiencia de degradación hasta un 89% después de las cinco ejecuciones sucesivas. También se observa un aumento en la actividad bactericida contra la cepa bacteriana (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter Cloacae*) con una mayor sustitución de Ag.

Natarajan *et al.* (2016), prepararon una película de nanocompuestos de quitosano/TiO₂/Ag contra las cepas bacterianas de agua potable envasadas. Observaron un aumento dependiente de la concentración en la reducción de la viabilidad celular en todos los aislamientos en condiciones de exposición a UV-C y oscuridad. El consorcio de bacterias mostró una mayor resistencia contra los efectos antibacterianos del nanocompuesto de quitosano/TiO₂/Ag en comparación con los aislados individuales. La prueba de glucocálix y la evaluación de masas concluyen la actividad antibacteriana efectiva al inhibir la adhesión bacteriana en la superficie de la película. La liberación de LDH y la generación de ROS actúan como el mecanismo antibacteriano predominante inducido por las nanopartículas de TiO₂/Ag. La caracterización de la superficie del nanocompuesto de quitosano/TiO₂/Ag los estudiaron mediante análisis FTIR y XRD y el análisis SEM después de la interacción con la bacteria.

Vallejo *et al.* (2016), estudiaron la actividad antimicrobiana de películas delgadas de TiO₂ solo y modificado con Ag. Las películas de TiO₂ solo se sintetizaron con el método Doctor Blade y las modificadas con Ag con el método de fotorreducción química bajo irradiación UV. Las propiedades de las películas se midieron por espectroscopia Raman y microscopía electrónica de barrido; también se determinó el efecto de la incorporación de las partículas de Ag en las propiedades antimicrobianas de las películas de TiO₂ frente a *Staphylococcus aureus*. Los resultados de la caracterización indicaron que las partículas de Ag se aglomeraban sobre la superficie del TiO₂ generando agregados del orden de los 200 nm; en el análisis por espectroscopia Raman se vio que los agregados de Ag depositados sobre las películas de TiO₂ podrían presentar el fenómeno de resonancia de plasmones

superficiales localizada. El ensayo preliminar de la actividad antimicrobiana indicó que la modificación de las películas de TiO_2 con partículas de Ag aumentó 2.18 veces la eficiencia del proceso.

Pham y Lee, (2015), investigaron las eficiencias de desinfección de los fotocatalizadores de TiO_2 y TiO_2 dopados con Cu, apoyados en fibras de vidrio (GF) bajo ultravioleta (UV) e irradiación visible, contra *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) contenido en un aerosol interior. Caracterizaron mediante SEM para morfología, XPS para estados elementales y espectroscopia ultravioleta-visible (UV-vis) para propiedades de absorción óptica. Bajo irradiación UV, la desinfección fotocatalítica de *S. aureus* por Cu- TiO_2 /GF (94.54%) fue mayor que la de TiO_2 /GF (93.24%). Bajo luz visible, TiO_2 /GF no mostró ninguna eficiencia de desinfección fotocatalítica significativa (3.27%), mientras que Cu- TiO_2 /GF mostró una alta eficiencia de desinfección fotocatalítica para *S. aureus* (más del 67%), incluso bajo luz visible, que se atribuyó al efecto del dopaje de Cu en el aumento de la eficiencia de separación del par electrón-agujero y la capacidad de generación del par electrón-agujero de TiO_2 . Por lo tanto, incluso bajo luz visible, el sistema de fotocatalizador de Cu- TiO_2 /GF podría generar pares de orificios de electrones, que luego reaccionaron con las moléculas de agua y oxígeno para producir radicales oxi, que son los principales agentes de descomposición para desinfectar o inactivar *S. aureus* en aerosoles.

Dhanalekshmi y Meena, (2014), prepararon nanopartículas de Ag- TiO_2 de tipo de núcleo-cubierta, la reducción simultánea de AgNO_3 y la hidrólisis del isopropóxido de Ti (IV) y las nanopartículas de cubierta de núcleo de Ag- SiO_2 se prepararon mediante el método de Stober. La caracterización la realizaron con técnicas de absorción, DRX y HR-TEM. Encontraron que los patrones de DRX muestran la presencia de la forma anatasa de TiO_2 , la forma amorfa de SiO_2 y la Ag (Ag). Las mediciones de microscopía electrónica de transmisión de alta resolución revelaron que su tamaño es inferior a 50 nm. Las propiedades antibacterianas de las nanopartículas de núcleo-cubierta de Ag- TiO_2 y Ag- SiO_2 contra *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) las examinaron mediante el método de difusión

en agar. Como resultado, demostraron que *E. coli* y *S. aureus* estaban sustancialmente inhibidos por las nanopartículas de núcleo-cubierta de Ag-TiO₂ y Ag-SiO₂. Estos resultados demostraron que se demostró que TiO₂ y SiO₂ soportados en la superficie de AgNPs sin agregación tienen una actividad antibacteriana mejorada.

Harikishore *et al.* (2014), prepararon polvos de TiO₂ puro nanocrystalino y TiO₂ (Ag-TiO₂) dopado con Ag al 5% en moles por vía sol-gel. Los polvos que prepararon se caracterizaron por difracción de rayos X (DRX) y UV-Vis. La propiedad antibacteriana de TiO₂ y Ag-TiO₂ la evaluaron mediante el método de placa extendida contra *Escherichia coli* como bacteria de prueba. La actividad fotocatalítica de Ag TiO₂ se estudió midiendo la degradación del azul de metileno (MB) bajo irradiación UV y los resultados se compararon con TiO₂ puro. Con los resultados de DRX confirman la presencia de fase anatasa en ambas muestras y el tamaño promedio de cristalita de ambas muestras se encontró en el orden de 6-15 nm. En 24 h de período de incubación, encontraron que Ag-TiO₂ mostró una inhibición completa del crecimiento de *Escherichia coli* en comparación con TiO₂ puro. Observaron que la eficiencia de degradación era mayor para el TiO₂ recocido a 500 °C en comparación con el TiO₂ de síntesis, y disminuye con un aumento adicional de la temperatura. Además, a medida que aumenta la concentración de tinte, disminuye la eficiencia de degradación del TiO₂ puro. Entre las muestras de TiO₂ y Ag-TiO₂, la eficiencia de degradación de MB fue mayor para Ag-TiO₂ en comparación con TiO₂ puro.

CAPÍTULO 2
MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología general bajo la cual se desarrolló el presente trabajo de investigación, se describe en la Figura 2.1, la cual abarca el cumplimiento de los objetivos que persigue dicha investigación.

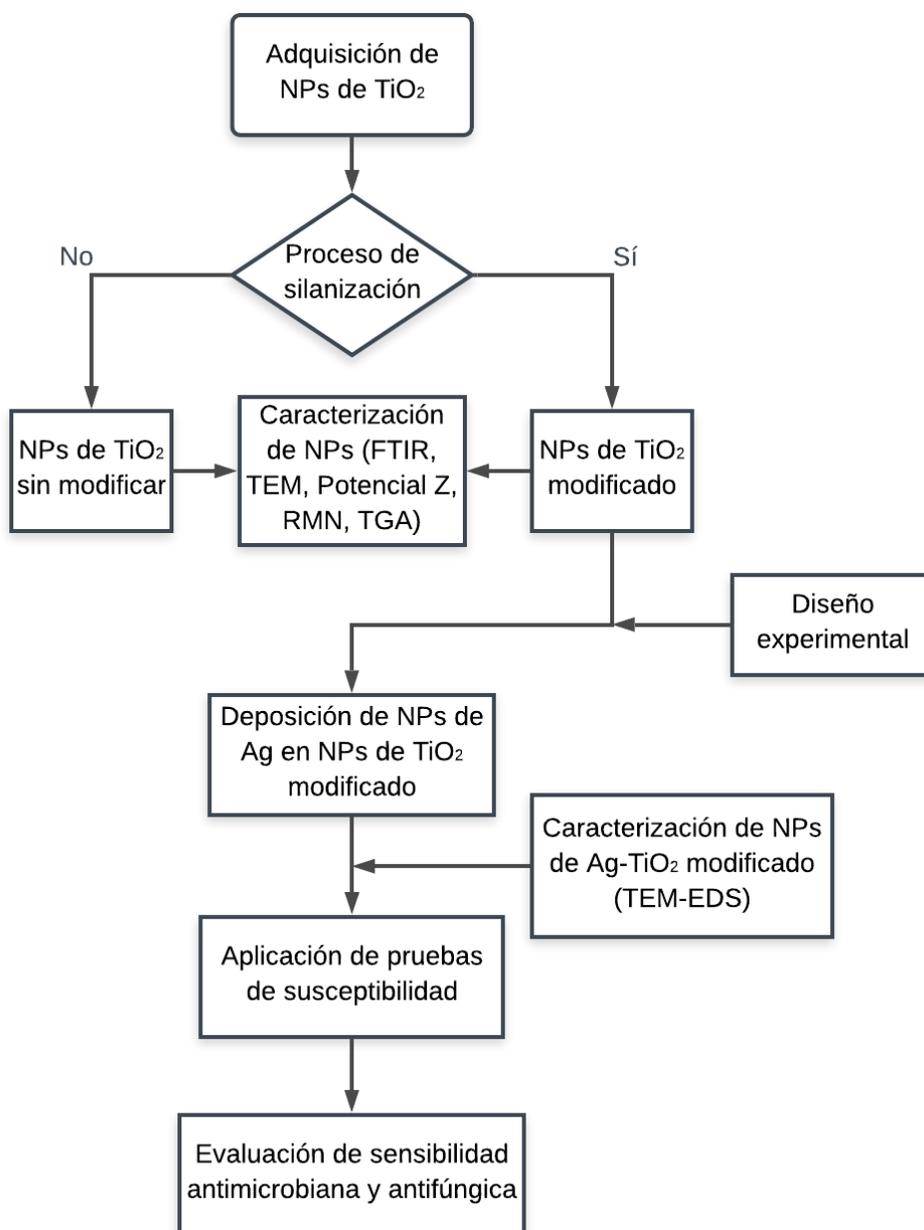


Figura 2.1 Metodología general para la optimización de la deposición de puntos de Ag sobre nanopartículas de TiO_2 .

2.1 Materiales

Las nanopartículas de TiO_2 con estructura cristalina de rutilo, con un diámetro aproximado de 350 nm marca DuPont (R-104 DuPont, México) fueron utilizadas para este trabajo. El 3-Aminopropiltriethoxisilano (APTES) fue adquirido de Sigma Aldrich, México. Los microorganismos empleados, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* y *Aspergillus niger*, fueron proporcionados por el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

2.2 Modificación química de nanopartículas de TiO_2

El desarrollo experimental de esta sección se llevó a cabo en el laboratorio de Plantas Piloto del Instituto Tecnológico de Orizaba. Las etapas del proceso de silanización de nanopartículas se presentan en la Figura 2.2.



Figura 2.2 Etapas del proceso de silanización de nanopartículas de TiO_2 .

2.2.1 Proceso de silanización

La incorporación del agente de acoplamiento (APTES) de manera superficial en el TiO_2 se le conoce como silanización. De acuerdo con los datos obtenidos por López-Zamora, *et al.*, (2018) y Martínez, (2017), la ruta de experimentos para la modificación de nanopartículas de TiO_2 que proporcionó los mejores resultados fue la denotada como M3, la cual requiere 1 mL de APTES, 100 mL de etanol y 1 mL de agua por cada 5 g de TiO_2 a modificar, para fines más prácticos se trabajó con el doble de cantidades para producir el TiO_2 modificado en un menor número de lotes.

El primer paso fue la incorporación del TiO_2 en Etanol (Alcohol Etilico Absoluto Anhidro marca J.T. Baker al 99.90%) para lo cual se intercalaron 30 min de agitación magnética en una parrilla eléctrica (Thermo Scientific, Cimarec), con 30 min de sonificado a 40KHz en un baño ultrasónico (Bransonic, modelo 5510R-MT), hasta completar un tiempo total de 2.5 h (iniciando con agitación magnética), como se muestra en la Figura 2.3. Posteriormente, se añadió el APTES y en un intervalo de 10 min se agregó el agua para permitir la hidrolisis en la reacción, esta mezcla se dejó en agitación a 400 rpm por 6 h más. La solución fue colocada en tubos falcon de 50 mL. Éstos fueron colocados en una centrifuga (BHG ROTO-UNI, N° 4603) para llevar a cabo lavados, dos con agua destilada para remover el medio de reacción y cinco con metanol (Alcohol Metílico Absoluto marca J.T. Baker) para retirar los agentes que no hayan reaccionado, cada lavado por centrifugación se realizó a 3000 rpm durante 10 min. La mezcla obtenida sedimentada por la fuerza centrifuga se colocó en charola de aluminio para su posterior secado en horno (Horno de convección de secado, Lab-Line Instruments, modelo 3471) a 80 °C durante 3 h (Figura 2.4). El material seco se almacenó en tubos para trabajarlos en pruebas posteriores. El pesado de los reactivos se llevó a cabo en una balanza analítica (VELAB, modelo VE-210).



Figura 2.3 Incorporación de TiO_2 en Etanol (Proceso intercalado de agitación y sonicación).



Figura 2.4 Secado en horno de TiO_2 modificado

2.3 Caracterización de nanopartículas de TiO_2 modificadas

Las siguientes secciones abordarán la caracterización que se realizó en las nanopartículas de TiO_2 , las cuales fueron modificadas superficialmente con el agente de acoplamiento APTES, con el objetivo de lograr una mejor dispersión en solución de las mismas.

2.3.1 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

En el espectro infrarrojo se pueden analizar sólidos, líquidos, polvos, gases y polímeros. Debido a esto, los espectros de FTIR de las NPs de TiO_2 silanizado y sin modificar se midieron usando un espectrómetro infrarrojo de transformación de Fourier (FTIR-ATR Perkin Elmer, modelo Spectrum 100). Los análisis incluyeron el rango de número de onda de 3000 a 1000 cm^{-1} con 80 exploraciones o barridos por espectro, colocando las nanopartículas en forma de gránulos para una mejor lectura, este procedimiento fue utilizado por Vallejo-Montesinos *et al.*, (2019).

Los dos diferentes tipos de TiO_2 se analizaron en sólido con el fin de comprobar la reacción química que se obtuvo con el APTES durante la silanización y corroborar la presencia del sílice en la nanopartícula. Esto se realizó a una temperatura fija de 30°C para nanopartículas de TiO_2 y TiO_2 modificado, así como también en un rango de temperaturas de 30°C hasta 446°C (con un delta de 6.5°C) para TiO_2 modificado.

2.3.2 Microscopía de transmisión por electrones (TEM)

El tamaño y morfología de las NPs se obtuvieron con microscopía electrónica de transmisión (TEM) en un microscopio (JEOL modelo JEM 1230) como lo describe González-Calderón *et al.*, (2018). Las muestras consistieron en 0.005 g de cada nanocompuesto suspendidos en 2 mL de etanol y sonicados por 5 min, al momento de observar en el microscopio se colocó una gota de 10 μ L sobre una rejilla de cobre.

La calidad de las imágenes depende del método de preparación de la muestra, por lo que se recomienda es que la muestra sea lo más fina posible.

El fin de esta prueba es evidenciar la presencia del recubrimiento con el APTES sobre las nanopartículas de TiO₂ y compararlas con el TiO₂ sin modificar.

2.3.3 Potencial Z

Con el fin de determinar de manera cualitativa la presencia del agente de acoplamiento en la superficie de las nanopartículas, las muestras fueron sonicadas en viales para hacer soluciones coloidales, y mezcladas con un agitador tipo vortex modelo Vortex-Genie 2 Scientific Industries, el propósito fue monitorear la precipitación de partículas como lo describió López-Zamora *et al.*, (2018) y Martínez, (2017).

La carga superficial (potencial zeta) de los dos diferentes sistemas de nanopartículas de TiO₂ fueron caracterizados un medidor de Potencial Z Delsa Nano C Particle Analyzer (A53878), utilizando esparcimiento de luz electroforética (ELS). Este equipo cuenta con una fuente dual de 30 mW y un diodo láser de 659 nm.

El método consistió en suspender las nanopartículas en agua a una concentración de 0.01% p/v realizando un barrido de pZ a diferentes pH (medidos en un potenciómetro Thermo Scientific, modelo Orion Star A211) modificados con HCl 0.1N e NaOH 0.1N. Esta técnica permitió conocer el efecto de los grupos funcionales enlazados al TiO₂ y su comportamiento en medio ácido y básico así como evaluar la estabilidad en medio acuoso, técnica utilizada por González-Rodríguez *et al.*, (2018).

2.3.4 Resonancia magnética nuclear (RMN)

Con el objetivo de obtener la estructura interna del TiO₂ silanizado se utilizó la técnica de Resonancia magnética nuclear (RMN).

Los espectros de RMN (²⁹Si y ¹³C) de las nanopartículas se obtuvieron del equipo Bruker Ascend (400 MHz) que opera a 400 MHz para ²⁹Si y a 100 MHz para ¹³C. Los parámetros establecidos para el caso de ¹³C fueron un número de exploración o escan de 16 y una longitud de pulso de 8.5 μs.

2.3.5 Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico fue efectuado en un TGA marca TA marca Instruments Modelos Q500, calibrado en una canastilla de platino, se realizó en un rango de temperaturas de 25 a 600°C, con una rampa de calentamiento de 10°C/min en una atmosfera de nitrógeno con flujo constante de 60 mL/min. Se colocó aproximadamente 10 mg de TiO₂ silanizado (modificado) en la canastilla. El análisis fue realizado para cotejar los cambios físicos y químicos presentes por el recubrimiento orgánico del TiO₂ además de analizar su estabilidad térmica.

2.4 Diseño de experimentos

Un Diseño Central Compuesto (CDC) de tres factores se planteó para estudiar el proceso de deposición de nanopartículas de Ag en la superficie de TiO₂, a fin de determinar la influencia de cada uno de los factores considerados. El CDC es un diseño factorial o factorial fraccionado con puntos centrales, ampliado con un grupo de puntos axiales que permiten estimar la curvatura, se utilizan para estimar eficientemente los términos de primer orden y segundo orden y para modelar una variable de respuesta con curvatura al agregar puntos centrales y axiales a un diseño factorial previamente ejecutado (Montgomery, 2017). Las variables evaluadas fueron pH (X_1), Concentración de AgNO₃ con respecto al TiO₂ (% p/p) (X_2) y cantidad de NPs de TiO₂ en solución (g) (X_3) teniendo como variable de respuesta, la zona de inhibición de los discos sobre la placa (halos medidos en mm) de cada una de las unidades experimentales, con el fin de demostrar que existe influencia significativa

de dichas variables en la inhibición de *Staphylococcus aureus*. A continuación se describen los factores con sus respectivos niveles:

- **pH.** La literatura indica que la síntesis de nanopartículas de Ag en TiO₂ es posible tanto en condiciones ácidas como básicas, sin embargo Quiñones-Jurado *et al.*, (2014) mostraron que la condición alcalina juega un papel importante durante la deposición de Ag en TiO₂ respecto al rendimiento de la reacción de reducción de Ag⁽⁺⁾ a Ag⁽⁰⁾ durante la síntesis del nanocompuesto Ag/TiO₂. Debido a esto se trabajó con los siguientes valores de pH (8, 10 y 12).
- **Concentración en peso de AgNO₃ con respecto al TiO₂ (relación p/p).** Existen diversas rutas para preparar este tipo de nanocompuestos, como por ejemplo, por reducción química de iones en solución y sintetizados por método sol-gel por nombrar algunos y en la mayoría de los casos, los autores optan por trabajar concentraciones de Ag relativamente bajas, como lo es el caso de Afanasyev *et al.*, (2016), Ali *et al.*, (2018), Amin *et al.*, (2009), Angkaew y Limsuwan, (2012), Dhanalekshmi y Meena, (2014), Harikishore *et al.*, (2014) y Li *et al.*, (2011). Dado lo anterior se optó por trabajar las siguientes relaciones en peso (4, 7 y 10 %p/p).
- **Sólidos totales (Cantidad de nanopartículas de TiO₂ en solución).** Existe muy poca o nula información en la literatura sobre la reducción química directa del TiO₂, regularmente parte del tetraisopóxido de titanio, debido a este hecho se tomó en consideración el trabajo realizado por Quiñones-Jurado *et al.*, (2014), donde utilizaron 5 g de TiO₂ por cada 250 mL de agua desionizada, por lo cual se trabajó con las siguientes cantidades (3, 5 y 7 %p/v).

El Software estadístico MINITAB 2017 (versión 17.1; MINITAB Inc., State College, PA, USA) se usó para el análisis de datos, modelos de predicción y construcción de las gráficas de superficie y contorno. La exactitud de las ecuaciones polinomiales fue expresada por R² (coeficiente de determinación) y su significancia estadística fue verificada por la prueba F a un nivel de confianza del 95%.

La matriz estudiada para este CDC se muestra en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1 Niveles del diseño experimental de las variables estudiadas.

Variable (unidades)	Factores	Niveles		
	X	(-1)	0	(+1)
pH	X_1	8	10	12
Concentración de AgNO_3 con respecto al TiO_2 (Relación en % p/p)	X_2	4	7	10
Concentración de nanopartículas (g/250 mL)	X_3	3	5	7

2.5 Deposición de nanopartículas de Ag en nanopartículas de TiO_2 modificado

El desarrollo experimental de esta sección se llevó a cabo en el laboratorio de Plantas Piloto del Instituto Tecnológico de Orizaba. Las etapas de la deposición de Ag en TiO_2 modificado se presentan en la Figura 2.5

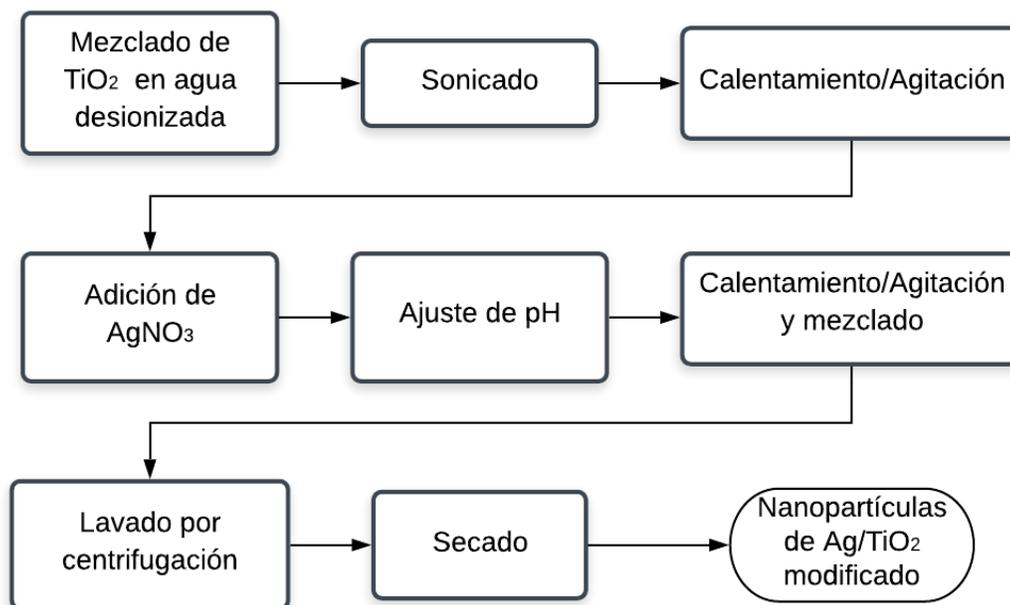


Figura 2.5 Etapas del proceso de deposición de nanopartículas de Ag en TiO_2 .

2.5.1 Proceso de dopaje entre Ag y TiO_2

La preparación de Ag metálica en la superficie de TiO_2 se basó en la ruta de reducción química de AgNO_3 propuesta por Quiñones-Jurado *et al.*, (2014). La

cantidad de TiO_2 (sólidos totales), el pH y la concentración Ag/TiO_2 (relación p/p) fue de acuerdo al diseño experimental propuesto en la Sección 2.4.

La suspensión acuosa de nanopartículas de TiO_2 se preparó añadiendo la cantidad requerida del mismo a 250 mL de agua desionizada seguido de sonicación (Baño ultrasónico, Bransonic modelo 5510R-MT) durante 10 min. A continuación la suspensión se calentó a 80 °C con agitación vigorosa para lo cual se utilizó una parrilla magnética (Thermo Scientific, Cimarec). Una vez que se alcanzó la temperatura, se añadió a la suspensión la cantidad requerida de AgNO_3 (Nitrato de plata marca J.T. Baker al 99.80%) para obtener la concentración deseada, manteniendo el calentamiento y la agitación. Posteriormente, se ajustó el pH de la suspensión mediante la adición de una solución de NaOH 0.5 M. Una vez que se obtuvo el pH idóneo, la suspensión a 80 °C se mezcló durante 2 h, posteriormente, la solución se colocó en tubos falcon para proceder con centrifugación, se lavaron con agua destilada en dos ocasiones para remover agentes sin reaccionar. La mezcla obtenida sedimentada por la fuerza centrífuga se colocó en charola de aluminio, esta se secó en horno (Horno de convección de secado, Lab-Line Instruments, modelo 3471) a 80 °C durante 12 h. El pesado de los reactivos se llevó a cabo en una balanza analítica (VELAB, modelo VE-210).

2.6 Caracterización de nanopartículas dopadas con Ag

Las siguientes secciones abordarán la caracterización de las nanopartículas de TiO_2 que fueron dopadas con Ag, se tomó en consideración el halo/zona de inhibición más grande y más pequeño (variable de respuesta del diseño experimental).

2.6.1 Microscopía de transmisión por electrones (TEM)

El tamaño y morfología de las NPs dopadas con Ag se obtuvieron con microscopía electrónica de transmisión (TEM) en un microscopio (JEOL modelo JEM 1230) como se describe en la Sección 2.3.2. La finalidad de esta caracterización es evidenciar la presencia de las NPs de Ag en la superficie de las nanopartículas de TiO_2 . De igual manera, en el equipo utilizado de TEM (JEOL modelo JEM 1230), se realizaron los

análisis elementales y de dispersión de las muestras de TiO₂ dopado con Ag, mismos que se analizaron con un detector de rayos X de espectroscopia de dispersión de energía (EDS).

2.7 Pruebas de susceptibilidad de disco (Método de Kirby-Bauer)

La prueba de sensibilidad utilizando el procedimiento del disco es una modificación de la técnica descrita por Bauer, Kirby, Sherris y Turk; se describe en las secciones siguientes.

2.7.1 Medio de cultivo

Se utilizaron diferentes medios de cultivo dependiendo del microorganismo a emplear o inhibir, Agar de sal y manitol para *Staphylococcus aureus*, Agar EMB (Eosina y azul de metileno) para *Escherichia coli* y Agar Saboraud para *Candida albicans* y *Aspergillus niger*, de manera general se prepararon de la siguiente manera:

Se preparó el medio de acuerdo a las instrucciones de la casa manufacturadora (se indica el método de preparación en los Anexos A1, A2 y A3 respectivamente de cada tipo de agar empleado). Debido a que la temperatura del medio era alta al finalizar el tiempo de esterilización, fue necesario colocarlo a baño maría hasta que se alcanzó una temperatura de 48-50°C aproximadamente. Finalmente se distribuyó el medio en una cantidad aproximada de 25 cm³ en cajas Petri las cuales fueron previamente esterilizadas.

2.7.2 Discos de papel filtro para impregnación de nanopartículas

Los discos de papel filtro se prepararon para las diferentes unidades experimentales, 22 sistemas en total (20 unidades del diseño de experimentos y 2 unidades de control de TiO₂ y TiO₂ silanizado), la preparación fue la siguiente:

Se recortaron discos de papel filtro con una perforadora comercial, estos discos fueron de 6 mm de diámetro cada uno. A continuación fueron colocados en número de 6 a 8 discos en tubos eppendorf de 2 mL de capacidad (1 tubo por cada sistema). Realizado lo anterior los tubos fueron esterilizados en autoclave a 121°C por 15 min.

Para evitar confusión con los diferentes sistemas que se trabajaron, estos fueron rotulados con el número de cada unidad experimental o sistema en cuestión. Una vez rotulados, se agregó a cada tubo 1.5 mL aproximadamente de una solución a 1000 ppm de cada sistema, previo a esto los tubos permanecieron 15 min en una cámara de luz UV. Por último, se almacenaron a temperatura ambiente por 24 h para permitir la impregnación de las nanopartículas en los discos.

2.7.3 Inóculo

Se seleccionaron de 4 a 5 colonias del microorganismo en turno de un cultivo puro. Se transfirieron las colonias tocando la parte superior de cada una con asa bacteriológica a un tubo que contenía de 3-5 cm³. de caldo estéril de Mueller-Hilton.

Se incubó este cultivo a 35°C por un tiempo de 2 a 8 h hasta que se produjo un crecimiento moderado, este crecimiento se determinó al comparar el caldo puro con el que contenía microorganismo, en el cual se observó un cambio en la turbidez atribuido al crecimiento del propio microorganismo. Se diluyó el cultivo con caldo estéril a 5:9 hasta obtener una turbidez equivalente al tubo 0.5 de la escala de McFarland lo cual corresponde aproximadamente a 10⁸ microorganismos viables por mL.

2.7.4 Estándar de turbidez

Para preparar el estándar antes mencionado, se añadió 0.5 mL de BaCl₂ dihidratado (1.175 % p/v) a 99.5 mL de H₂SO₄ 0.36N (1% p/v). Se mezcló perfectamente y se distribuyó en tubos tapa roscada en cantidad de 6-8 mL; se sellaron herméticamente y se almacenaron en un lugar oscuro a temperatura ambiente. Para hacer la comparación con el cultivo, se agitó el estándar con un agitador tipo vortex.

2.7.5 Siembra de la muestra

El sembrado de la muestra se realizó en una campana de extracción, previamente esterilizada con luz UV, el procedimiento general se describe a continuación:

Para llevar a cabo un sembrado idóneo se sumergió un hisopo de algodón estéril, dentro del tubo con la suspensión del microorganismo en turno, en dilución 5:9 (esta dilución no sobrepasa el estándar de turbidez equivalente a 0.5 de la escala de McFarland). Una vez que el hisopo se encontraba dentro del tubo se colocó por encima del nivel del contenido del tubo y se rotó contra las paredes del mismo para remover el exceso de inóculo que este presentaba. Enseguida se sembró el inóculo uniformemente sobre la superficie del medio de la caja Petri con el hisopo. Esta siembra se realizó en cuatro direcciones, rotando la caja Petri 90 grados. Se evitó que los inóculos fueran muy concentrados o diluidos y que quedaran partes del medio sin inocular. Una vez que se inocularon las cajas de todos los sistemas fue necesario dejar que la superficie del medio sembrado se secase durante 15 min, manteniendo la caja Petri cerrada. Transcurrido el tiempo, de los tubos eppendorf rotulados con cada sistema (los cuales estuvieron 24 h en reposo para la impregnación de las nanopartículas), se colocaron discos sobre la superficie del agar con pinzas estériles, se presionaron ligeramente los discos sobre el agar para asegurar un contacto uniforme. Se rotulo cada caja correspondiente a cada tubo eppendorf de cada sistema. Se colocaron un total de 3 discos en la superficie del medio procurando dejar un espacio uniforme entre cada disco para poder observar mejor los resultados de los halos de inhibición. Una vez que las cajas Petri ya contenían los discos sobre la superficie, se envolvieron con papel parafilm para evitar movimientos bruscos del medio. Por último en estufa de secado (Lab-Line Instruments, modelo 3471), se incubaron todas las cajas a 35°C por 36 h para dejar crecer el microorganismo.

2.7.6 Medición de los halos de inhibición

Para medir la zona de inhibición de cada disco, estos se mantuvieron dentro de la campana de extracción sobre la superficie oscura de la misma, con buena iluminación y luces reflejadas sobre las cajas. A continuación se tomaron fotos electrónicas con un teléfono móvil con resolución de 12Mp para cada uno de los sistemas. Estas fotos almacenadas se analizaron con el software ImageJ versión

1.52a, el análisis para obtener el diámetro del halo o zona de inhibición consistió de la siguiente manera: Una vez el software abierto, se abre el archivo de la foto para cada uno de los sistemas, se selecciona la escala conocida (los 6mm de diámetro del disco de papel filtro) y después se seleccionan las longitudes del diámetro de toda la zona de inhibición incluyendo el diámetro del disco, estas mediciones se realizan por triplicado en cada uno de los 3 discos y en diferentes direcciones, para finalizar se sacó un promedio de las mediciones obtenidas para cada uno de los sistemas. Este promedio hace referencia al diámetro de cada unidad experimental en cuestión.

2.8 Prueba de susceptibilidad (HT-SPOTi, inhibición del crecimiento de cultivos puntuales de alto rendimiento)

El método de inhibición de crecimiento de cultivos puntuales de alto rendimiento, por sus siglas en inglés HT-SPOTi, es un método sencillo y relativamente económico que consume cantidades mínimas de inhibidores y que proporciona información directa y confiable en un corto período de tiempo. Es un proceso de tres pasos que involucra el crecimiento de microorganismos en agar que contiene concentraciones de moléculas inhibitoras, para nuestro caso, nanopartículas de TiO₂ dopadas con Ag.

Se empleó este método en dos especies distintas de hongos, *Candida albicans* y *Aspergillus niger*, para demostrar la eficiencia de esta metodología al detectar perfiles de resistencia frente al antimicótico con las nanopartículas de TiO₂ dopadas con Ag.

Al adaptar el ensayo a diferentes microorganismos, se debe tener cuidado de usar condiciones de crecimiento que sostengan los microorganismos que se utilizan. Estas condiciones incluyen medio de crecimiento (agar) y temperatura de incubación, se utilizó Agar Dextrosa y papa e incubación a 38 °C. A continuación se describe el método HT-SPOTi adaptado en las secciones siguientes (Danquah *et al.*, 2016).

2.8.1 Preparación de la placa

La placa consta de 12 filas numeradas del “1” al “12” y de 8 renglones denotados de la “A” a la “H”, como se muestra en la Figura 2.6. Cada renglón era asignado a una

muestra diferente, los últimos dos renglones son de control (G y H), estos últimos contienen al microorganismo puro en agar y únicamente agar respectivamente, debido a lo anterior, por cada placa se puede trabajar hasta con 6 muestras o unidades experimentales diferentes.

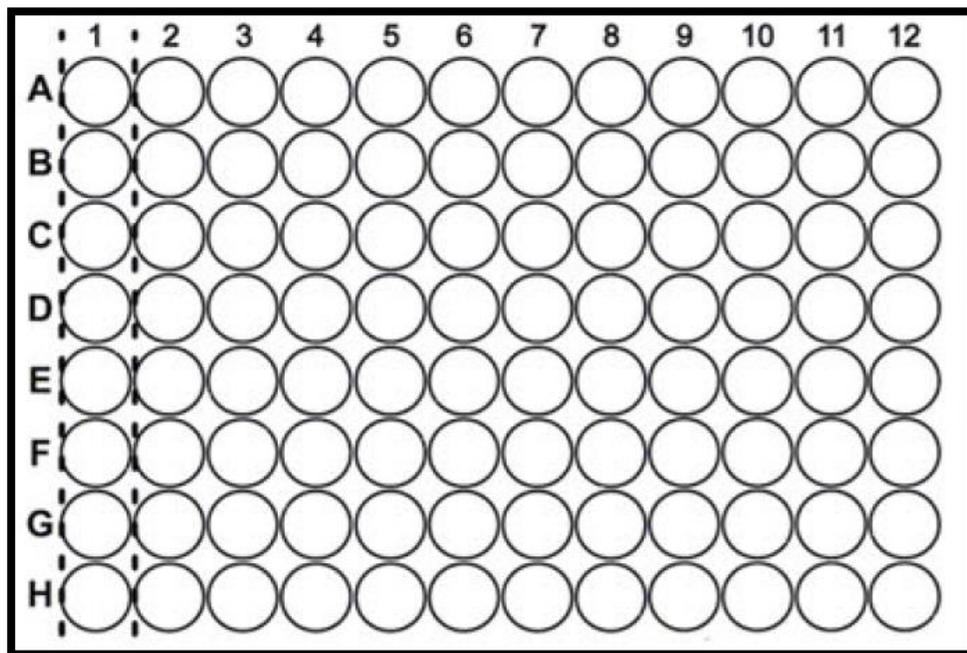


Figura 2.6 Placa de la técnica HT-SPOTi.

Se seleccionaron 4 concentraciones diferentes (con la misma diferencia en unidades entre cada una) a criterio propio, aptas para cada microorganismo en turno, esto fue para preparar disoluciones de las nanopartículas que se evaluaron con el método HT-SPOTi. Como se mencionó antes, cada renglón es utilizado por una sola muestra, cada concentración se realizó por triplicado, es decir, Fila 1-3 primera concentración, Fila 4-6 segunda concentración, Fila 7-9 tercera concentración y Fila 10-12 cuarta concentración.

Se agregaron 20 μL de las disoluciones preparadas de las unidades experimentales a cada pocillo de la placa (cada concentración por triplicado como se explicó anteriormente) una muestra diferente por cada renglón. A continuación se agregaron

100 μL de agar previamente preparado a todos los pocillos de la placa, incluyendo renglones de las unidades experimentales y los dos renglones de control (el medio agar es dependiendo cada microorganismo). Por último, en un lapso de 10 min, se agregaron 10 μL del microorganismo en turno a todos los pocillos de la placa, con excepción del último renglón de control que solo contiene agar.

2.8.2 Incubación y observación

Una vez que se colocó la suspensión con el microorganismo en cada pocillo, se dejó absorber por el agar durante 5 min, se agitó suavemente la placa sobre la superficie lisa de la cámara donde se realizó, para permitir que las paredes de cada pocillo no quedaran con muestra o microorganismo en cuestión.

A la placa se le colocó su tapa plástica, ésta se selló con papel Parafilm y se incubó invertida a 38 °C en estufa de secado (Lab-Line Instruments, modelo 3471). El crecimiento se observó en un periodo de 2 días, cada 12 h (esto depende de cada microorganismo, dado que los tiempos de duplicación son diferentes).

El pozo que contiene la concentración más baja del fármaco (nanopartículas de TiO_2 dopadas con Ag) en el que no se registra crecimiento observable dentro del período de incubación se determina como el MIC (concentración más baja a la que se inhibe el crecimiento del organismo) de ese fármaco contra el microorganismo.

2.9 Metodología de superficie de respuesta (MSR)

El análisis estadístico se ajustará a un modelo de segundo orden el cual incluya los efectos principales (variables independientes), los cuadrados y las interacciones de los mismos, incorporando la curvatura que aproxime la respuesta del modelo generado por el diseño experimental utilizado, para nuestro caso el Diseño Central Compuesto. El modelo tendrá la forma de la Ecuación 2.1.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \epsilon \quad (2.1)$$

Donde la solución matemática general del modelo de experimentación para la localización del punto estacionario se realizará con la notación matricial descrito en la

Ecuación 2.2, que comprende la estructura de las Ecuaciones 2.3 a la 2.5 (Montgomery, 2017).

$$\hat{y} = \hat{\beta}_0 + x'b + x'Bx \quad (2.2)$$

Donde

$$x = \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \\ \vdots \\ x_k \end{bmatrix} \quad (2.3) \quad b = \begin{bmatrix} \hat{\beta}_1 \\ \hat{\beta}_2 \\ \vdots \\ \hat{\beta}_k \end{bmatrix} \quad (2.4) \quad y \quad B = \begin{bmatrix} \beta_{11} & \frac{\beta_{12}}{2} & \frac{\beta_{1k}}{2} \\ \frac{\beta_{12}}{2} & \ddots & \frac{\beta_{2k}}{2} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ \text{simétrica} & \dots & \beta_{kk} \end{bmatrix} \quad (2.5)$$

Al definir los coeficientes de regresión, la matriz simétrica cuya diagonal principal son los coeficientes cuadráticos puros y anexos los coeficientes cuadráticos mixtos, la solución del punto estacionario está dada por la Ecuación 2.6 (Montgomery, 2017).

$$x_s = -\frac{1}{2}B^{-1}b \quad (2.6)$$

Además, la respuesta predicha en el punto estacionario puede calcularse como lo describe la Ecuación 2.7.

$$\hat{y}_s = \hat{\beta}_0 + \frac{1}{2}x_s'b \quad (2.7)$$

La forma canónica del modelo de segundo orden está dada por la Ecuación 2.8 y 2.9,

$$|B - \lambda I| = 0 \quad (2.8)$$

$$\hat{y} = \hat{y}_s + \lambda_1 w_1^2 + \lambda_2 w_2^2 + \dots + \lambda_k w_k^2 \quad (2.9)$$

en donde, w_k^2 son las variables independientes, la denotación de los eigenvalores (λ_i , raíces de la ecuación de determinantes) determinarán el tipo de punto estacionario que se encontró de acuerdo a lo siguiente (Montgomery , 2017):

- Si λ_i es positivo para toda i , existe un mínimo
- Si λ_i es negativo para toda i , existe un máximo
- Si existen signos alternos, se tiene un punto de silla

CAPÍTULO 3
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización de nanopartículas de TiO₂ modificadas

Esta sección se realizó la caracterización de las nanopartículas de TiO₂ silanizadas (modificadas) con el fin de validar que el proceso se llevó de manera idónea al modificar la superficie del TiO₂.

3.1.1 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Las Figuras 3.1 y 3.2 muestran el espectro FTIR de TiO₂ y TiO₂ modificado, respectivamente, en un intervalo de medición de 3000 a 1000 cm⁻¹ a 100 barridos/scans y a una resolución de 4cm⁻¹.

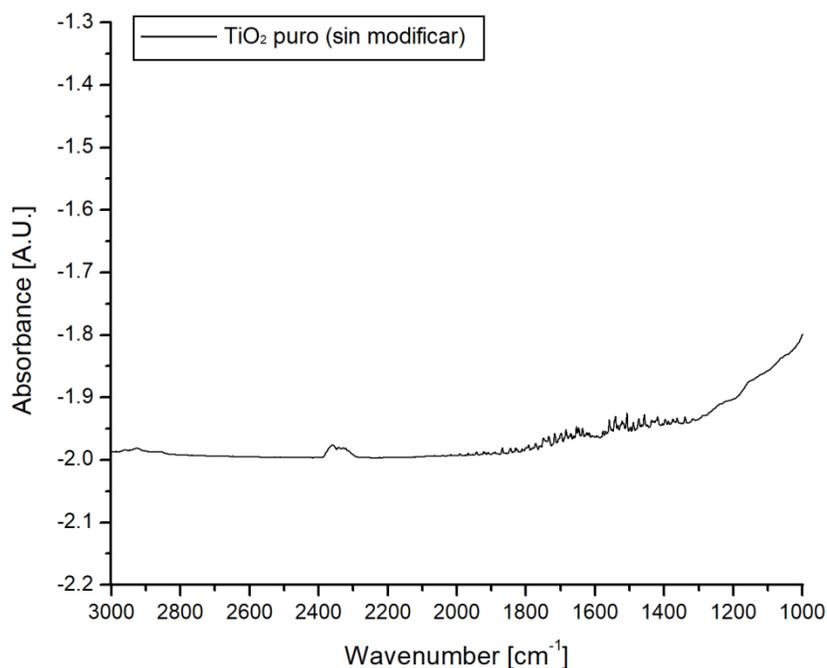


Figura 3.1 Espectro FTIR de nanopartículas de TiO₂ puro (sin modificar).

Una vez que se realizó la modificación de la superficie con el agente de acoplamiento se observó la vibración de estiramiento simétrica y asimétrica del enlace C-H en el grupo metileno a 2960, 2927 y 2858 cm⁻¹ como también lo reportan en esa región González-Rodríguez *et al.*, (2018), Thuy *et al.*, (2013) y Zhao *et al.*, (2012). El pico

que abarca entre 1630 a 1640 cm^{-1} se atribuye a la vibración de estiramiento de agua absorbida así como los grupos hidroxilo (OH^-) presentes en la superficie de las nanopartículas, como lo reporta Chen y Yakovlev, (2010), Vallejo-Montesinos *et al.*, (2019), Vargas *et al.*, (2011) y Zhao *et al.*, (2012); un pequeño pico a 1641 cm^{-1} corresponde a la vibración de estiramiento del grupo $(\text{NH})\text{C}=\text{O}$ descrito por Thuy *et al.*, (2013).

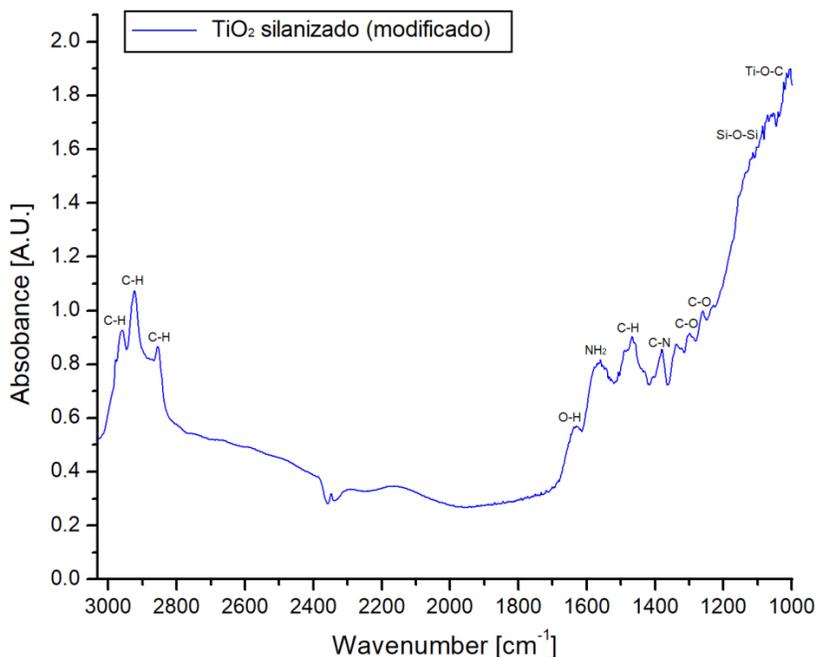


Figura 3.2 Espectro FTIR de nanopartículas de TiO_2 silanizado (modificado).

Otra de las evidencias respecto a la modificación del APTES sobre la superficie de nanopartículas se muestra en el espectro en el pico correspondiente a 1560 cm^{-1} que corresponde a la flexión del grupo funcional amino ($-\text{NH}_2$) señalado por Chen y Yakovlev, (2010) y Zhao *et al.*, (2012). El pico mostrado entre 1420 y 1490 cm^{-1} corresponde a la banda elástica del enlace de los grupos orgánicos C-H reportados por Natarajan *et al.*, (2016), Vallejo-Montesinos *et al.*, (2019) y Vargas *et al.*, (2011). El pico observado a 1378 cm^{-1} se asignó al grupo de aminas aromáticas C-N que hace referencia a Thuy *et al.*, (2013). También se observó la banda de estiramiento de los enlaces del grupo C-O a 1259 cm^{-1} en concordancia con González-Rodríguez

et al., (2018) y el grupo carbonilo a 1300 cm^{-1} reportado por Vallejo-Montesinos *et al.*, (2019). Finalmente los últimos picos en la parte del espectro alrededor de 1120 , 1130 y 1044 cm^{-1} indican la presencia del enlace Si-O-Si que muestra el siloxano polimérico como producto del precursor de organosilano descritos por Chen y Yakovlev, (2010), Vallejo-Montesinos *et al.*, (2019) y Zhao *et al.*, (2012); de igual forma picos tales como 1045 , 1075 y 1130 cm^{-1} se atribuyen a los enlaces Ti-O-C señalados por Vallejo-Montesinos *et al.*, (2019) y Vargas *et al.*, (2011). Con lo anterior descrito se confirma la modificación superficial de las nanopartículas de TiO_2 con el agente de acoplamiento (APTES).

Se realizó otro análisis de espectro FTIR de TiO_2 silanizado a diferentes temperaturas, ilustrado en la Figura 3.3, con el objetivo de observar los grupos funcionales en el mismo y visualizar el comportamiento. Se observan señales características del TiO_2 silanizado y como se esperaba, las señales de absorbancia se mantienen sin importar las diferentes temperaturas con las que se trabajó.

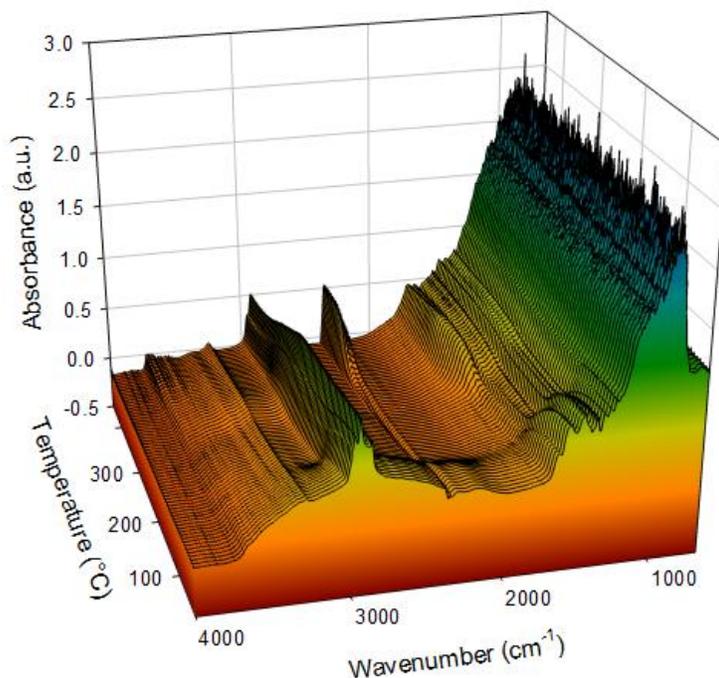


Figura 3.3 Espectro FTIR de nanopartículas de TiO_2 silanizado (modificado) en un rango de temperaturas de 30 - $446\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Dentro de las señales de absorbancia más representativas de la Figura 3.3 se encuentra la banda de estiramiento presentada en 2920 cm^{-1} aproximadamente, picos mostrados entre 1550 y 1600 cm^{-1} los cuales ya se discutieron anteriormente y corresponden al grupo C-H y al grupo amino NH_2 respectivamente. Por último la señal en 900 cm^{-1} indica el enlace entre el silicio y el oxígeno (Si-O) de la muestra observada.

3.1.2 Microscopía de transmisión por electrones (TEM)

Las imágenes proporcionadas por microscopía electrónica de transmisión dan otra evidencia de la modificación superficial de las nanopartículas de TiO_2 con el agente de acoplamiento APTES. Se observa el tamaño y la morfología que presenta el TiO_2 antes y después de dicha modificación.

La Figura 3.4(a) muestra al TiO_2 sin agente de acoplamiento, es decir, solo el TiO_2 . Estas nanopartículas no cuentan con una superficie uniforme y se aprecia cómo las mismas tienden a aglomerarse, formando agregados. Esto es debido a la relación superficie/tamaño de la partícula que ocasiona fuertes aglomerados, esto limita la estabilidad en suspensión. Otra razón es atribuida a las fuerzas de Van der Waals, el efecto atrayente tiende a disminuir la dispersión de las nanopartículas antes mencionadas (Carvajal, 2010).

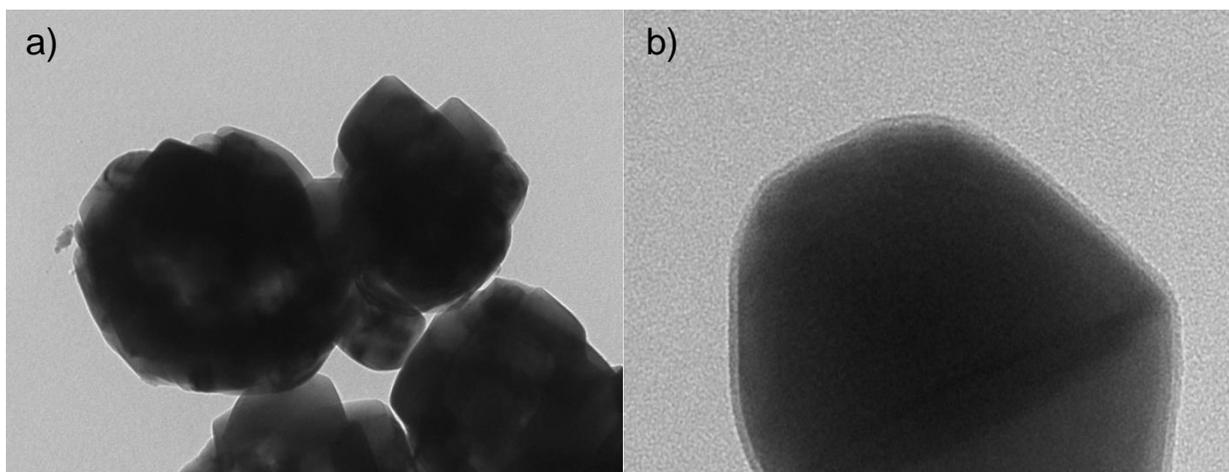


Figura 3.4 Micrografías TEM a) TiO_2 , b) TiO_2 silanizado (modificado).

Mientras que en la Figura 3.4(b) se observa la micrografía después de llevarse a cabo el proceso de silanización, es posible observar un recubrimiento orgánico debido al organosilano presente sobre la superficie del TiO_2 , este se encuentra en un promedio de 2.82 nm de espesor aproximadamente, lo que confirma la presencia de los grupos aminos del agente de acoplamiento APTES en la superficie del TiO_2 .

3.1.3 Potencial Z

El comportamiento de la dispersión de partículas se puede identificar mediante la carga superficial. Al llevar a cabo la medición el punto en donde la densidad de carga superficial es igual a cero se conoce como punto de carga cero (PZC), en cambio cuando el punto del potencial zeta es igual con cero se define como punto isoeléctrico (IEP), es necesario especificar el tipo de absorción de iones que tiene lugar en la superficie, de lo contrario los dos puntos mencionados anteriormente se consideran iguales.

Se ha reportado que existen diversos parámetros que afectan la dispersión de las partículas como lo es el área superficial, el tamaño de la partícula, la fase del TiO_2 en cuestión, la fuerza iónica y el pH. La literatura indica que al disminuir el pH de la solución el área superficial de la partícula incrementa y de este modo se disminuye la formación de agregados o aglomerados dentro de la solución, mejorando así la estabilidad de la misma como ha sido descrito por López-Zamora, *et al.*, (2018), Martínez, (2017) y Zhao *et al.*, (2012). La Figura 3.5 muestra los perfiles de potencial Z en función del pH del TiO_2 puro (sin modificar) y el TiO_2 silanizado (modificado).

Como se puede apreciar, después de la modificación de la superficie de las nanopartículas, el potencial zeta de las NPs de TiO_2 silanizadas aumentó considerablemente, esto es a causa de los grupos amino (NH_2) que aparecieron en la capa externa de la superficie de las NPs. El incremento de la carga positiva generada por la protonación de los grupos amino generó un aumento de potencial zeta positivo en la región ácida como lo reporta Zhao *et al.*, (2012), esto incrementa la repulsión entre las NPs, así mismo este incremento de potencial Z es favorable

porque aleja de la inestabilidad (IEP) de las NPs y con ello la aglomeración, como lo reporta López-Zamora, *et al.*, (2018) y Martínez, (2017). El valor de IEP para el TiO_2 sin modificar se da aproximadamente a 3.5 en valor de pH el cual es menor al del titanio modificado pues este es de 5.6 en valor de pH, este desplazamiento del IEP es atribuido a las características alcalinas de los grupos NH_2 descrito por Zhao *et al.*, (2012), o a la fácil desorción de protones de hidrógeno (H^+) los cuales se encuentran en la superficie de las nanopartículas de TiO_2 silanizado.

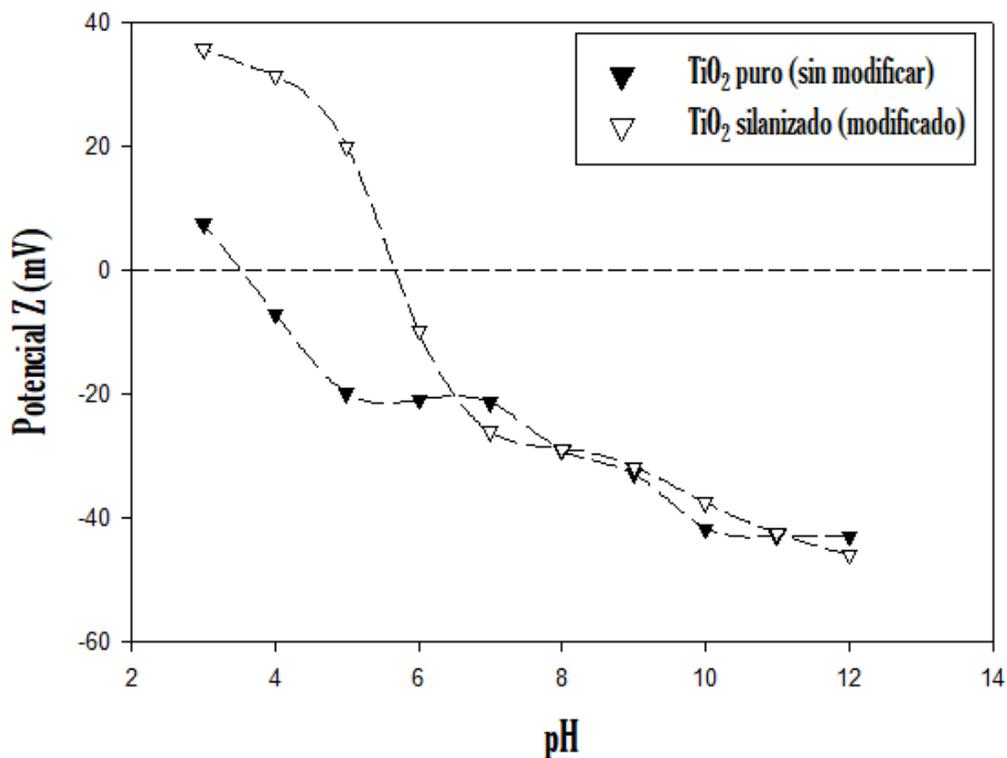


Figura 3.5 Potencial Z de las nanopartículas de TiO_2 y de TiO_2 modificado.

Todo lo mencionado anteriormente indica que el comportamiento superficial de las NPs de TiO_2 cambio de forma muy marcada. Los valores de potencial Z de -30 a 30 mV indican inestabilidad en el sistema, valores por debajo de -30 y arriba de 30 mV, indican aumento en la estabilidad, siendo ésta, cada vez mayor conforme aumenta (de forma absoluta) el valor del potencial Z tal como lo describe López-Zamora, *et al.*, (2018) y Martínez, (2017).

3.1.4 Resonancia magnética nuclear (RMN)

La Figura 3.6 y 3.7 muestra la caracterización del espectro de RMN para ^{13}C y para ^{29}Si , respetivamente. Como se puede observar en la Figura 3.6 existen 3 picos en el espectro que corresponden a las señales 12.40, 27.84 y 45.76 ppm, están identificadas en la Figura como C_1 , C_2 y C_3 , estas señales hacen referencia a los tres carbonos del grupo propilo (grupo que se encuentra presente en el agente de acoplamiento APTES), estas señales se encuentran aproximadamente iguales lo que indica que los carbonos se encuentran en la misma cantidad en la superficie del TiO_2 . Como ya se mencionó, las señales pertenecen a carbonos, sin embargo, la diferencia entre cada uno es referente al tipo de grupo al que se encuentra enlazado, es decir, si se toma en cuenta la estructura del APTES (3-aminopropiltrióxido de silano), el carbono 1 es el que se encuentra enlazado al Silicio, el carbono 2 se encuentra enlazado a otros dos carbonos, y el carbono 3 sería el que se enlaza con el grupo amino (NH_2).

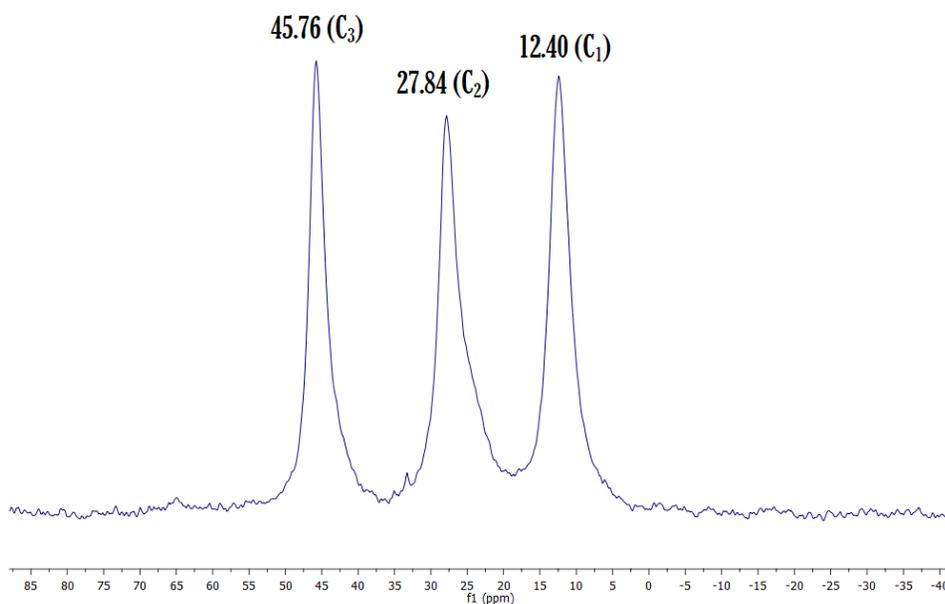


Figura 3.6 Espectro de RMN para ^{13}C

En la Figura 3.7, el espectro de RMN para ^{29}Si denota señales en -67.43 y en -59.45 ppm aproximadamente, identificadas como T_3 y T_2 respectivamente, estas son

atribuidas al silicio que se encuentra en la superficie de TiO_2 . Que como se explicó anteriormente (para el caso de los carbonos) el silicio denotado como T_3 hace referencia al enlace que presenta, este se encuentra enlazado a los 3 oxígenos propios del APTES que a su vez están enlazados a la superficie del TiO_2 ; mientras que el silicio T_2 , se enlaza solo con dos oxígenos en la superficie del TiO_2 y mientras que uno se mantuvo como un grupo hidroxilo (OH) enlazado al silicio.

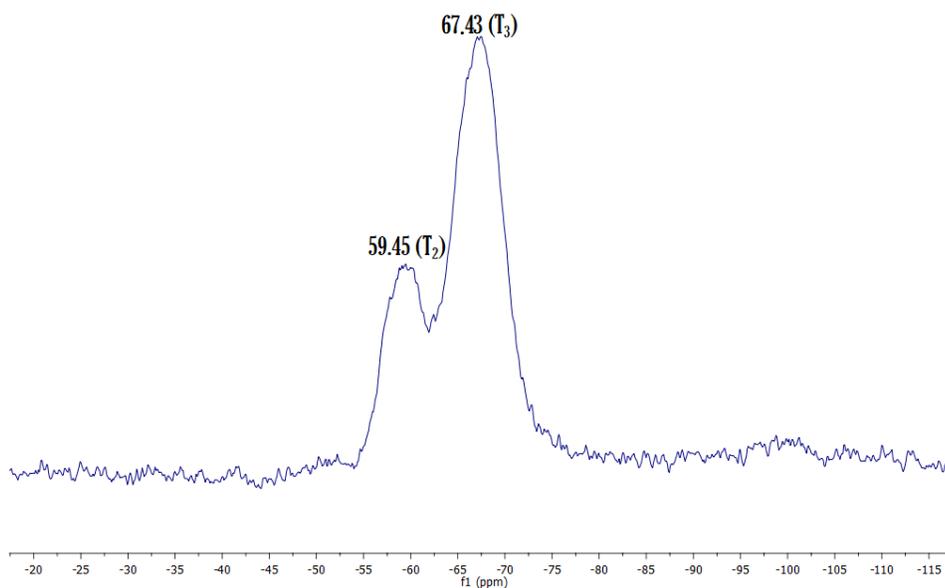


Figura 3.7 Espectro de RMN para ^{29}Si

3.1.5 Análisis termogravimétrico (TGA)

Al analizar la degradación térmica del agente de acoplamiento APTES en la superficie del TiO_2 , Figura 3.8, se puede distinguir que la estabilidad térmica que presenta asegura la resistencia del material a temperaturas altas, como lo son las temperaturas que se utilizan en procesos industriales de polímeros por ejemplo, aproximadamente a $98.5\text{ }^\circ\text{C}$ solo se pierde un 0.15% en peso de material, a $563\text{ }^\circ\text{C}$ se pierde un total de 0.38% y finalmente es hasta los $734\text{ }^\circ\text{C}$ donde se pierde un total de 0.56% de material en peso, esto resulta muy poco pues se conserva poco más del 99.4 % del total, la pérdida en peso es relacionada con la descomposición de las cadenas orgánicas del recubrimiento con el APTES.

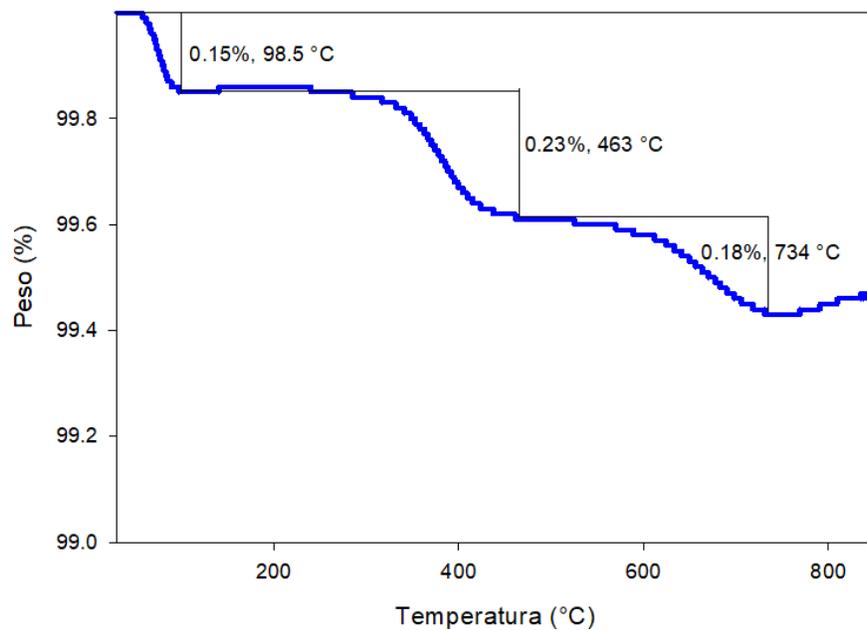


Figura 3.8 Análisis termogravimétrico de nanopartículas de TiO_2 modificado

3.2 Deposición de nanopartículas de Ag en nanopartículas de TiO_2 modificado

La Figura 3.9 muestra las diferentes unidades experimentales del diseño de experimentos de forma física como resultado de la deposición de las NPs de Ag en la superficie de TiO_2 silanizado, cabe destacar que la diferencia en tonalidades de color es debido principalmente al pH y la concentración, lo que atribuye a que si existe diferencia entre cada uno de los sistemas.



Figura 3.9 Unidades experimentales de la deposición de Ag en TiO_2 silanizado.

3.3 Evaluación de las pruebas de susceptibilidad

Las pruebas de susceptibilidad fueron aplicadas a bacterias y hongos por el método modificado de Kirby-Bauer que consistió en la zona o halos de inhibición (en mm) presentes en el disco, de cada una de las unidades experimentales propias del diseño central compuesto. Se describen en las siguientes secciones para cada microorganismo.

3.3.1 Evaluación de *Staphylococcus aureus*

A continuación se presentan los resultados de la prueba de disco del método de Kirby-Bauer modificado, la zona de inhibición, es decir, la longitud de los halos de *S. aureus* (mm) obtenidos por el diseño CDC establecido se muestran en la Tabla 3.1. El tamaño de los halos se encuentran en un rango de 7.3283 a 11.2608 mm.

Tabla 3.1 Resultados de la variable de respuesta para *S. aureus*.

N°	VARIABLE CODIFICADA			VARIABLE NATURAL			RESPUESTA
	X_1	X_2 (% p/p)	X_3 (g/250 mL)	X_1	X_2 (% p/p)	X_3 (g/250 mL)	Halo de <i>S. aureus</i> (mm)
1	-1	-1	-1	8.00	4.00	3.00	8.56
2	1	-1	-1	12.00	4.00	3.00	8.27
3	-1	1	-1	8.00	10.00	3.00	8.25
4	1	1	-1	12.00	10.00	3.00	9.37
5	-1	-1	1	8.00	4.00	7.00	8.42
6	1	-1	1	12.00	4.00	7.00	7.32
7	-1	1	1	8.00	10.00	7.00	9.56
8	1	1	1	12.00	10.00	7.00	10.10
9	-1.68179	0	0	6.64	7.00	5.00	7.88
10	1.68179	0	0	13.36	7.00	5.00	7.75
11	0	-1.68179	0	10.00	1.95	5.00	9.86
12	0	1.68179	0	10.00	12.05	5.00	11.17
13	0	0	-1.68179	10.00	7.00	1.64	8.96
14	0	0	1.68179	10.00	7.00	8.36	8.63
15	0	0	0	10.00	7.00	5.00	10.50
16	0	0	0	10.00	7.00	5.00	9.58
17	0	0	0	10.00	7.00	5.00	9.15
18	0	0	0	10.00	7.00	5.00	10.88
19	0	0	0	10.00	7.00	5.00	11.26
20	0	0	0	10.00	7.00	5.00	10.62

La aplicación del MSR generó el polinomio de regresión de segundo orden (Ec. 3.1), que representa una relación empírica entre la respuesta (longitud de los halos de inhibición con *Staphylococcus aureus*) y las variables evaluadas

$$y = -13.45 + 4.468x_1 - 0.818x_2 + 1.472x_3 - 0.2347x_1^2 + 0.0018x_2^2 - 0.1479x_3^2 + 0.0636x_1x_2 - 0.0434x_1x_3 + 0.0650x_2x_3 \quad (3.1)$$

En donde: x_1 = pH, x_2 = Concentración de AgNO_3 , x_3 = Sólidos totales NPs de TiO_2 y y = Longitud de halo de inhibición de *S. aureus*.

La significancia estadística de cada uno de los coeficientes fue evaluada por la prueba t Student's y el valor p, el cual se generó a partir del Análisis de Varianza (ANOVA) (Anexo B1), de igual manera se muestra el Diagrama de Pareto y la Gráfica de probabilidad normal de los residuos (Anexo B2). El Anexo B1 muestra las variables y las interacciones que tienen mayor incidencia sobre el proceso de dopaje en la inhibición de *Staphylococcus aureus*. Se seleccionó la variable significativa tomando como referencia el valor de probabilidad p, que identifica el área bajo la curva, cuando este valor es menor de 0.05 indica que el efecto es significativo con un 95% de confianza. Por lo tanto, el efecto significativo corresponde a la concentración de AgNO_3 , en tanto que los sólidos de TiO_2 en solución y pH, no son significativas en el proceso, siendo esta última considerada como la menos influyente. El modelo muestra buen ajuste con los datos experimentales, teniendo un coeficiente de determinación (R^2) de 0.86, implicando que el 86.00% de los datos de las variables se ajustan al modelo y que solo el 14% de la variación total no es explicada por el mismo.

El análisis de la superficie de respuesta, Figura 3.10, muestra el comportamiento de las diferentes combinaciones de efectos sobre la longitud de los halos de inhibición de *S. aureus*, donde el mayor tamaño de los halos se da a niveles intermedios, 10 para el caso del pH y 5 g de sólidos de TiO_2 en solución, mientras que para la concentración de AgNO_3 se requieren niveles altos (10% p/p).

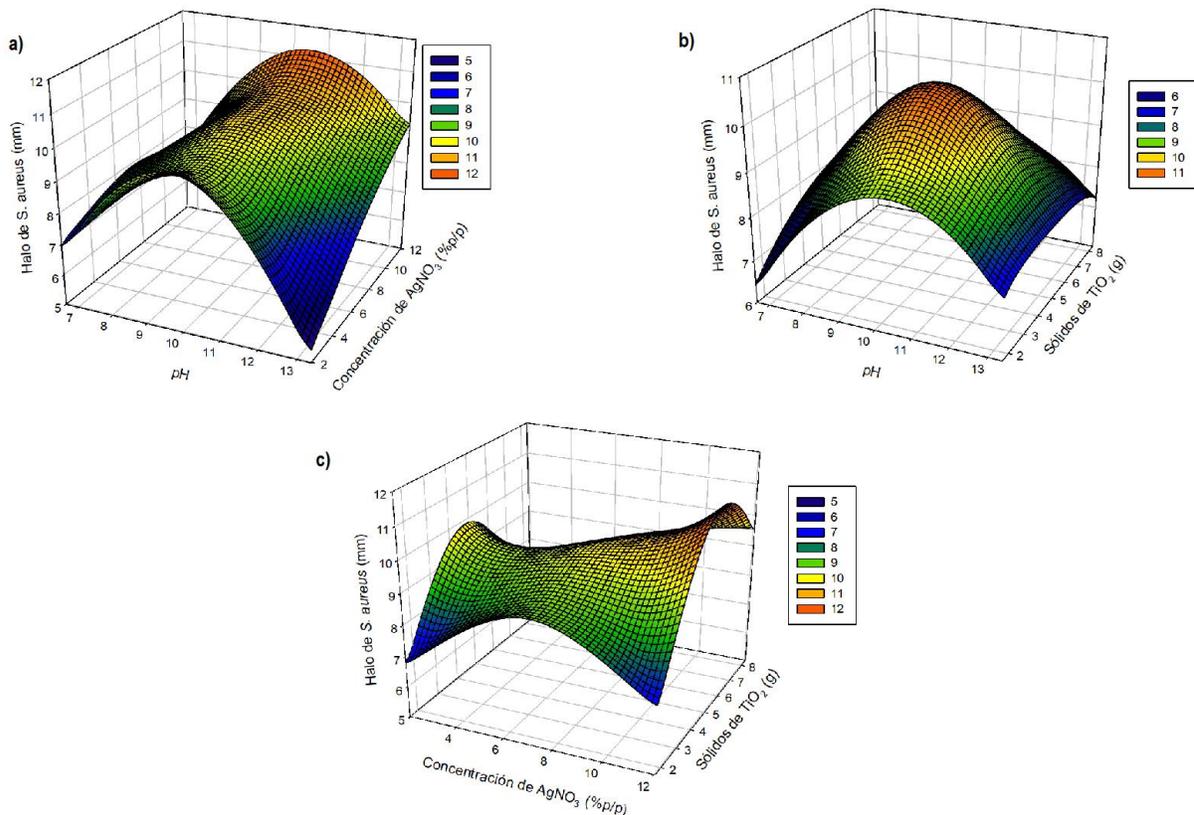


Figura 3.10 Superficies de respuesta de la evaluación de *S. aureus*, a) pH vs Concentración de AgNO_3 (%p/p), b) pH vs sólidos de TiO_2 (g), c) Concentración de AgNO_3 (%p/p) vs Sólidos de TiO_2 (g).

A partir de la gráfica de contornos, Figura 3.11, se determinaron los rangos más adecuados de trabajo, siendo para el pH de 9 a 11, utilizando una cantidad de TiO_2 entre 4 y 6 g, en tanto que el rango de la concentración de AgNO_3 abarca una región por encima de 11% p/p.

Se realizó el análisis canónico (descrito en la Sección 2.8) para determinar los puntos estacionarios de la evaluación de la susceptibilidad de *S. aureus*, los cuales fueron generados a partir del modelo/polinomio de segundo grado obtenido (Ecuación 3.1), obteniéndose valores de: 9.1 de pH, 12.05 % p/p de concentración de AgNO_3 y 3.6 g de TiO_2 en solución. La respuesta predicha a partir de los puntos estacionarios, fue de 9.73 mm de la longitud del halo que se obtendría al trabajar con *S. aureus*. La ecuación 3.2 representa la forma canónica del modelo y dado que los eigenvalores

tienen signos alternos ($\lambda_1 = -0.2459$, $\lambda_2 = -0.1464$, $\lambda_3 = 0.0115$) representa un punto de silla.

$$\hat{y} = 9.7357 - 0.2459w_1^2 - 0.1464w_2^2 + 0.0115w_3^2 \quad (3.2)$$

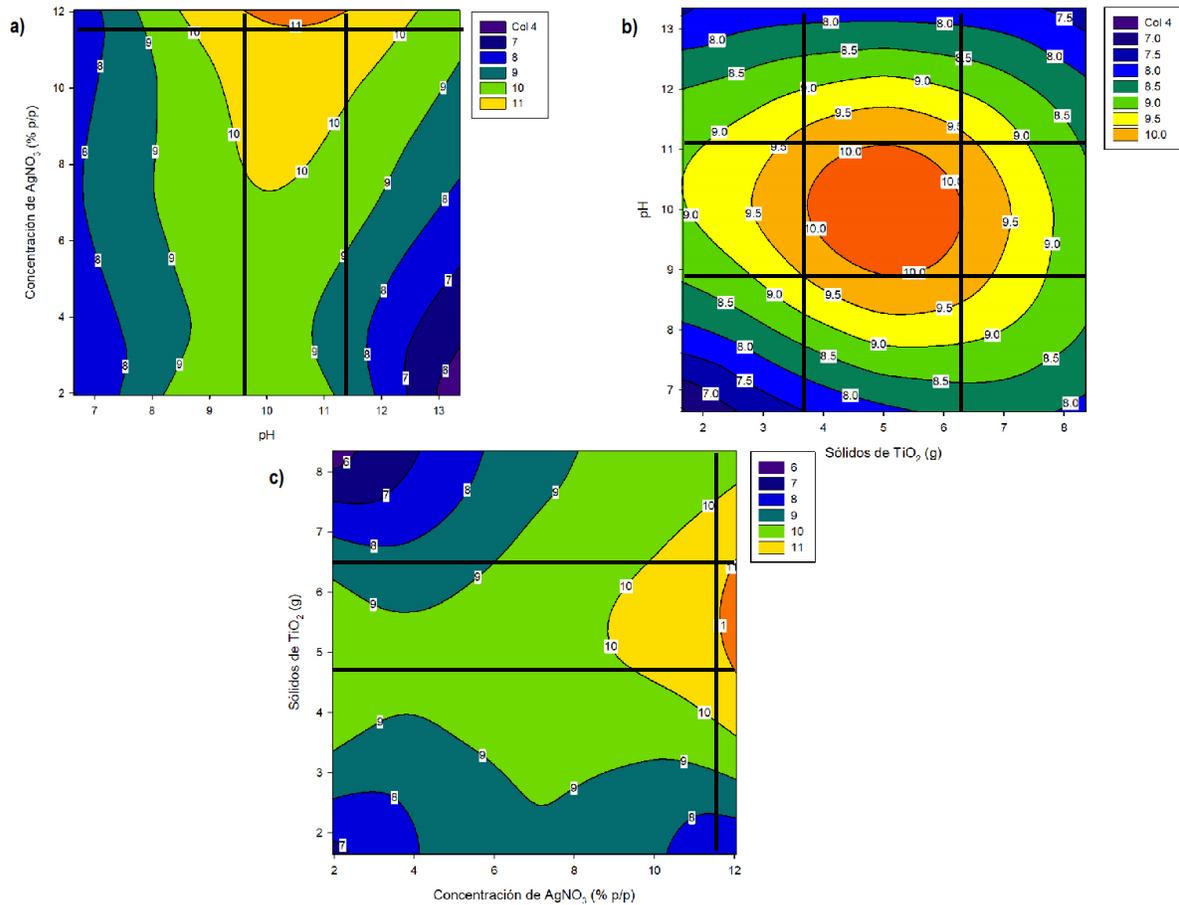


Figura 3.11 Gráficas de contorno de la evaluación de *S. aureus*, a) pH vs Concentración de AgNO₃ (%p/p), b) Sólidos de TiO₂ (g) vs pH, c) Concentración de AgNO₃ (%p/p) vs Sólidos de TiO₂ (g).

A partir de los resultados obtenidos, se estableció un segundo diseño experimental CDC equirradial con dos factores (Diseño 2), considerando como variables independientes: Concentración de AgNO₃ con respecto al TiO₂ (X_1) (25, 35 y 45 % p/p) y la cantidad de NPs de TiO₂ en solución (X_2) (3, 5 y 7 g/250mL), siendo el pH constante en 10, siendo la variable de respuesta la longitud del halo o zona de inhibición de los discos sobre la placa (diámetro de halos en mm). Como se describió anteriormente, la concentración es la variable significativa, por lo tanto se

consideraron diferentes rangos (valores más altos). La Tabla 3.2 muestra los resultados obtenidos del Diseño 2 de la prueba de disco. Donde el rango del halo de *S. aureus* de este segundo diseño planteado, se encuentra entre 13.1632 y 22.0919 mm, que, en comparación con el primer diseño experimental (7.3283 a 11.2608 mm), tiene un aumento de 96.18%, lo que indica que existe un incremento de casi el doble de la longitud el halo obtenido como resultado del Diseño 2.

Tabla 3.2 Resultados de la variable de respuesta para *S. aureus* del diseño experimental de dos factores.

N°	VARIABLE CODIFICADA		VARIABLE NATURAL		RESPUESTA
	X_1 (% p/p)	X_2 (g/250mL)	X_1 (% p/p)	X_2 (g/250mL)	Halo de <i>S. aureus</i> (mm)
1	-1.00000	-1.00000	25.0000	3.00000	13.16
2	1.00000	-1.00000	45.0000	3.00000	19.59
3	-1.00000	1.00000	25.0000	7.00000	20.40
4	1.00000	1.00000	45.0000	7.00000	16.80
5	-1.41421	0.00000	20.8579	5.00000	13.98
6	1.41421	0.00000	49.1421	5.00000	22.09
7	0.00000	-1.41421	35.0000	2.17157	18.34
8	0.00000	1.41421	35.0000	7.82843	16.50
9	0.00000	0.00000	35.0000	5.00000	15.26
10	0.00000	0.00000	35.0000	5.00000	14.93
11	0.00000	0.00000	35.0000	5.00000	14.29
12	0.00000	0.00000	35.0000	5.00000	14.13
13	0.00000	0.00000	35.0000	5.00000	14.17

El análisis estadístico de los resultados mediante la prueba t Student's y el cálculo del valor p generado del Análisis de Varianza (ANOVA) (Anexo B3) y corroborados gráficamente por medio del Diagrama de Pareto y la Gráfica de probabilidad normal de los residuos (Anexo B4), proveen los coeficientes estimados para el modelo cuadrático que se obtuvo. Como resultado del Diseño 2, el valor de p muestra que la variable x_2 (sólidos de TiO_2 en solución) continúa siendo una variable no significativa, así mismo la variable x_1 (concentración de AgNO_3) es la variable significativa en el proceso de dopaje, debido a que el valor de p se encuentra en un valor por debajo de 0.05.

Mediante el MSR se representó la función de la respuesta (longitud de los halos de inhibición con *Staphylococcus aureus*) mediante una ecuación polinomial de segundo grado (Ec. 3.3) donde se encuentran implícitas las dos variables independientes consideradas. El modelo cuadrático muestra un ajuste de datos experimentales aceptable, con un coeficiente de determinación (R^2) de 0.82, lo que implica que el 82.00% de los datos experimentales se ajustan al modelo, por lo tanto, el 18% de la variación total no es explicada.

$$y = 14.9 - 0.370x_1 + 1.07x_2 + 0.01678x_1^2 + 0.343x_2^2 - 0.1253x_1x_2 \quad (3.3)$$

En donde: x_1 = Concentración de AgNO_3 , x_2 = Sólidos totales de TiO_2 y y = Longitud de halo de inhibición de *S. aureus*.

De la gráfica de superficie de respuesta (Figura 3.12), se observó que la maximización del proceso de dopaje en la inhibición de *S. aureus* se da a baja concentración de AgNO_3 (20 -25% p/p) con cantidades altas de sólidos de TiO_2 (7-8 g), observándose los niveles más altos de inhibición (26-28 mm), lo que resalta la importancia de la adición de sólidos de TiO_2 . En el análisis estadístico, la interacción X_1X_2 resultó significativa, esto se observa en la curvatura que manifiesta la gráfica de superficie. La significancia de esta interacción indica que dentro del dominio experimental se observaron efectos de interacción sinérgica comúnmente atribuidos a la dispersión de las partículas de TiO_2 cuando se encuentran dispersas en medio acuoso en el proceso de dopaje con Ag. Por medio de la gráfica de contornos (Figura 10), se determinaron los rangos más adecuados de trabajo, teniendo para la concentración de AgNO_3 un valor dado entre 21 y 24 % p/p, en conjunto con una cantidad de TiO_2 entre 7.5 y 7.8 g.

A partir del modelo de segundo orden (Ec. 3.3), se determinó el modelo canónico (Ec. 3.4), cuyos valores característicos al tener signos alternos ($\lambda_1= 0.0052$, $\lambda_2= 0.3546$), determinan que los resultados presentan un comportamiento de punto de un mínimo, sin embargo lo que se busca con el presente trabajo es maximizar el proceso, es decir, maximizar la zona de inhibición del microorganismo.

$$\hat{y} = 12.6381 + 0.0052w_1^2 + 0.3546w_2^2 \quad (3.4)$$

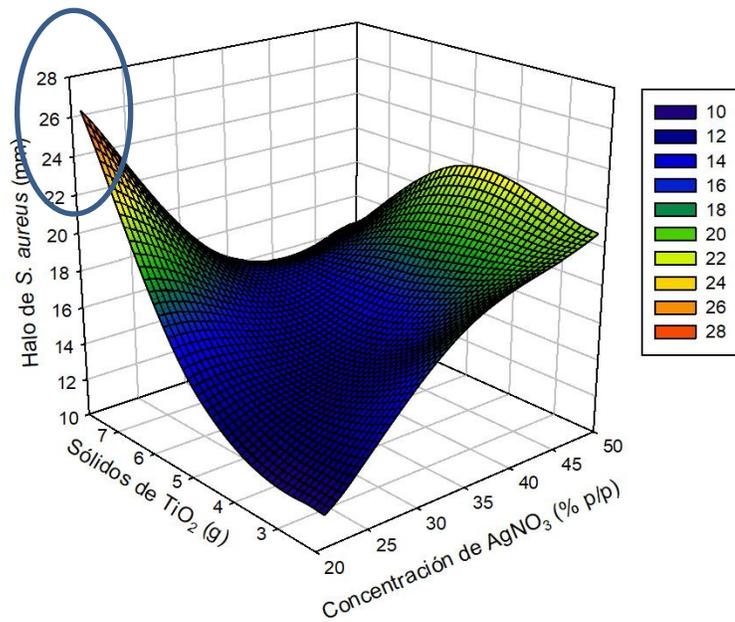


Figura 3.12 Superficie de respuesta de la evaluación de *S. aureus*, Concentración de AgNO_3 (%p/p) vs Sólidos de TiO_2 (g).

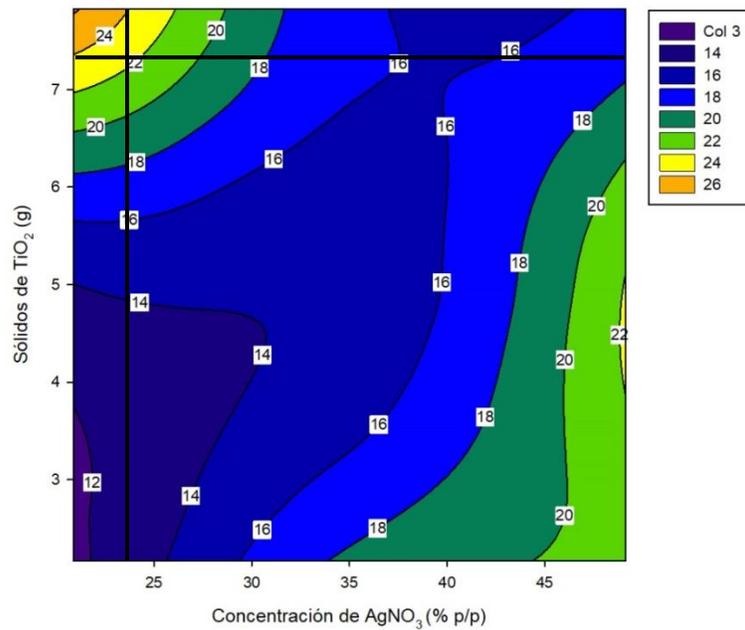


Figura 3.13 Gráfica de contorno de la evaluación de *S. aureus*, Concentración de AgNO_3 (%p/p) vs Sólidos de TiO_2 (g).

De la implementación del segundo diseño experimental, se encontró que al trabajar con una concentración de AgNO_3 entre 20-25% p/p con cantidades de TiO_2 silanizado entre y 7-8 g y 10 en valor de pH, se logra una zona de inhibición de hasta 28 mm en *Staphylococcus aureus*. De lo mencionado anteriormente, se observó una mejora considerable de 300% más, respecto a la zona de inhibición, que lo obtenido por (Haghighat *et al.*, 2019), que probaron el comportamiento antibacteriano de una membrana compuesta por $\text{Ag/TiO}_2/\text{PVC}$ probada en la misma cepa bacteriana. Así mismo, se encontró un aumento de poco más del 200% en la inhibición del mismo microorganismo, dado que probaron nanofibras de policaprolactona modificadas con Ag y TiO_2 ($\text{PCL/TiO}_2\text{-Ag}$) mostrando un impacto antibacteriano de 9.2 mm en el diámetro de la zona de inhibición (Karagoz *et al.*, 2020). En otros trabajos, existe un aumento del 40% en la zona de inhibición que se obtuvo cuando se compara con nanopartículas de Ag/TiO_2 sin modificar, ya que mostraron una zona de inhibición máxima de 20 mm al trabajar con una cepa similar de *S. aureus* (resistente a la meticilina) (Nageswara *et al.*, 2019).

3.3.2 Evaluación de *Escherichia coli*

En la Tabla 3.3 se presentan los resultados de la prueba de disco, la respuesta viene dada en mm y hacen referencia al diámetro o zona de inhibición que presentó cada uno de los sistemas del diseño experimental CDC (planteado en la Sección 2.4) en la inhibición del microorganismo Gram-negativo *Escherichia coli*. Como se puede observar, el rango de la longitud del halo obtenido se encuentra entre 6.79156 y 8.53111 mm.

El MSR aplicado para los datos de la Tabla 3.3 generó el polinomio de regresión de segundo orden, y se encuentra expresada en la Ecuación 3.5, representa la relación empírica entre la longitud de los halos de inhibición con *Escherichia coli* y las variables independientes consideradas en el CDC.

$$y = 11.29 - 0.763x_1 - 0.019x_2 - 0.076x_3 + 0.0412x_1^2 - 0.0135x_2^2 - 0.0127x_3^2 + 0.0050x_1x_2 - 0.0017x_1x_3 + 0.0253x_2x_3 \quad (3.5)$$

En donde: x_1 = pH, x_2 = Concentración de AgNO_3 , x_3 = Sólidos totales NPs de TiO_2 y y = Longitud de halo de inhibición de *E. coli*.

Tabla 3.3 Resultados de la variable de respuesta para *E. coli*.

N°	VARIABLE CODIFICADA			VARIABLE NATURAL			RESPUESTA
	X_1	X_2 (% p/p)	X_3 (g/250 mL)	X_1	X_2 (% p/p)	X_3 (g/250 mL)	Halo de <i>E. coli</i> (mm)
1	-1	-1	-1	8.00	4.00	3.00	7.57
2	1	-1	-1	12.00	4.00	3.00	8.53
3	-1	1	-1	8.00	10.00	3.00	7.39
4	1	1	-1	12.00	10.00	3.00	7.35
5	-1	-1	1	8.00	4.00	7.00	7.47
6	1	-1	1	12.00	4.00	7.00	7.29
7	-1	1	1	8.00	10.00	7.00	6.79
8	1	1	1	12.00	10.00	7.00	7.84
9	-1.68179	0	0	6.64	7.00	5.00	7.58
10	1.68179	0	0	13.36	7.00	5.00	7.94
11	0	-1.68179	0	10.00	1.95	5.00	6.89
12	0	1.68179	0	10.00	12.05	5.00	7.00
13	0	0	-1.68179	10.00	7.00	1.64	7.07
14	0	0	1.68179	10.00	7.00	8.36	7.23
15	0	0	0	10.00	7.00	5.00	7.33
16	0	0	0	10.00	7.00	5.00	7.55
17	0	0	0	10.00	7.00	5.00	7.52
18	0	0	0	10.00	7.00	5.00	7.36
19	0	0	0	10.00	7.00	5.00	7.68
20	0	0	0	10.00	7.00	5.00	7.22

La significancia estadística de los coeficientes se evaluó por medio de la prueba t Student's y el valor p, este se generó del Análisis de Varianza (ANOVA) (Anexo C1), junto con el Diagrama de Pareto y la Gráfica de probabilidad normal de los residuos (Anexo C2). En el Anexo C1 se encuentran las variables y las interacciones que tienen mayor incidencia sobre el proceso de dopaje en la inhibición de *Escherichia coli*. Como ya se discutió anteriormente, la selección de la variable significativa se tomó como referencia del valor de probabilidad p, que, cuando este es menor de 0.05 indica que el efecto es significativo con un 95% de confianza. Sin embargo, para este caso, ninguna variable resultó significativa estadísticamente, debido a que el

valor del estadístico p se encuentra por encima de 0.05. El modelo polinomial obtenido (Ec. 3.5) muestra un ajuste de datos experimentales de solo el 53%, debido a que el coeficiente de determinación (R^2) tiene un valor de 0.53, lo que implica que el 47% de la variación total no es explicada por el modelo.

El análisis de la superficie de respuesta, Figura 3.14, muestra el comportamiento de las diferentes interacciones de efectos sobre la longitud de los halos de inhibición de *E. coli*. El mayor tamaño de los halos se da a niveles altos, superiores a 13 para el caso de pH, y a niveles bajos para las otras dos variables, 3 g de sólidos de TiO_2 en solución, mientras que para la concentración de $AgNO_3$ se requiere 4% p/p. A estas condiciones se obtendría un halo de inhibición de alrededor de 9mm.

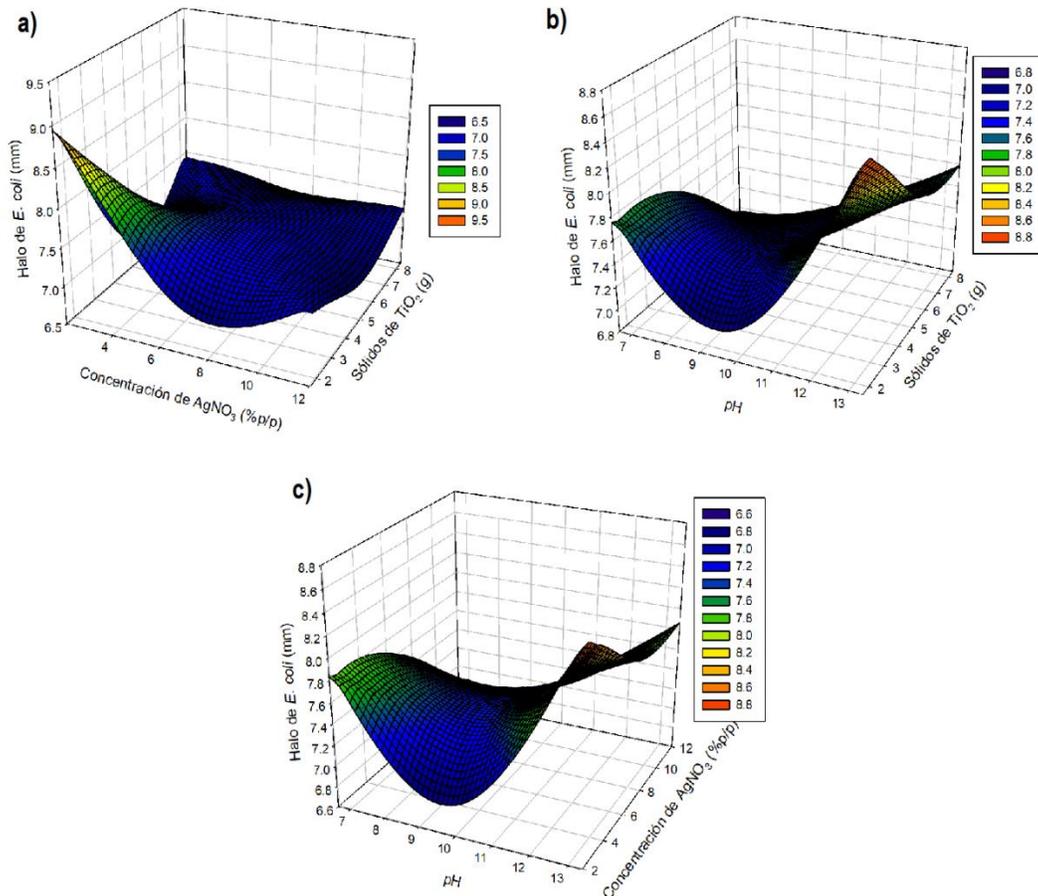


Figura 3.14 Superficies de respuesta de la evaluación de *E. coli*, a) Concentración de $AgNO_3$ (% p/p) vs Sólidos de TiO_2 (g), b) pH vs sólidos de TiO_2 (g), c) pH vs Concentración de $AgNO_3$ (% p/p).

A partir de la gráfica de contornos, Figura 3.15, se determinaron los rangos más adecuados de trabajo para este microorganismo, siendo para el pH un valor entre 12 y 13, utilizando una cantidad de TiO_2 entre 2 y 3 g, en tanto que el rango de la concentración de AgNO_3 abarca una región por debajo de 4% p/p.

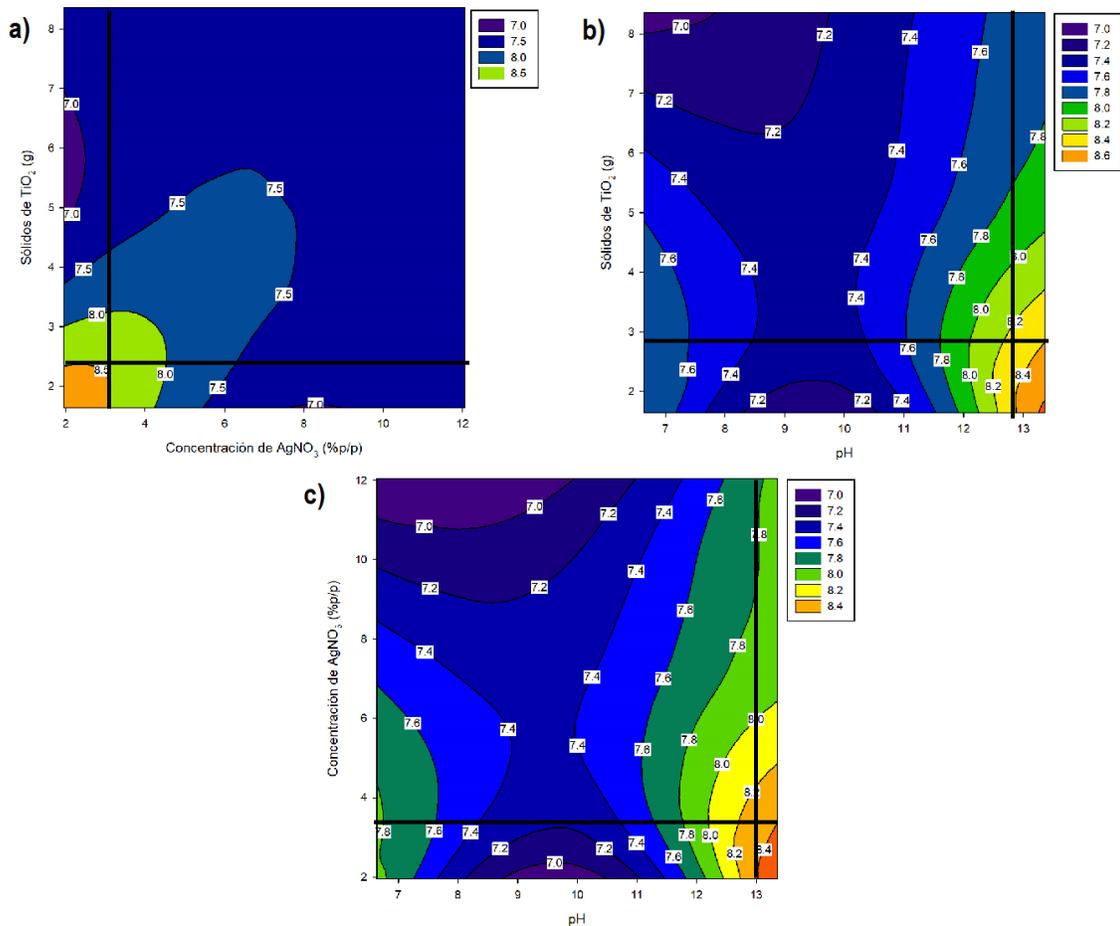


Figura 3.15 Gráficas de contorno de la evaluación de *E. coli*, a) Concentración de AgNO_3 (%p/p) vs Sólidos de TiO_2 (g), b) pH vs Sólidos de TiO_2 (g), c) pH vs Concentración de AgNO_3 (%p/p).

De manera general ninguna variable resultó significativa, esto es atribuido a que a pesar de que en todos los sistemas del diseño se encontró halo de inhibición, no hay grandes cambios en la longitud medida como respuesta al trabajar con las tres variables independientes discutidas en la Sección 2.4.

Los puntos estacionarios, obtenidos del análisis canónico, determinaron 10.5195, 33.2939%p/p y 36.8590 g, para pH, Concentración de AgNO_3 y Sólidos de TiO_2 respetivamente. La respuesta predicha a partir de los puntos estacionarios, fue de 8.9937 mm de la longitud del halo que se obtendría al trabajar con *E. coli*. La ecuación 3.6 representa la forma canónica del modelo y dado que los eigenvalores tienen signos alternos ($\lambda_1 = -0.0258$, $\lambda_2 = -0.0005$, $\lambda_3 = 0.0413$) representa un punto de silla.

$$\hat{y} = 8.9937 - 0.0258w_1^2 - 0.0005w_2^2 + 0.0413w_3^2 \quad (3.6)$$

A partir de los resultados obtenidos, se estableció un segundo diseño experimental CDC equirradial con dos factores, considerando las mismas variables y niveles de los factores de Diseño 2 para *S. aureus*. La Tabla 3.4 muestra los resultados obtenidos del Diseño 2 de la prueba de disco del microorganismo Gram-negativo. En el cual, el rango del halo de *E. coli* de este segundo diseño planteado, se encuentra entre 6.6930 y 10.9737 mm, que, en comparación con el primer CDC para este microorganismo (6.7915 - 8.5311 mm), existe un incremento del 28.63% de la longitud del mayor halo obtenido en la inhibición del Diseño 2.

Tabla 3.4 Resultados de la variable de respuesta para *E. coli* del diseño experimental de dos factores.

N°	VARIABLE CODIFICADA		VARIABLE NATURAL		RESPUESTA
	X_1 (% p/p)	X_2 (g/250mL)	X_1 (% p/p)	X_2 (g/250mL)	Halo de <i>E. coli</i> (mm)
1	-1.00000	-1.00000	25.0000	3.00000	10.72
2	1.00000	-1.00000	45.0000	3.00000	9.34
3	-1.00000	1.00000	25.0000	7.00000	8.85
4	1.00000	1.00000	45.0000	7.00000	6.82
5	-1.41421	0.00000	20.8579	5.00000	6.69
6	1.41421	0.00000	49.1421	5.00000	10.11
7	0.00000	-1.41421	35.0000	2.17157	9.48
8	0.00000	1.41421	35.0000	7.82843	9.95
9	0.00000	0.00000	35.0000	5.00000	9.99
10	0.00000	0.00000	35.0000	5.00000	8.69
11	0.00000	0.00000	35.0000	5.00000	9.20
12	0.00000	0.00000	35.0000	5.00000	9.30
13	0.00000	0.00000	35.0000	5.00000	10.97

El análisis estadístico mediante la prueba t Student's y el cálculo del valor p generado del Análisis de Varianza (ANOVA) (mostrado en el Anexo C3) y corroborados gráficamente por medio del Diagrama de Pareto y la Gráfica de probabilidad normal de los residuos (Anexo C4), estimaron los coeficientes para el modelo cuadrático polinomial. Como resultado, ninguna variable se consideró estadísticamente significativa, debido a que el valor del estadístico p es superior de 0.05 para todos los factores, esto se corrobora en los anexos antes mencionados.

Por medio del MSR se obtuvo la función de la respuesta (longitud de los halos de inhibición en *Escherichia coli*) denotada por una ecuación cuadrática de segundo grado (Ec. 3.7) que considera implícitamente las variables consideradas. El modelo cuadrático exhibe un coeficiente de determinación (R^2) de 0.25, lo que implica que no es un modelo aceptable para la predicción de la longitud de la zona de inhibición.

$$y = 0.9 + 0.511x_1 + 0.03x_2 - 0.00645x_1^2 + 0.003x_2^2 - 0.0083x_1x_2 \quad (3.7)$$

En donde: x_1 = Concentración de AgNO_3 , x_2 = Sólidos totales de TiO_2 y y = Longitud de halo de inhibición de *E. coli*.

La gráfica de superficie de respuesta (mostrada en la Figura 3.16), se observó que la mayor longitud de halo de inhibición en *E. coli* se obtuvo a una concentración de AgNO_3 de 25% p/p con una cantidad de 3 g de TiO_2 en solución, a estas condiciones se obtiene una inhibición máxima de hasta 14 mm.

La Figura 3.17 muestra la gráfica de contornos, de esta misma se determinaron los rangos más adecuados para trabajar este microorganismo, es recomendable trabajar con una concentración de AgNO_3 en un rango entre 20-25 % p/p aproximadamente en conjunto con una cantidad de TiO_2 entre 3 y 4 g.

Del modelo cuadrático de segundo orden mostrado en la Ec. 3.7, se determinó el modelo canónico (Ec. 3.8), cuyos valores característicos al tener signos alternos ($\lambda_1 = -0.0069$, $\lambda_2 = 0.0305$), determinan que los resultados presentan un comportamiento de un punto de silla.

$$\hat{y} = 10.3379 - 0.0069w_1^2 + 0.0305w_2^2 \quad (3.8)$$

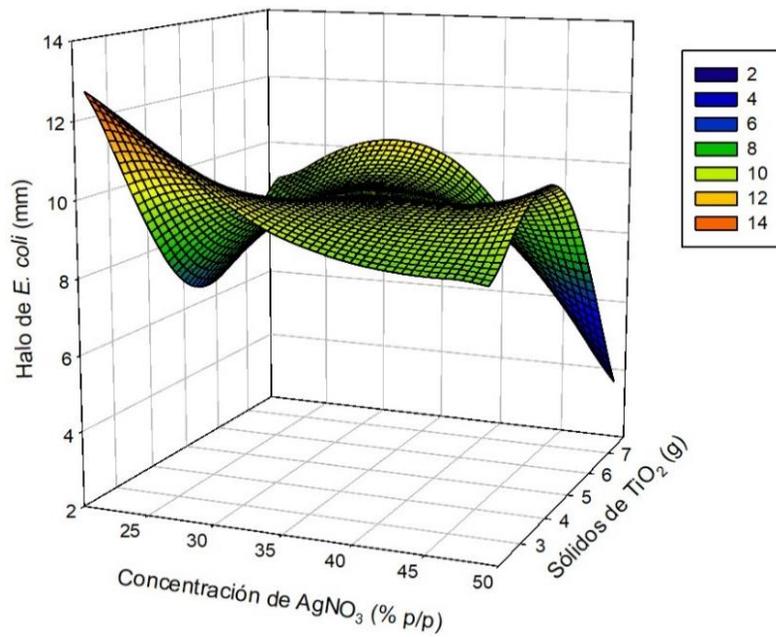


Figura 3.16 Superficie de respuesta de la evaluación de *E. coli*, Concentración de AgNO₃ (%p/p) vs Sólidos de TiO₂ (g).

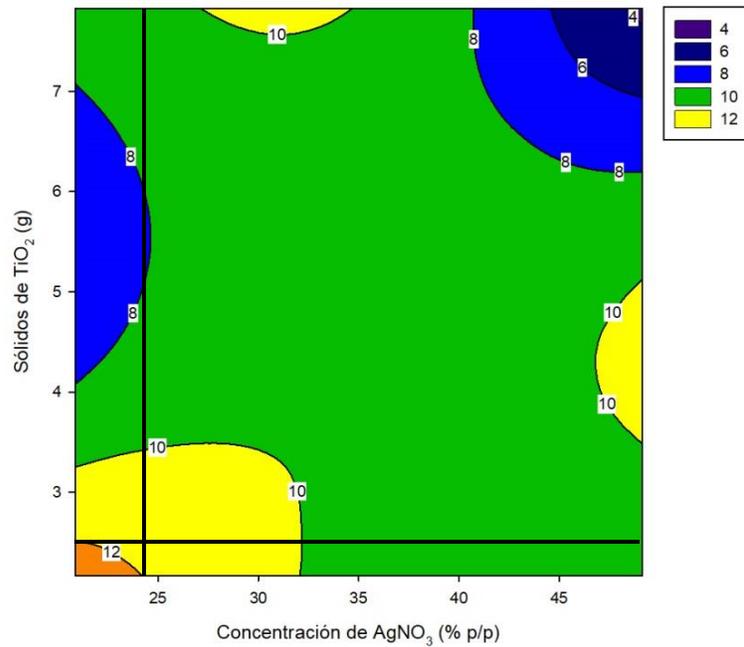


Figura 3.17 Gráfica de contorno de la evaluación de *E. coli*, Concentración de AgNO₃ (%p/p) vs Sólidos de TiO₂ (g).

Por medio de la implementación del Diseño 2 en *Escherichia coli* se determinó que trabajar a una concentración de AgNO_3 20% p/p con cantidades de TiO_2 silanizado de 3 g y 10 en valor de pH, se logra una zona de inhibición de hasta 14 mm en *Escherichia coli*. De lo anterior mencionado se encontró un aumento de cerca del 200% en la inhibición de la misma cepa bacteriana, dado que en nanofibras de policaprolactona modificadas con Ag y TiO_2 (PCL/ TiO_2 -Ag) se mostró un impacto de 7.6 mm en el diámetro de la zona de inhibición (Karagoz *et al.*, 2020). En comparación con otros trabajos relacionados, se obtuvieron resultados semejantes respecto a la zona de inhibición. Evaluaron la actividad antibacteriana de Ag-NPs sintetizadas a diferentes concentraciones, encontrando que, a 100 mg/L presentaron una longitud de halo de 14.5 mm en la misma cepa bacteriana (Hassanien y Khatoon, 2019). Así mismo, (Dhanalekshmi y Meena, 2014) prepararon nanopartículas de Ag- TiO_2 mediante reducción simultánea de AgNO_3 junto con hidrólisis de isopropóxido de Ti (IV), al trabajar con *E. coli* encontraron una zona de inhibición de aproximadamente 14 mm a una concentración de 600 $\mu\text{g/mL}$. De la misma manera, (Alimunnisa *et al.*, 2017) trabajaron un material parecido Ag- SiO_2 sintetizado por el método de Stober, encontraron una zona de inhibición máxima para el mismo microorganismo de 16 mm a una concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Por otro lado, (Ali *et al.*, 2018) sintetizaron nanopartículas de TiO_2 dopado con Ag por método sol-gel, encontraron una zona de inhibición de 26.4mm a una concentración molar de 8%. El trabajo de (Nageswara *et al.*, 2019) encontró que trabajar nanopartículas de Ag/ TiO_2 sin modificar, utilizando extracto acuoso de *Acacia nilotica* como bio-reductor, se logra una zona de inhibición máxima en *E. coli* de 24 mm. Por otro lado, existe incremento en un 200% de la zona de inhibición que lo reportado por (Haghighat *et al.*, 2019), quienes probaron el comportamiento antibacteriano de una membrana compuesta por Ag/ TiO_2 /PVC probada en la misma cepa bacteriana, reportando una longitud aproximada de 7 mm. Esto comprueba que las condiciones establecidas en el segundo diseño experimental implementado mejoraron la capacidad antibacteriana.

3.3.3 Evaluación de *Candida albicans* y *Aspergillus niger* mediante pruebas de susceptibilidad

La prueba de susceptibilidad en disco, descrita en la Sección 2.7, fue aplicada a los hongos *Candida albicans* y *Aspergillus niger* de la misma manera, sin embargo, en éstos microorganismos no se encontró inhibición con ninguno de los sistemas del diseño experimental implementado, dada la situación anterior, se analizaron los diversos factores que pudieron afectar.

Se evaluó la influencia del agar (caducidad, estado físico, almacenamiento, entre otras cosas) por lo tanto se cambió de Agar Saboraud a Agar Dextrosa y papa, sin embargo no se encontró inhibición de los hongos mencionados. También, se evaluaron diferentes concentraciones con las que se prepararon las nanopartículas de TiO₂-Ag que se impregnaron en los discos de papel filtro (descrita en la Sección 2.7.2), considerando concentraciones a 50, 100, y 500 ppm en la preparación de las soluciones con las nanopartículas, sin embargo tampoco fue posible encontrar inhibición de los dos diferentes hongos.

Por lo anteriormente descrito, se decidió probar la técnica HT-SPOTi descrita en la Sección 2.8. Esto se realizó para justificar que los hongos, como las bacterias seleccionadas, se logran inhibir con las nanopartículas de TiO₂ dopado con Ag, dado que con las condiciones establecidas en el diseño experimental no se obtuvieron los resultados que se esperaban.

El pozo que contuvo la concentración más baja de nanopartículas de TiO₂ dopadas con Ag en el que no se observó crecimiento de hongo dentro del periodo de incubación indicó el MIC, es decir, la concentración mínima inhibitoria. Para *Aspergillus niger* el MIC fue de 500 ppm, en tanto que para *Candida albicans* 3500 ppm fue la concentración mínima inhibitoria de las nanopartículas de TiO₂-Ag, claramente el hongo más resistente fue *Candida albicans*. Las placas se observan en la Figura 3.18 y en la Figura 3.19 para *Aspergillus niger* y *Candida albicans* respectivamente.

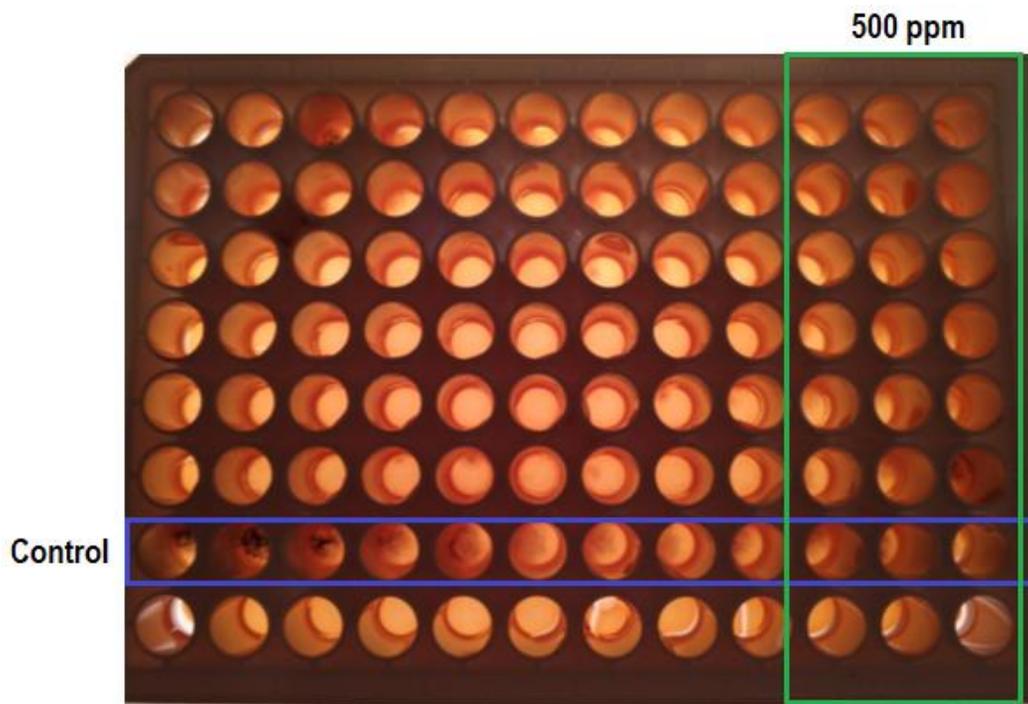


Figura 3.18 Placa de *Aspergillus niger*.

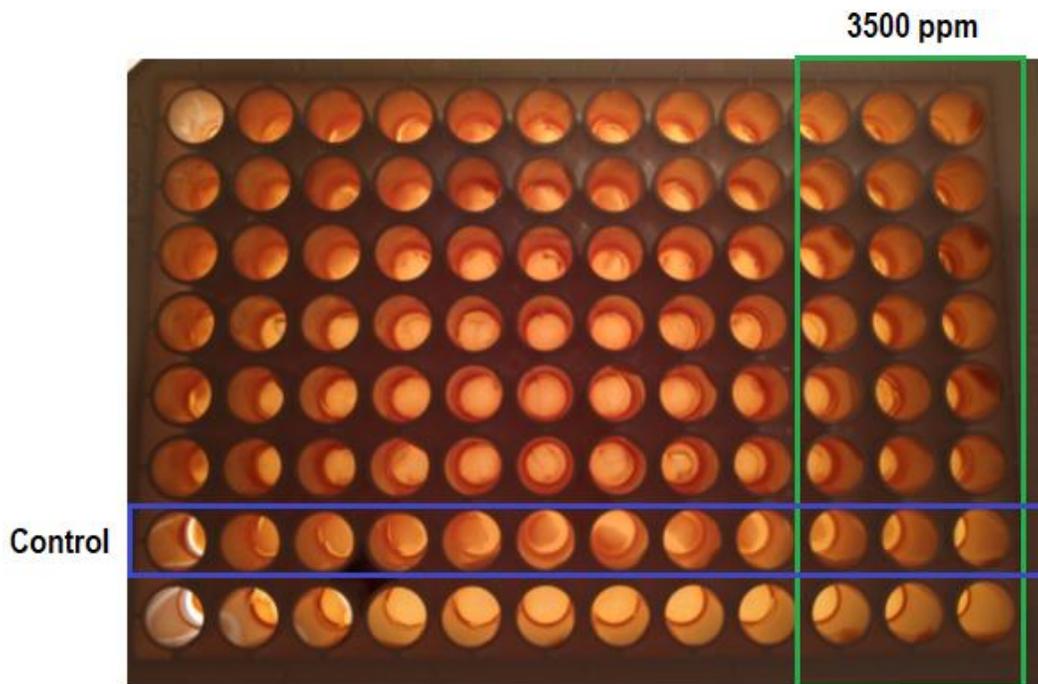


Figura 3.19 Placa de *Candida albicans*.

3.4 Caracterización de nanopartículas de TiO₂ dopadas con Ag respecto a mayor y menor zona de inhibición de los resultados de la variable de respuesta del diseño experimental CDC.

Los resultados obtenidos de la implementación del diseño experimental de dos factores en la inhibición de *S. aureus* y *E. coli*, permitieron conocer las diferentes longitudes de la zona de inhibición presentada sobre la placa, esto propició contrastar las pruebas con mayor y menor longitud de halo de inhibición. Esta sección describe el comportamiento de las muestras por medio del análisis de micrografías TEM-EDS.

3.4.1 Microscopía de transmisión por electrones (TEM)

Para *S. aureus*, los resultados de la variable de respuesta de la Tabla 3.2 posibilitaron determinar que la unidad experimental número 6 (22.09 mm) presentó la longitud máxima de inhibición encontrada sobre la placa, por otra parte, la muestra 1 (13.16 mm) determinó que a esas condiciones la longitud del halo no se denota favorecida, sin embargo, la inhibición del microorganismo se da adecuadamente en todas las unidades experimentales del CDC, en comparación con el primer diseño experimental establecido.

La Figura 3.20 ilustra la micrografía TEM de la unidad experimental 6 de la Tabla 3.2 denotando la escala a 100 y 50 nm respectivamente, esta muestra se conformó con 49.14 % p/p de concentración de AgNO₃ y 5 g de TiO₂, es decir, los puntos (+1.4142, 0) del CDC de dos factores, bajo estas condiciones se encontró la longitud máxima de inhibición para *S. aureus* (22.09 mm). Por otro lado, en la Figura 3.21 se muestra la micrografía de la unidad experimental 1 proporcionada por TEM, misma que obtuvo la menor longitud de halo de inhibición del microorganismo (13.16 mm), esta muestra se conformó con 25% p/p de concentración de AgNO₃ y 3 g de TiO₂, es decir, los puntos axiales (-1, -1) del CDC de dos factores. Morfológicamente en ambas unidades experimentales se aprecia la nanopartícula de TiO₂ con puntos de Ag en la superficie, la diferencia se distingue en la cantidad de Ag que se encuentra

distribuida superficialmente sobre la nanopartícula de TiO_2 . Esta diferencia se atribuye principalmente a la concentración de AgNO_3 que se utilizó en cada muestra.

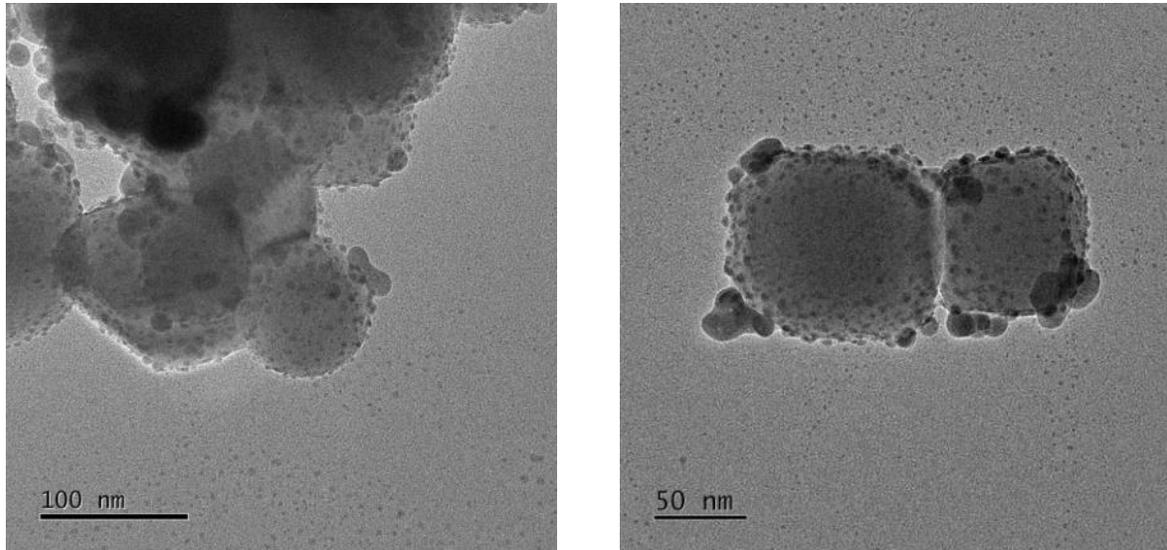


Figura 3.20 Micrografía TEM de la unidad experimental No.6 del CDC de dos factores.

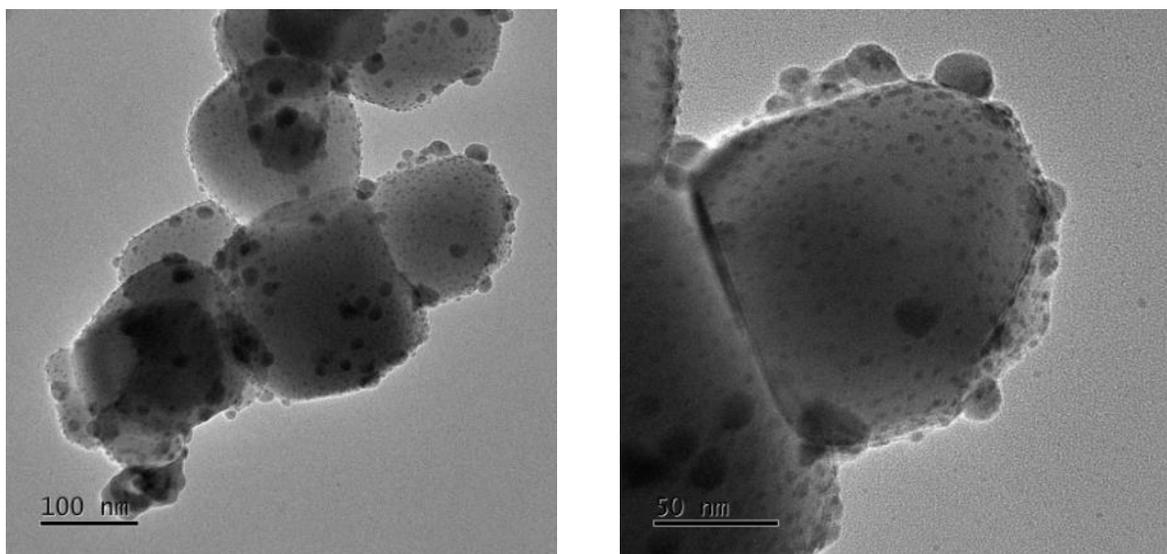


Figura 3.21 Micrografía TEM de la unidad experimental No.1 del CDC de dos factores.

Por otra parte, el análisis químico proporcionado por TEM-EDS del TiO_2 dopado con Ag se muestra en la Figura 3.22 y en la Figura 3.23 de la unidad experimental 6 y 1 respectivamente, a partir de este análisis se obtuvo la composición química.

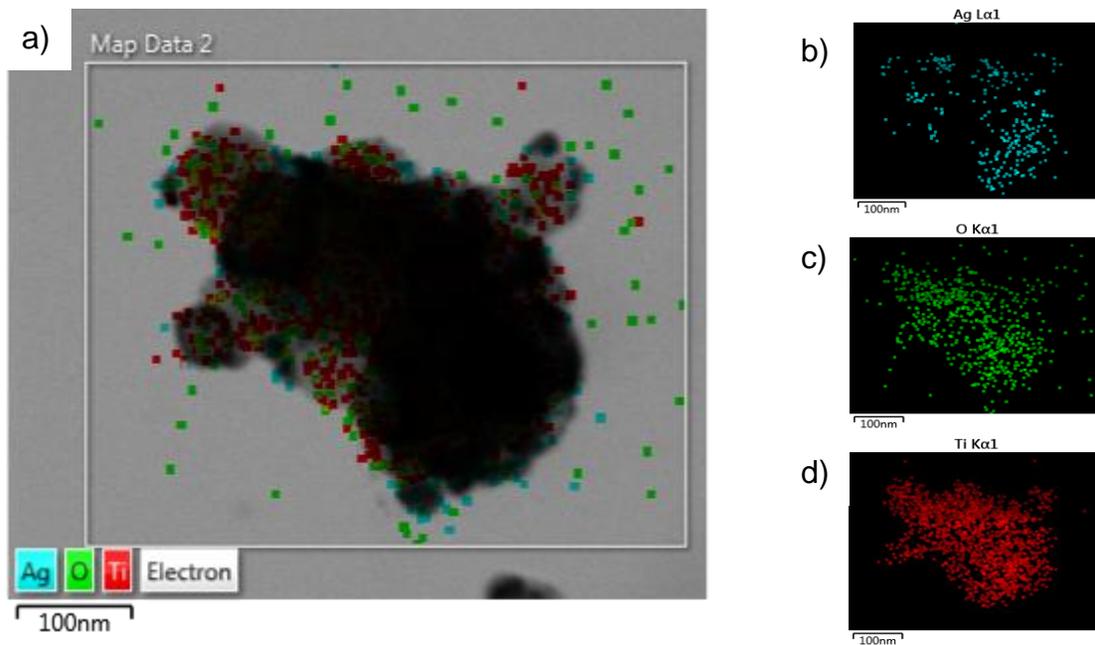


Figura 3.22 Análisis TEM/EDS de la unidad experimental No.6 del CDC de dos factores: a) morfología de TiO₂/Ag, b) distribución de Ag, c) distribución de O₂ y d) distribución de Ti.

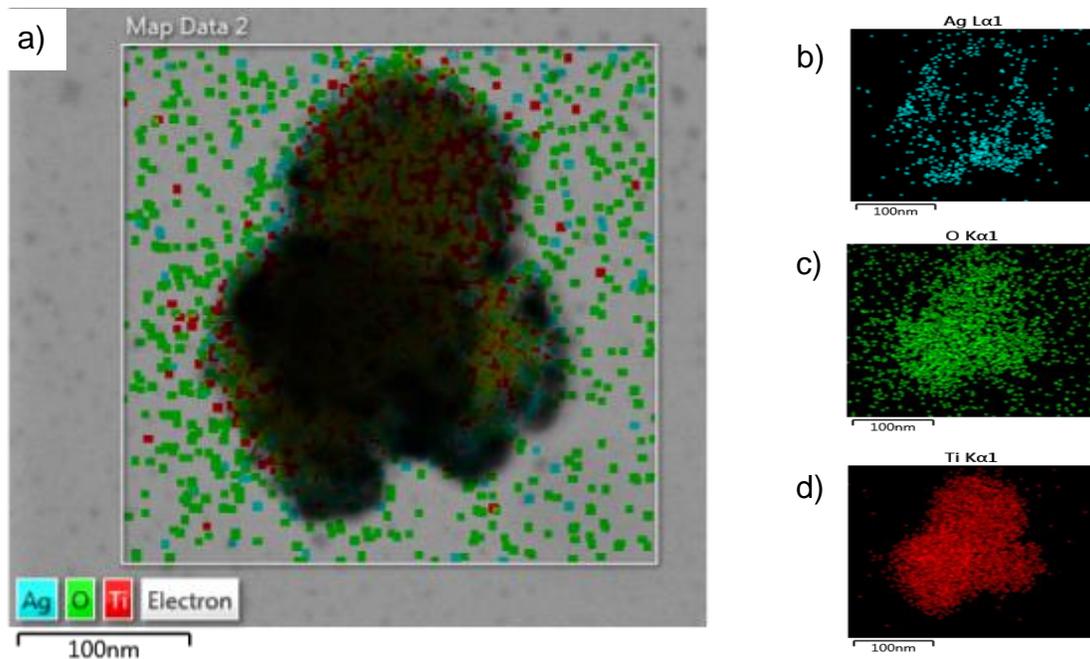


Figura 3.23 Análisis TEM/EDS de la unidad experimental No.1 del CDC de dos factores: a) morfología de TiO₂/Ag, b) distribución de Ag, c) distribución de O₂ y d) distribución de Ti.

Los resultados de este análisis confirmaron la presencia de plata (b), de oxígeno (c) y de titanio (d), los cuales interactúan durante el proceso de dopaje con el metal. Es posible observar que la Ag se distribuye sobre la superficie del TiO₂ (mismo que se confirma en la Figura 3.20 y 3.21), esto indica una correcta dispersión del AgNO₃ durante el proceso de dopaje con el óxido debido a que se asumió una interacción química idónea al mejorar la dispersión del TiO₂ después del proceso de silanización con APTES. La Tabla 3.5 muestra las diferentes composiciones de las muestras.

Tabla 3.5 Análisis químico TEM/EDS de partículas de TiO₂ modificado y dopado con Ag de la unidad experimental 6 y 1.

	Unidad experimental (6)	Unidad experimental (1)
Elemento	% Peso	% Peso
Plata (Ag)	21.7	16.2
Oxígeno (O ₂)	28.6	37.7
Titanio (Ti)	49.7	46.1

Para el caso de la bacteria Gram negativa, *E. coli*, los resultados obtenidos de la variable de respuesta se describieron en la Tabla 3.4, estos permitieron determinar que la unidad experimental 13 obtuvo la longitud máxima de inhibición (10.97 mm), y que, por otra parte, la muestra 5 (6.69 mm) encontró la menor longitud del halo de inhibición.

En la Figura 3.24 se observa la micrografía de la unidad experimental 13 de la Tabla 3.4, esta muestra alcanzó la longitud máxima del halo de inhibición para *E. coli* (10.97 mm), está conformada con 35% p/p de concentración de AgNO₃ y 5 g de TiO₂. En contraparte, la Figura 3.25 ilustra la micrografía de la unidad experimental 5 que obtuvo la menor longitud en mm del halo de inhibición sobre la placa que se trabajó (6.69 mm), esta unidad está conformada con 25.85% p/p de concentración de AgNO₃ y 5 g de TiO₂ en solución. La morfología denota al TiO₂ cubierto superficialmente con puntos de Ag alrededor del mismo, y como es claro, la diferencia entre una y otra unidad experimental, es la cantidad de Ag depositada, mismo que era de esperarse debido a la diferencia de concentración de AgNO₃ respecto al TiO₂ que se utilizó.

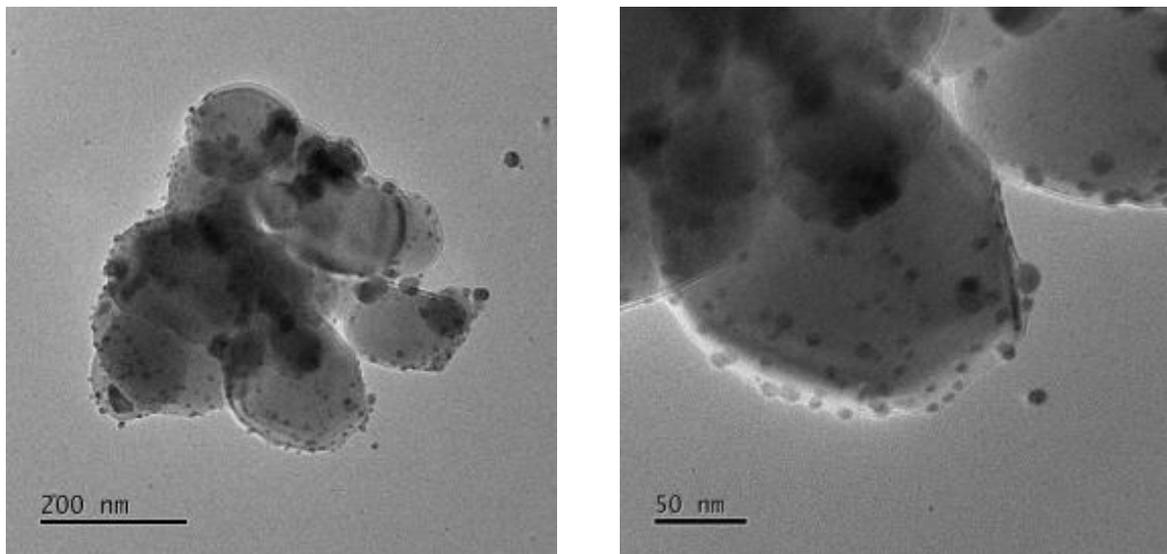


Figura 3.24 Micrografía TEM de la unidad experimental No.13 del CDC de dos factores.

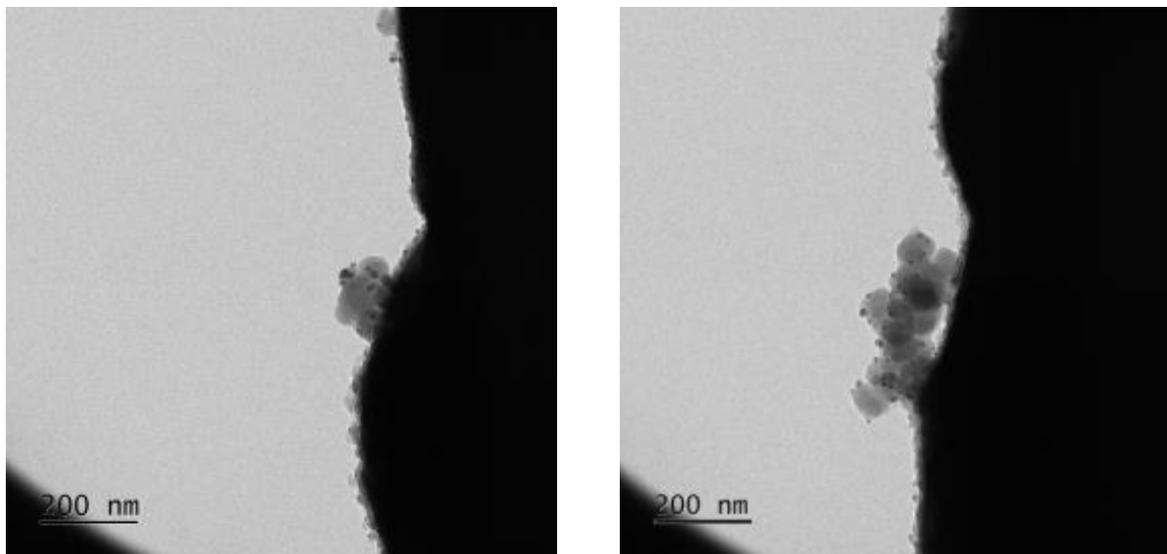


Figura 3.25 Micrografía TEM de la unidad experimental No.5 del CDC de dos factores.

Por su parte, el análisis TEM-EDS de las muestras descritas anteriormente, se muestran en la Figura 3.26 y en la Figura 3.27, de la unidad experimental 13 y 5 respectivamente. Como se esperaba, este análisis confirmó la presencia de los elementos plata (b), oxígeno (c) y titanio (d), así como la dispersión que tiene cada uno de ellos en una muestra aislada de la nanopartícula empleada.

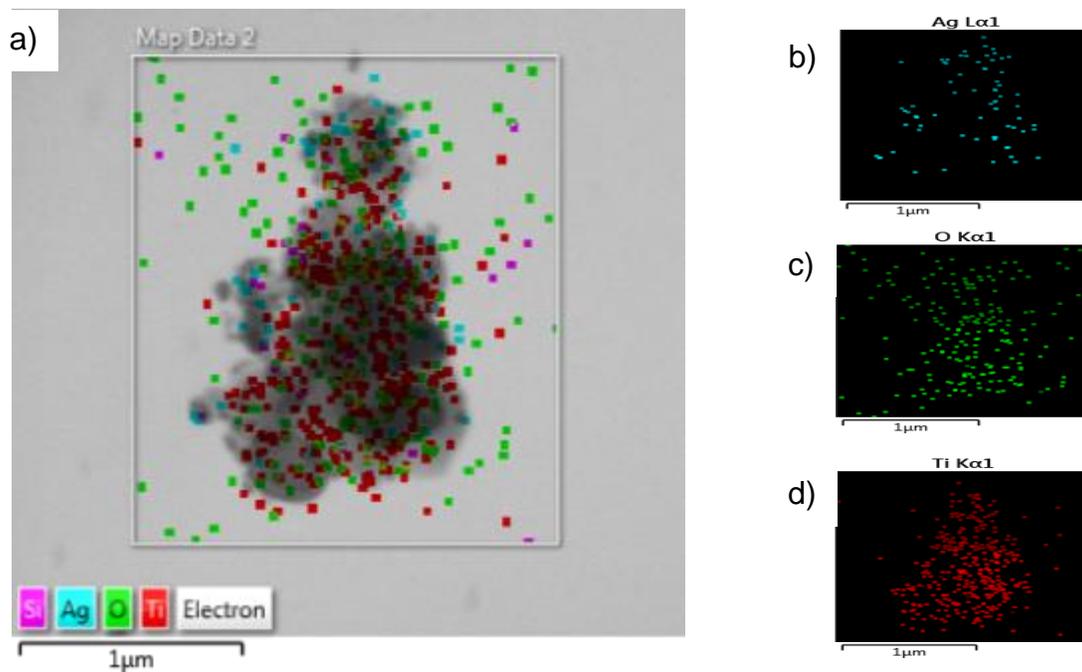


Figura 3.26 Análisis TEM/EDS de la unidad experimental No.13 del CDC de dos factores: a) morfología de TiO_2/Ag , b) distribución de Ag, c) distribución de O_2 y d) distribución de Ti.

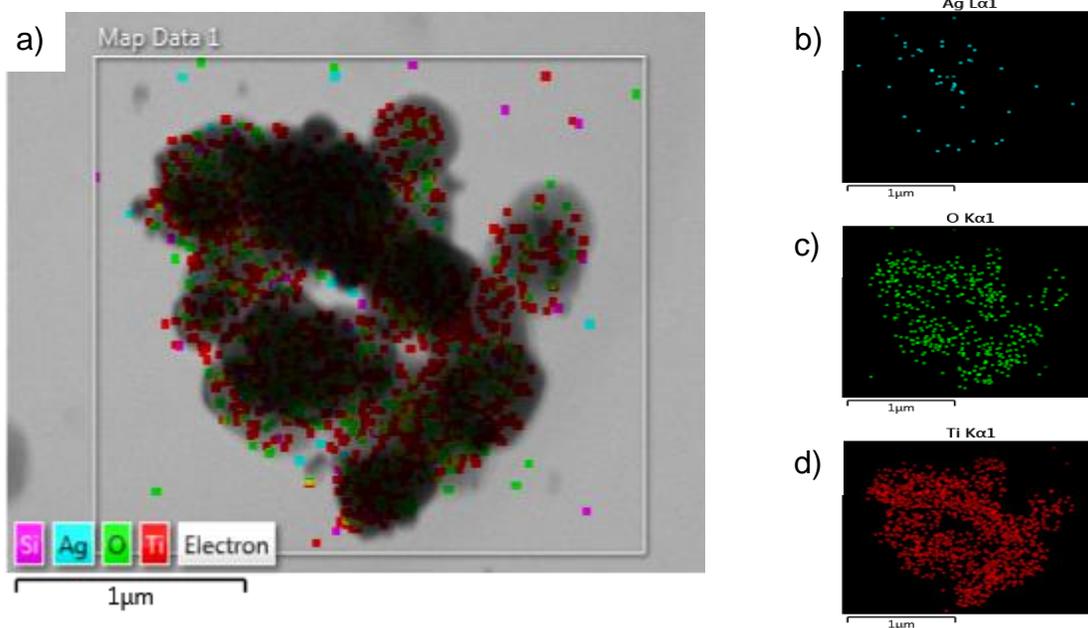


Figura 3.27 Análisis TEM/EDS de la unidad experimental No.5 del CDC de dos factores: a) morfología de TiO_2/Ag , b) distribución de Ag, c) distribución de O_2 y d) distribución de Ti.

A manera de resumen, se presenta en la Tabla 3.6, la composición en porcentaje del peso de cada elemento presente en la muestra analizada de las unidades experimentales seleccionadas.

Tabla 3.6 Análisis químico TEM/EDS de partículas de TiO_2 modificado y dopado con Ag de la unidad experimental 13 y 5.

	Unidad experimental (13)	Unidad experimental (5)
Elemento	% Peso	% Peso
Plata (Ag)	18.8	4.5
Oxígeno (O_2)	37.6	31.3
Titanio (Ti)	43.0	62.9

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

En este trabajo de investigación se logró producir el nanocompuesto conformado por TiO_2 (modificado superficialmente) dopado con Ag, mediante un proceso de dopaje económico y factible (Por reducción en medio acuoso de AgNO_3). Este material cuenta con propiedades idóneas para inhibir bacterias tales como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, así como *Candida albicans* y *Aspergillus niger* del género fungi, lo que lo convierte en un material con alto impacto antibacteriano y antifúngico prometedor en aplicaciones de alta resistencia, en el tratamiento de aguas, recubrimientos en películas, entre otros usos.

La caracterización de las partículas de TiO_2 modificadas superficialmente con APTES fueron validadas con técnicas de microscopía, tales como TEM, FTIR y algunas otras como Potencial Z, RMN y TGA.

El análisis TEM confirmó la presencia de la estructura del TiO_2 en fase Rutilo, es decir, en forma tetragonal, así como una morfología uniforme en forma de cristales pequeños. El espectro FTIR mostró la coordinación de los iones de O_2 que rodean al TiO_2 .

La implementación del diseño experimental tipo CDC así como la MSR permitió determinar las mejores condiciones que garantizan obtener la mayor zona de inhibición (longitud de halos sobre la placa), de igual manera mediante el MSR se logró representar la función de la respuesta (longitud de los halos de inhibición) mediante ecuaciones polinomiales de segundo orden donde se encuentran implícitas las variables independientes consideradas, lo anterior descrito fue para el caso de las bacterias.

Para el caso de los hongos, se determinó la concentración mínima inhibitoria de cada uno, por medio de la implementación de la técnica HT-Spoti.

La síntesis del nanocompuesto TiO_2/Ag fue posible en condiciones básicas de pH, obteniendo mejor resultado en valor de 10.

Por medio del análisis de varianza se determinó que la concentración de AgNO_3 (% p/p) resulta significativa para el proceso de dopaje en la inhibición de *Staphylococcus aureus*. Para ambas bacterias la variable pH resultó, no significativa, siendo esta la menos influyente, por lo anterior se propone un valor constante de pH en 10, dado que a ese valor se encontraron buenos resultados.

Los resultados en la inhibición de los microorganismos confirmaron que la efectividad antimicrobiana del TiO_2/Ag se logra principalmente a una cantidad favorecida de concentración de AgNO_3 durante el proceso de deposición.

La validación de la deposición del metal en la superficie del TiO_2 se comprobó mediante TEM/EDS, en donde se confirmó la presencia de los elementos que se emplearon en los procesos que se llevaron a cabo.

La actividad antibacteriana puede explicarse por el contacto cercano entre las bacterias y las nanopartículas de Ag y/o la liberación de iones Ag^+ del recubrimiento al medio acuoso, como se describe ampliamente en la literatura el contacto directo de las bacterias con TiO_2/Ag puede causar daño físico a la membrana bacteriana lo que conduce a la muerte celular.

RECOMENDACIONES

Para trabajos futuros se recomienda probar TiO_2 en fase anatasa en lugar de rutilo bajo las condiciones que se encontraron, con el fin de analizar el comportamiento del mismo tanto en el proceso de dopaje como en el efecto antibacteriano, dado que en fase anatasa el diámetro de la partícula es aproximadamente 20 nm.

Es indispensable el uso de morteros de ágata para la trituración de las nanopartículas de TiO_2 modificado y el TiO_2 dopado con Ag, dado que con los morteros de cerámica comunes se pierde gran cantidad de material en las paredes del mismo.

El etanol recuperado del proceso silanización puede ser reutilizado después de una adecuada destilación.

Un aporte a este trabajo puede consistir en realizar pruebas de citotoxicidad a las nanopartículas obtenidas de TiO_2/Ag , así como utilizar Ag nanométrica en el proceso de dopaje con el óxido.

Referente al diseño experimental con el que se trabajó, las variables como concentración de AgNO_3 y cantidad de TiO_2 en solución quedan con amplio criterio de búsqueda para explorar otras zonas con el propósito de determinar un óptimo en el proceso. Se recomienda explorar otras zonas, manejando otros rangos de las variables.

ANEXOS

ANEXOS

Anexo A1. Agar de sal y manitol: Método de preparación.

Este es un medio selectivo empleado para aislar estafilococos patógenos de materiales clínicos diversos, por tal motivo se empleó para aislar *Staphylococcus aureus* en el presente trabajo. También se utiliza en la industria con los mismos fines. Marca BD Bioxon. Método de preparación: Suspender 111 g del polvo en un litro de agua purificada. Mezclar perfectamente, calentar con agitación frecuente y hervir durante un minuto hasta disolución completa. Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

Anexo A2. Agar EMB (Eosina y Azul de Metileno): Método de preparación.

Es un medio de cultivo sólido selectivo y diferencial utilizado para el aislamiento de bacilos Gram negativos, principalmente de la familia *Enterobacteriaceae*, y otros bacilos Gram negativos no exigentes, por tal motivo se empleó para aislar *Escherichia coli* en el presente trabajo. Marca BD Bioxon. Método de preparación: Rehidratar 36 g del medio en un litro de agua destilada. Reposar 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Anexo A3. Agar Sabouraud: Método de preparación.

También conocido como agar dextrosa Sabouraud, es un medio de cultivo sólido, especialmente enriquecido para el aislamiento y desarrollo de hongos, como levaduras, mohos y dermatofitos, por tal motivo se empleó para aislar *Candida albicans* y *Aspergillus niger* en el presente trabajo. Marca Sigma-Aldrich. Método de preparación: Suspender 30 g de medio Sabouraud en 1000 mL de agua destilada. Calentar con agitación frecuente hasta disolución completa el medio. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Anexo B1. Análisis de varianza (ANOVA) de la prueba de susceptibilidad en respuesta a la zona de inhibición de *Staphylococcus aureus*.

La Tabla B.1 muestra el Análisis de Varianza (ANOVA) de la metodología de superficie de respuesta del diseño central compuesto en respuesta a la evaluación de inhibición del microorganismo *Staphylococcus aureus*. Como se puede observar la variable que influye de manera significativa en el proceso es la concentración de AgNO_3 debido a que el valor del estadístico $p < 0.05$.

Tabla B1 ANOVA del diseño central compuesto de la evaluación de *Staphylococcus aureus*.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	9	22.7939	2.5327	6.83	0.003
Lineal	3	3.5049	1.1683	3.15	0.073
<i>A</i>	1	0.0002	0.0002	0.00	0.984
<i>B</i>	1	3.4938	3.4938	9.42	0.012
<i>C</i>	1	0.0110	0.0110	0.03	0.867
Cuadrado	3	16.6656	5.5552	14.97	0.000
<i>A</i> ²	1	12.7000	12.7000	34.23	0.000
<i>B</i> ²	1	0.0038	0.0038	0.01	0.921
<i>C</i> ²	1	5.0442	5.0442	13.60	0.004
Interacción de 2 factores	3	2.6233	0.8744	2.36	0.133
<i>AB</i>	1	1.1639	1.1639	3.14	0.107
<i>AC</i>	1	0.2413	0.2413	0.65	0.439
<i>BC</i>	1	1.2181	1.2181	3.28	0.100
Error	10	3.7098	0.3710		
Falta de ajuste	5	0.4799	0.0960	0.15	0.972
Error puro	5	3.2299	0.6460		
Total	19	26.5037			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.609082	86.00%	73.41%	68.70%

Coeficientes

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	10.342	0.248	41.63	0.000	
<i>A</i>	0.003	0.165	0.02	0.984	1.00
<i>B</i>	0.506	0.165	3.07	0.012	1.00
<i>C</i>	0.028	0.165	0.17	0.867	1.00
<i>A</i> ²	-0.939	0.160	-5.85	0.000	1.02
<i>B</i> ²	0.016	0.160	0.10	0.921	1.02
<i>C</i> ²	-0.592	0.160	-3.69	0.004	1.02
<i>AB</i>	0.381	0.215	1.77	0.107	1.00
<i>AC</i>	-0.174	0.215	-0.81	0.439	1.00
<i>BC</i>	0.390	0.215	1.81	0.100	1.00

Ecuación de regresión

Halos de <i>S. aureus</i> (mm)	=	-13.45 + 4.468 <i>A</i> - 0.818 <i>B</i> + 1.472 <i>C</i> - 0.2347 <i>A</i> ² + 0.0018 <i>B</i> ² - 0.1479 <i>C</i> ² + 0.0636 <i>AB</i> - 0.0434 <i>AC</i> + 0.0650 <i>BC</i>
--------------------------------	---	---

Factor	Nombre
A	pH
B	Concentración de AgNO ₃ (% p/p)
C	Sólidos de TiO ₂ (g/250mL)

Anexo B2. Diagrama de Pareto y Gráfica de probabilidad normal en respuesta a la zona de inhibición de *Staphylococcus aureus*.

El Diagrama de Pareto (mostrado en la Figura B2) también se utilizó para comparar la significancia estadística de los efectos. Los efectos que sobrepasan la línea de referencia indican cuales efectos son significativos, se observa que la concentración de AgNO₃ es el efecto principal significativo en tanto que el pH y los sólidos de TiO₂ no son significativos para el proceso así también se puede considerar al pH como el efecto menos influyente.

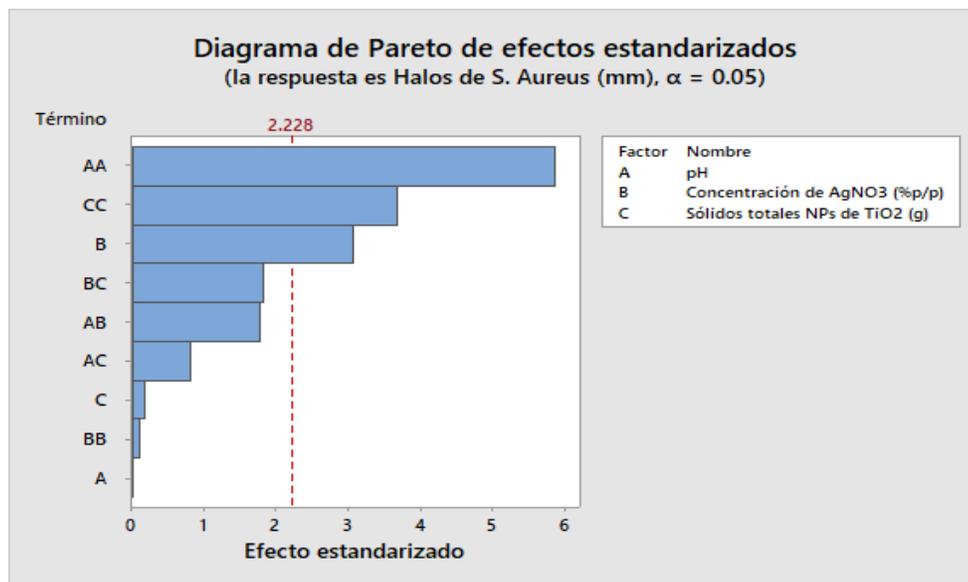


Figura B2 Diagrama de Pareto de la evaluación de *Staphylococcus aureus*.

La Figura B3 muestra los residuos contra los valores esperados cuando la distribución es normal. Se observa la tendencia de los residuales estandarizados, mismos que, la mayoría se encuentran dentro de la normalidad y distribuidos uniformemente.

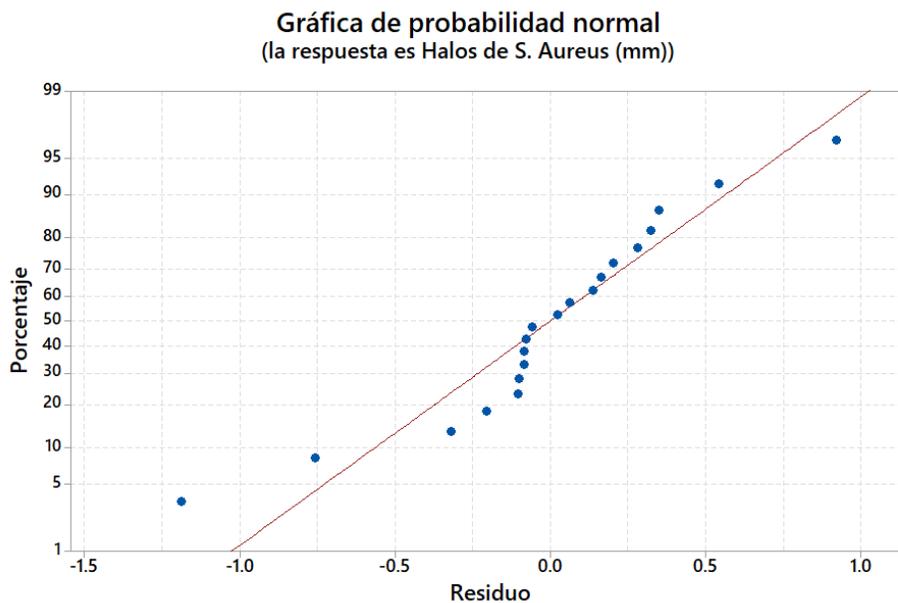


Figura B3 Gráfica de probabilidad normal de la evaluación de *Staphylococcus aureus*.

Anexo B3. Análisis de varianza (ANOVA) de la prueba de susceptibilidad en respuesta a la zona de inhibición de *Staphylococcus aureus* del diseño experimental de dos factores.

La Tabla B.3 muestra el Análisis de Varianza (ANOVA) de la metodología de superficie de respuesta del diseño central compuesto de dos factores en respuesta a la evaluación de inhibición del microorganismo *Staphylococcus aureus*. Como se puede observar la variable que influye de manera significativa en el proceso es la concentración de AgNO_3 debido a que el valor del estadístico $p < 0.05$.

Tabla B3 ANOVA del diseño central compuesto de dos factores en la evaluación de *Staphylococcus aureus*.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	5	80.1301	16.0260	6.72	0.013
Lineal	2	25.9854	12.9927	5.45	0.037
A	1	25.5612	25.5612	10.72	0.014
B	1	0.4242	0.4242	0.18	0.686
Cuadrado	2	29.0178	14.5089	6.08	0.029
A²	1	19.5951	19.5951	8.22	0.024
B²	1	13.1102	13.1102	5.50	0.052
Interacción de 2 factores	1	25.1268	25.1268	10.53	0.014
AB	1	25.1268	25.1268	10.53	0.014
Error	7	16.6958	2.3851		
Falta de ajuste	3	15.6525	5.2175	20.00	0.007
Error puro	4	1.0433	0.2608		
Total	12	96.8259			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
1.54438	82.76%	70.44%	0.00%

Coeficientes codificados

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	14.561	0.691	21.08	0.000	
<i>A</i>	1.787	0.546	3.27	0.014	1.00
<i>B</i>	0.230	0.546	0.42	0.686	1.00
<i>A</i> ²	1.678	0.586	2.87	0.024	1.02
<i>B</i> ²	1.373	0.586	2.34	0.052	1.02
<i>AB</i>	-2.506	0.772	-3.25	0.014	1.00

Ecuación de regresión

Halo de <i>S. aureus</i> (mm)	=	14.9 - 0.370 <i>A</i> + 1.07 <i>B</i> + 0.01678 <i>A</i> ² + 0.343 <i>B</i> ² - 0.1253 <i>AB</i>
-------------------------------	---	--

Factor	Nombre
A	Concentración de AgNO ₃ (% p/p)
B	Sólidos de TiO ₂ (g/250mL)

Anexo B4. Diagrama de Pareto y Gráfica de probabilidad normal en respuesta a la zona de inhibición de *Staphylococcus aureus* del diseño experimental de dos factores.

El Diagrama de Pareto (mostrado en la Figura B4) se utilizó para comparar la significancia estadística de los efectos. Se observa que la concentración de AgNO₃ es el efecto principal significativo en tanto que los sólidos de TiO₂ no son significativos para el proceso.

La Figura B5 muestra los residuos contra los valores esperados cuando la distribución es normal. La tendencia de los residuales estandarizados con media cero y varianza igual a 1, muestra que los datos se encuentran dentro de la normalidad y distribuidos uniformemente, lo que indica que los intervalos de confianza y los valores p son correctos.

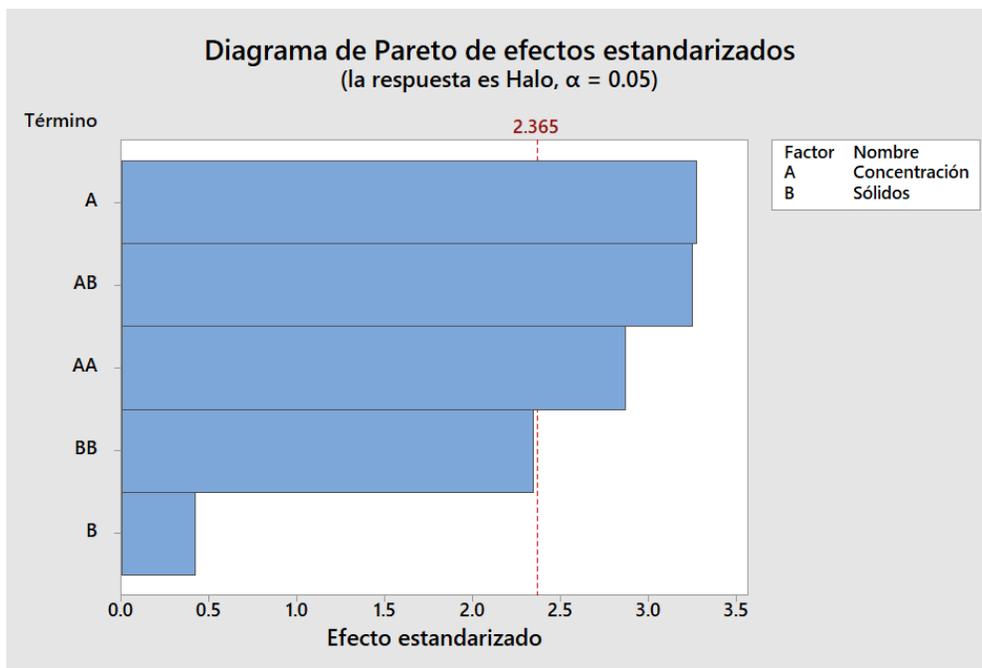


Figura B4 Diagrama de Pareto de la evaluación de *Staphylococcus aureus* del diseño experimental de dos factores.

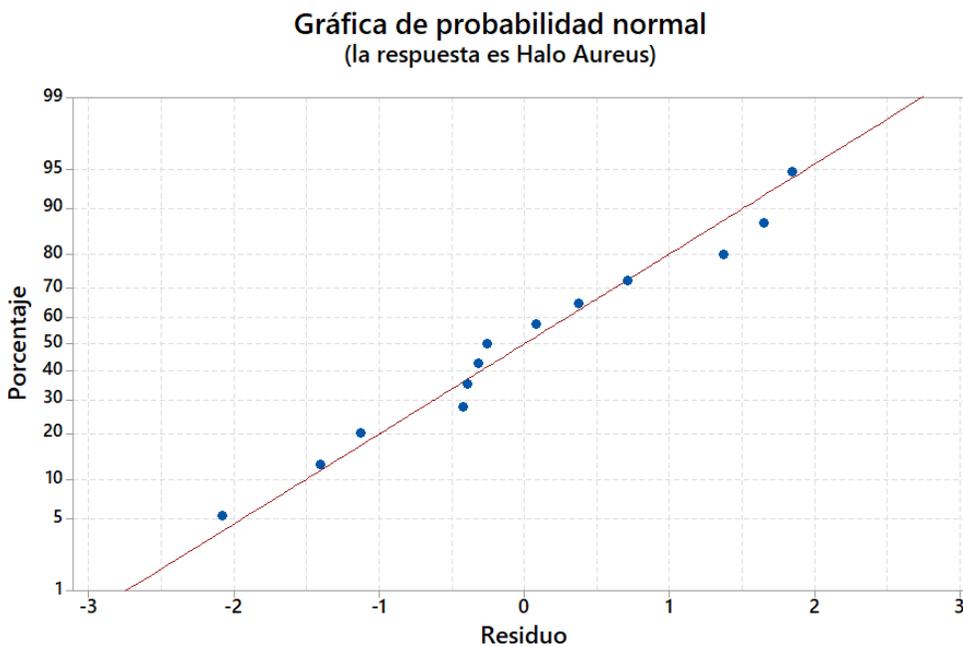


Figura B5 Gráfica de probabilidad normal de la evaluación de *Staphylococcus aureus* del diseño experimental de dos factores.

Anexo C1. Análisis de varianza de la prueba de susceptibilidad en respuesta a la zona de inhibición de *Escherichia coli*.

En la siguiente Tabla C1 se muestra el Análisis de Varianza (ANOVA) de la metodología de superficie de respuesta del diseño central compuesto en respuesta a la evaluación de inhibición del microorganismo *Escherichia coli*. A diferencia del microorganismo anterior, en este análisis, ninguna variable resultó significativa estadísticamente, debido a que el valor del estadístico $p > 0.05$.

Tabla C1 ANOVA del diseño central compuesto de la evaluación de *Escherichia coli*.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	9	1.55412	0.172680	1.28	0.350
Lineal	3	0.64823	0.216077	1.61	0.249
<i>A</i>	1	0.42165	0.421655	3.13	0.107
<i>B</i>	1	0.12440	0.124401	0.92	0.359
<i>C</i>	1	0.10218	0.102175	0.76	0.404
Cuadrado	3	0.71418	0.238059	1.77	0.216
<i>A</i> ²	1	0.39163	0.391629	2.91	0.119
<i>B</i> ²	1	0.21429	0.214293	1.59	0.236
<i>C</i> ²	1	0.03742	0.037419	0.28	0.609
Interacción de 2 factores	3	0.19172	0.063905	0.48	0.707
<i>AB</i>	1	0.00722	0.007220	0.05	0.821
<i>AC</i>	1	0.00037	0.000372	0.00	0.959
<i>BC</i>	1	0.18412	0.184123	1.37	0.269
Error	10	1.34514	0.134514		
Falta de ajuste	5	1.20259	0.240519	8.44	0.018
Error puro	5	0.14254	0.028509		
Total	19	2.89926			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.366761	53.60%	11.85%	0.00%

Coeficientes

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	7.440	0.150	49.74	0.000	
<i>A</i>	0.1757	0.0992	1.77	0.107	1.00
<i>B</i>	-0.0954	0.0992	-0.96	0.359	1.00
<i>C</i>	-0.0865	0.0992	-0.87	0.404	1.00
<i>A</i> ²	0.1648	0.0966	1.71	0.119	1.02
<i>B</i> ²	-0.1219	0.0966	-1.26	0.236	1.02
<i>C</i> ²	-0.0510	0.0966	-0.53	0.609	1.02
<i>AB</i>	0.030	0.130	0.23	0.821	1.00
<i>AC</i>	-0.007	0.130	-0.05	0.959	1.00
<i>BC</i>	0.152	0.130	1.17	0.269	1.00

Ecuación de regresión en unidades no codificadas

Halos de <i>E. coli</i> (mm)	=	$11.29 - 0.763 A - 0.019 B - 0.076 C + 0.0412 A^2 - 0.0135 B^2 - 0.0127C^2 + 0.0050 AB - 0.0017 AC + 0.0253 BC$
------------------------------	---	---

Factor	Nombre
A	pH
B	Concentración de AgNO ₃ (% p/p)
C	Sólidos de TiO ₂ (g/250mL)

Anexo C2. Diagrama de Pareto y Gráfica de probabilidad normal en respuesta a la zona de inhibición de *Escherichia coli*.

En la Figura C2 se encuentra el Diagrama de Pareto de la evaluación de *Escherichia coli* y como fue mencionado anteriormente ningún efecto fue significativo estadísticamente para el proceso dado que ninguno sobrepasa la línea de referencia.

La Figura C3 muestra la gráfica de probabilidad normal. Se observa que aunque la mayoría se encuentran dentro de la normalidad y están distribuidos uniformemente, existen datos inusitados por consiguiente fuera de los valores normales esperados, debido probablemente a errores de tipo experimental en las mediciones del halo, lo

que conlleva a la obtención de estos valores fuera de la tendencia representada por la tendencia en línea recta.

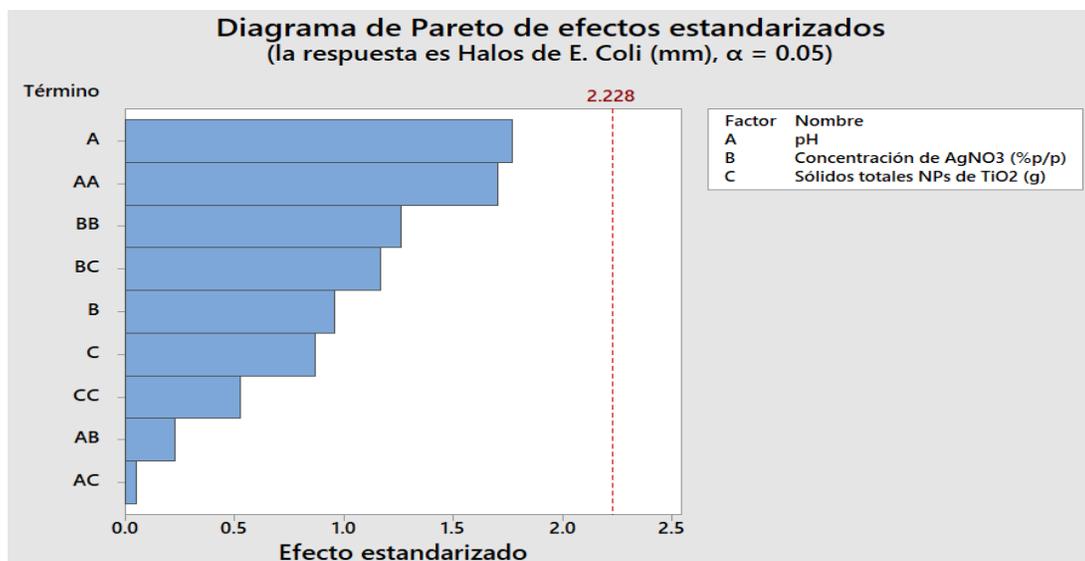


Figura C2 Diagrama de Pareto de la evaluación de *Escherichia coli*.

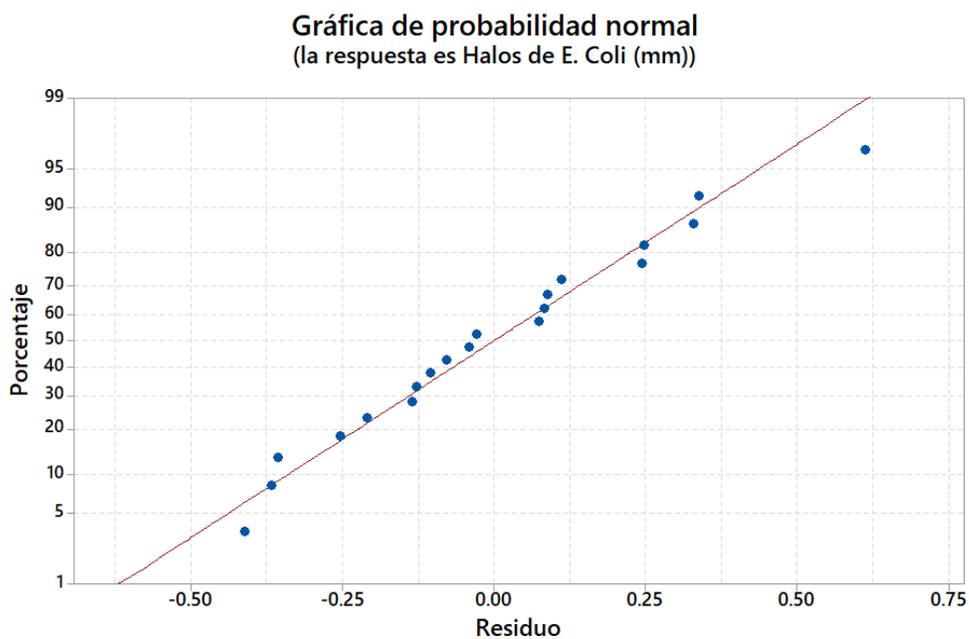


Figura C3 Gráfica de probabilidad normal de la evaluación de *Escherichia coli*.

Anexo C3. Análisis de varianza (ANOVA) de la prueba de susceptibilidad en respuesta a la zona de inhibición de *Escherichia coli* del diseño experimental de dos factores.

La Tabla C.3 muestra el Análisis de Varianza (ANOVA) de la metodología de superficie de respuesta del diseño central compuesto de dos factores en respuesta a la evaluación de inhibición del microorganismo *Escherichia coli*. Se observa que ninguna variable influye de manera significativa en el proceso, debido a que el valor del estadístico $p > 0.05$.

Tabla C3 ANOVA del diseño central compuesto de dos factores en la evaluación de *Escherichia coli*.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	5	5.0551	1.01102	0.48	0.784
Lineal	2	1.9911	0.99554	0.47	0.644
A	1	0.2581	0.25814	0.12	0.737
B	1	1.7329	1.73295	0.82	0.396
Cuadrado	2	2.9540	1.47698	0.70	0.530
A²	1	2.8910	2.89097	1.36	0.281
B²	1	0.0007	0.00073	0.00	0.986
Interacción de 2 factores	1	0.1101	0.11006	0.05	0.826
AB	1	0.1101	0.11006	0.05	0.826
Error	7	14.8401	2.12001		
Falta de ajuste	3	11.7339	3.91131	5.04	0.076
Error puro	4	3.1061	0.77654		
Total	12	19.8952			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
1.45603	25.41%	0.00%	0.00%

Coeficientes codificados

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	9.634	0.651	14.80	0.000	
<i>A</i>	0.180	0.515	0.35	0.737	1.00
<i>B</i>	-0.465	0.515	-0.90	0.396	1.00
<i>A</i> ²	-0.645	0.552	-1.17	0.281	1.02
<i>B</i> ²	0.010	0.552	0.02	0.986	1.02
<i>AB</i>	-0.166	0.728	-0.23	0.826	1.00

Ecuación de regresión

Halo de <i>E. coli</i> (mm)	=	$0.9 + 0.511 A + 0.03 B - 0.00645 A^2 + 0.003 B^2 - 0.0083 AB$
-----------------------------	---	--

Factor	Nombre
A	Concentración de AgNO ₃ (% p/p)
B	Sólidos de TiO ₂ (g/250mL)

Anexo C4. Diagrama de Pareto y Gráfica de probabilidad normal en respuesta a la zona de inhibición de *Escherichia coli* del diseño experimental de dos factores.

El Diagrama de Pareto, ilustrado en la Figura C4, se utilizó para comparar la significancia estadística de los efectos. Como ya se mencionó en el Anexo B3 ninguna variable resulta significativa para el proceso.

La Figura C5 muestra los residuos contra los valores esperados cuando la distribución es normal. La tendencia de los residuales estandarizados con media cero y varianza igual a 1, muestra que los datos se encuentran dentro de la normalidad y distribuidos uniformemente, lo que indica que los intervalos de confianza y los valores p son correctos.

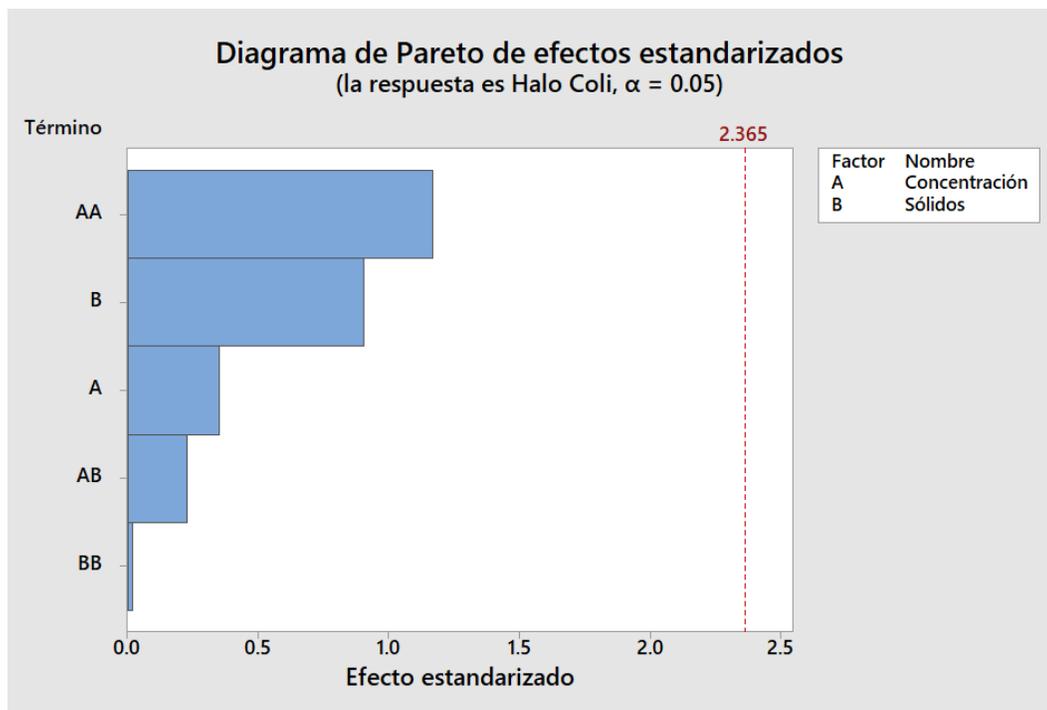


Figura C4 Diagrama de Pareto de la evaluación de *Escherichia coli* del diseño experimental de dos factores.

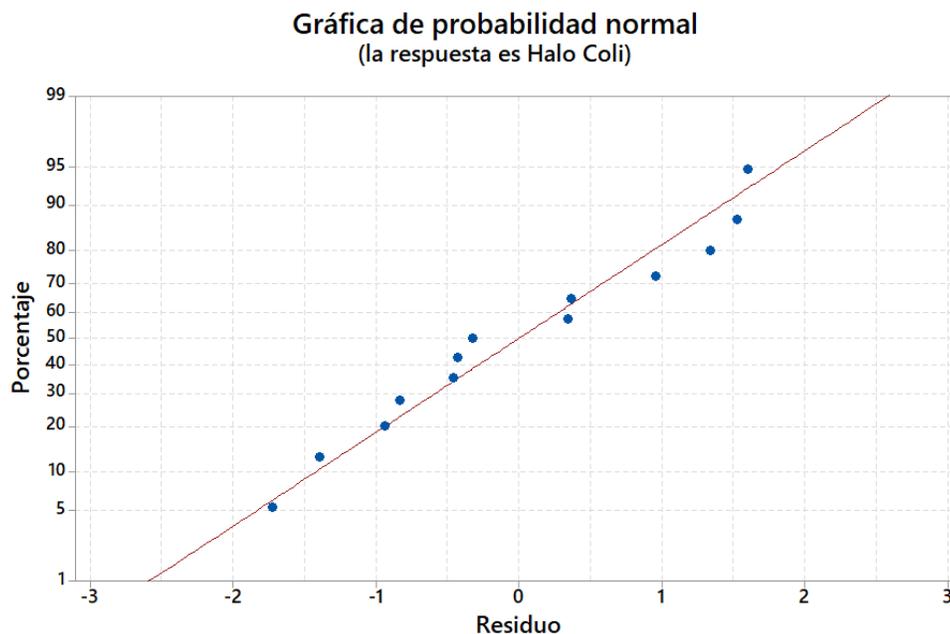


Figura C5 Gráfica de probabilidad normal de la evaluación de *Escherichia coli* del diseño experimental de dos factores.

**REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afanasyev, D. A., Ibrayev, N. K., Serikov, T. M., y Zeinidenov, A. K. 2016. Effect of the Titanium Dioxide Shell on the Plasmon Properties of Silver Nanoparticles. *Russian Journal of Physical Chemistry*, **90**(4), 833–837. Retrieved from doi:10.1134/S0036024416040026.
- Ali, T., Ahmed, A., Alam, U., Uddin, I., Tripathi, P., y Muneer, M. 2018. Enhanced photocatalytic and antibacterial activities of Ag-doped TiO₂ nanoparticles under visible light. *Materials Chemistry and Physics*, **212**(15), 325–335. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2018.03.052>
- Alimunnisa, J., Ravichandran, K., y Meena, K. S. 2017. Synthesis and characterization of Ag@SiO₂ core-shell nanoparticles for antibacterial and environmental applications. *Journal of Molecular Liquids*, **231**(2017), 281-287. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molliq.2017.01.103>.
- Almendárez Camarillo, A., y González Calderón, J. A. 2011. Nanomateriales : su crecimiento, caracterización estructural y tendencias. *CONCYTEG*, **6**(72), 772–787. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/277666736>
- Amin, S. A., Pazouki, M., y Hosseinnia, A. 2009. Synthesis of TiO₂-Ag nanocomposite with sol-gel method and investigation of its antibacterial activity against E. coli. *Powder Technology*, **196**(3), 241–245. Elsevier B.V. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.powtec.2009.07.021>
- Angkaew, S., y Limsuwan, P. 2012. Preparation of silver-titanium dioxide core-shell (Ag@TiO₂) nanoparticles: Effect of Ti-Ag mole ratio. *Procedia Engineering*, **32**(3), 649–655. Retrieved from doi:10.1016/j.proeng.2012.01.1322
- Ávalos Haza, A., Mateo, D., y Morales, P. 2013. Nanopartículas de plata: aplicaciones y riesgos tóxicos para la salud humana y el medio ambiente. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, **7**(2), 1–23. Retrieved from http://dx.doi.org/10.5209/rev_RCCV.2013.v7.n2.43408
- Bauer A. W., Kirby W. M., Sherris J. C., y Turck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. , **45**(4), 493-496.

- Betancur Henao, C. P., Hernández Montes, V., y Buitrago Sierra, R. 2016. Nanopartículas para materiales antibacterianos y aplicaciones del dióxido de titanio. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, **35**(4), 387–402. Retrieved from <http://scielo.sld.cu>
- Blum, F. D. 2003. Silane coupling agents. *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, **8**(4), 38–50.
- Bovey, F. A. 1988. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Second edition. Academic Press, Murray Hill. New Jersey.
- Cao G. y Wang Y. 2011. Nanostructures and nanomaterials: Synthesis, Properties, and Applications. World Scientific. Louisiana, E.U.
- Carvajal Certuche, D. F. 2010. Caracterización mecánica de materiales mediante técnicas de microscopía de fuerza atómica y nanoindentación. Tesis de Maestría. Universidad de los Andes. Colombia.
- Chen, Q., y Yakovlev, N. L. 2010. Adsorption and interaction of organosilanes on TiO₂ nanoparticles. *Applied Surface Science*, **257**(4), 1395–1400. Retrieved from doi:10.1016/j.apsusc.2010.08.036
- Chong, K. P. 2004. Nanoscience and engineering in mechanics and materials. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, **65**(2), 1501–1506. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.jpcs.2003.09.032>
- Cockerill, F. R., Wikler, M. A., Alder, J., Dudley, M. N., Eliopoulos, G. M., Ferraro, M. J., Hardy, D. J., et al. 2012. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard. M. P. Larrisey, Ed. 11., Vol. 32. Wayne, Pennsylvania, USA.
- Cuberes M. 2006. Nanotecnología: actualidad y futuro. Trabajo docente, [en línea]. Universidad de Castilla, España. Disponible en: <https://profesordiegoj.files.wordpress.com/2013/03/nanotecnologc3ada-actualidad-y-futuro.pdf>. [Consultado 03/11/2019].
- Culler, S. R., Naviroj, S., Ishida, H. y Koenig, J. L. 1983. Analytical and Spectroscopic Investigation of the Interaction of CO₂ with Amine Functional

- Silane Coupling Agents on Glass Fibers. *Journal of Colloid and Interface Science*. **96**(1):69-79. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(83\)90009-7](https://doi.org/10.1016/0021-9797(83)90009-7)
- Curia, M. V. 2010. Estudio Físicoquímico y Catalítico del Sistema Mn-O-V. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de la Plata. Argentina.
 - Danquah, C.A., Maitra, A., Gibbons, S., Faull, J., and Bhakta, S. 2016. HT-SPOTi: A rapid drug susceptibility test (DST) to evaluate antibiotic resistance profiles and novel chemicals for anti-infective drug discovery. *Curr. Protoc. Microbiol.* **40**:17.8.1-17.8.12. doi: 10.1002/9780471729259.mc1708s40
 - Delgado-Ramos, G. C. 2014. Nanotechnology in Mexico: Global trends and national implications for policy and regulatory issues. *Technology in Society*, **37**(1), 4–15. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.techsoc.2013.09.005>
 - De Jaeger, R. y Gleria, M. 2007. Inorganic Polymers. Nova Science Publishers, New York, USA.
 - Dhanalekshmi, K. I., y Meena, K. S. 2014. Comparison of Antibacterial activities of Ag@TiO₂ and Ag@SiO₂ Core-Shell Nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **128**(5), 887–890. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2014.02.063>
 - Dubreuil, L., Jehl, F., Cattoen, C., Bonnet, R., Bru, J. P., Caron, F., Cattoir, V., Courvalin, P., Jarlier, V., Lina, G., Merens, A., Plesiat, P., Marie, C., Soussy, C. J., Varon, E. y Weber, P. 2020. Improvement of a disk diffusion method for antibiotic susceptibility testing of anaerobic bacteria. French recommendations revisited for 2020. *Anaerobe*, **64**(1), 102213. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2020.102213>
 - Faraldos, M., y Goberna, C. (Eds.). 2002. Técnicas de análisis y caracterización de materiales. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid.
 - Felipe, M. I., y Rodríguez, C. 2012. Introducción a los nanomateriales. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. Departamento de Ingeniería. Laboratorio de tecnología de materiales. Lecturas de ingeniería 20. Cuautitlán Izcalli, México.

- Gajanan, K., y Tijare, S. N. 2018. Applications of nanomaterials. *Materials Today: Proceedings*, **5**(1), 1093–1096. Elsevier Ltd. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2017.11.187>
- García-Hernández, A. M., García-Vázquez, E., Hernández-Torres, A., Ruiz, J., y Yagüe, G. 2011. Bacteriemias por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): significación clínica y perspectivas actuales. *Rev Esp Quimioter*, **24**(2), 57–66.
- Gedanken, A. 2004. Using sonochemistry for the fabrication of nanomaterials. *Ultrasonics sonochemistry*, **11**(2), 47-55. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2004.01.037>
- Godoy, P., Almeida, L. P., y Colombo Lopes, A. 2001. Identificación de *Candida Albicans* utilizando el medio cromogénico *Albicans ID*. *Revista Iberoamericana de Micología*, **18**(January), 197–199. Retrieved from doi: 1130-1406/01/10.00
- González-Calderón, J. A., Hernández S. y Vázquez, J. A. 2018. Optimización de variables para polímeros con nanotubos de carbono. Aplicación de superficie de respuesta en problemas de ingeniería de materiales. Editorial Academia Española. México.
- González-Calderón, J. A., López-Esparza, R., Saldivar-Guerrero, R., y Almendárez-Camarillo, A. 2018. “Improvement in the energy dissipation capacity of polypropylene composites through a surface modification of titanium dioxide particles with a dicarboxylic acid.” *Thermochimica Acta*, **664**(April), 48–56. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.tca.2018.04.008>
- González-Rodríguez, V., Zapata-tello, D. L., Vallejo-Montesinos, J., Zárraga Núñez, R., González-Calderón, J. A., y Elias, P. 2018. Improving titanium dioxide dispersion in water through surface functionalization by a dicarboxylic acid. *Journal of Dispersion Science and Technology*, **0**(0), 1–7. Retrieved from <https://doi.org/10.1080/01932691.2018.1496828>
- Grace, D. y Fetsch, A. 2018. *Staphylococcus aureus*. Academic Press. Oxford, United Kingdom. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809671-0.00001-2>

- Haghghat, N., Vatanpour, V., Sheydaei, M. y Nikjavan, Z. 2019. Preparation of a novel polyvinyl chloride (PVC) ultrafiltration membrane modified with Ag/TiO₂ nanoparticle with enhanced hydrophilicity and antibacterial activities. *Separation and Purification Technology*, **237**(15), 116374. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2019.116374>
- Haider, A. J., Anbari, R. H., y Kadhim, G. 2017. Exploring potential Environmental applications of TiO₂ Nanoparticles. *Energy Procedia*, **119**, 332–345. Elsevier B.V. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.egypro.2017.07.117>
- Harikishore, M., Sandhyarani, M., Venkateswarlu, K., y Nellaippan, T. A. 2014. Effect of Ag doping on Antibacterial and Photocatalytic Activity of Nanocrystalline TiO₂. *Procedia Materials Science*, **6**(Icmpec), 557–566. Elsevier B.V. Retrieved from doi: 10.1016/j.mspro.2014.07.071
- Hassanien, A. S., y Khatoon, U. T. 2019. Synthesis and characterization of stable silver nanoparticles, Ag-NPs: Discussion on the applications of Ag-NPs as antimicrobial agents. *Physica B: Physics of Condensed Matter*, **554**, 21–30. Elsevier B.V. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.physb.2018.11.004>
- Holland, M. S., Nobrega, D., Peirano, G., Naugler, C., Church, D. L. y Pitout, J. D. D. 2020. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* causing bloodstream infections in a centralized Canadian region: a population-based surveillance study. *Clinical Microbiology and Infection*, **26**(11), 1554.e1-1554.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.02.019>
- Hoppens, M., Sylvester, C., Qureshi, A., Scherr, T., Czapski, D., Duran, R., Savage, P. y Hayes, D. 2014. Ceragenin: mediated selectivity of antimicrobial silver nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. **6**(16) 13900 –13908. <https://doi.org/10.1021/am504640f>
- Hunter, R. J. 1981. Zeta Potential in Colloid Science, Principles and Applications. Academic Press limited. San Diego, CA.
- Jaimes, J., Rios, I., y Severiche, C. 2017. Nanotecnología y sus aplicaciones en la industria de alimentos. *Alimentos Hoy*, **25**(41), 51–76.

- Jaksza, G., Stefane, B. y Kovac, J. 2014. Influence of different solvents on the morphology of APTMS-modified silicon surfaces. *Applied Surface Science*. **315**(1):516-522. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.05.157>
- Janett, B., Gutiérrez, A., Meléndez, A. L., Yazmin, C., Liñan, R., Abraham, D., y López, L. 2015. La nanotecnología a 40 años de su aparición: Logros y tendencias. *Ingenierías*, XVIII (66), 13–23.
- Kabir, E., Kumar, V., Kim, K. H., Yip, A. C. K., y Sohn, J. R. 2018. Environmental impacts of nanomaterials. *Journal of Environmental Management*, **225**(May), 261–271. Elsevier. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.07.087>
- Kačuráková, M., y Wilson, R. H. 2001. Developments in mid-infrared FT-IR spectroscopy of selected carbohydrates. *Carbohydrate Polymers*, **44**(4), 291–303. Retrieved from [doi:10.1016/S0144-8617\(00\)00245-9](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00245-9)
- Karagoz, S., Burak, N., Sakir, M., Salem, S., Serdar, M., Sahmetlioglu, E., Ceylan, A., y Yilmaz, E. 2020. Synthesis of Ag and TiO₂ modified polycaprolactone electrospun nanofibers (PCL/TiO₂-Ag NFs) as a multifunctional material for SERS, photocatalysis and antibacterial applications. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **188**(30), 109856. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109856>
- Karak, N. 2019. Fundamentals of Nanomaterials and Polymer Nanocomposites. In N. Karak (Ed.), *Nanomaterials and Polymer Nanocomposites: Raw Materials to Applications* (1st ed., pp. 1–45). India: Elsevier Inc. Retrieved from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128146156000011>
- Li, Y., Ma, M., Chen, W., Li, L., y Zen, M. 2011. Preparation of Ag-doped TiO₂ nanoparticles by a miniemulsion method and their photoactivity in visible light illuminations. *Materials Chemistry and Physics*, **129**(1–2), 501–505. Elsevier B.V. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.matchemphys.2011.04.055>
- Liang, Y. Q., Cui, Z. D., Zhu, S. L., Liu, Y., y Yang, X. J. 2011. Silver nanoparticles supported on TiO₂ nanotubes as active catalysts for ethanol oxidation. *Journal of Catalysis*, **278**(2), 276–287. Elsevier Inc. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcat.2010.12.011>

- Linares, N., Serrano, E., Rico, M., Balu, A. M., Losada, E., Luque, R., y García-Martínez, J. 2011. Incorporation of chemical functionalities in the framework of mesoporous silica. *Chemical Communications*, **47**(32), 9024-9035. <https://doi.org/10.1039/C1CC11016K>
- Lionas, V., Georgakopoulos, T., Todorova, N., Karapati, S., Pomoni, K., y Trapalis, C. 2018. Electron transport in surface modified TiO₂ nanoparticles. *Materials Science in Semiconductor Processing*, **83**(February), 63–69. Retrieved from doi:10.1016/j.mssp.2018.04.012
- López-Zamora, L., Martínez-Martínez, H. N., y González-Calderón, J. A. 2018. Improvement of the colloidal stability of titanium dioxide particles in water through silicon based coupling agent. *Materials Chemistry and Physics*, **217**(June), 285–290. Elsevier. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2018.06.063>
- Luque, R., Balu, A. M., Campelo, J. M., Gonzalez-Arellano, C., Gracia, M. J., Luna, D., y Romero, A. A. 2009. Tunable shapes in supported metal nanoparticles: From nanoflowers to nanocubes. *Materials Chemistry and Physics*, **117**(2), 408-413. DOI: 10.1016/j.matchemphys.2009.06.010
- Martín Gago, J. Á., y Serena Domingo, P. A. (2009). De la Nanociencia a la Nanotecnología: en las fronteras de la Física del Estado Sólido. Real Sociedad Española de Física. *Temas de Física*, 1, 1–7.
- Martínez Martínez, H. N. 2017. Modificación química de nanopartículas de dióxido de titanio para mejorar las propiedades de las películas de quitosano-almidón. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Orizaba. México.
- Mendoza, G., y Rodríguez L., J. L. 2007. La nanociencia y la nanotecnología: una revolución en curso. *Perfiles Latinoamericanos*, **29**, 161–186. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=11502906>
- Meng, Y., Yao, C., Xue, S., y Yang, H. 2014. Application of fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy in determination of microalgal compositions. *Bioresource Technology*, **151**, 347–354. Elsevier Ltd. Retrieved from doi:10.1016/j.biortech.2013.10.064

- Montgomery, D. C. 2017. Design and analysis of experiments. John Wiley & Sons.
- Muneer, U., Michael, I. O., Auwal, S. A. y Abubakar, G. S. 2020. Thermo gravimetric analysis (TGA) of PA6/G and PA6/GNP composites using two processing streams. *Journal of King Saud University - Engineering Sciences.*, **1**(1), <https://doi.org/10.1016/j.jksues.2020.09.003>
- Nageswara, T., Babji, P., Ahmad, N., Ahmad, R., Hassan, I., Ali, S., y Mabood, F. 2019. Green synthesis and structural classification of *Acacia nilotica* mediated-silver doped titanium oxide (Ag/TiO_2) spherical nanoparticles : Assessment of its antimicrobial and anticancer activity. *Saudi J. Biol. Sci.*, **26**(7), 1385-1391. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.09.005>
- Natarajan, S., Bhuvaneshwari, M., Lakshmi, D. S., Mrudula, P., Chandrasekaran, N., y Mukherjee, A. 2016. Antibacterial and antifouling activities of Chitosan/ TiO_2/Ag NPs nanocomposite films against packaged drinkin water bacterial isolates. *Environmental Science and Pollution Research*, **1**(July), 1–13. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-016-7102-6>
- Natarajan, S., Lakshmi, S., Thiagarajan, V., Mrudula, P., Chandrasekaran, N., y Mukherjee, A. 2018. Antifouling and anti-algal effects of chitosan nanocomposite (TiO_2/Ag) and pristine (TiO_2 and Ag) films on marine microalgae *Dunaliella salina*. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, **6**(6), 6870–6880. Elsevier B.V. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.10.050>
- Pham, T., y Lee, B. 2015. Disinfection of *Staphylococcus aureus* in indoor aerosols using Cu – TiO_2 deposited on glass fiber under visible light irradiation. “*Journal of Photochemistry & Photobiology, A: Chemistry*,” **307**–308, 16–22. Elsevier B.V. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotochem.2015.04.002>
- Pineda, A., Balu, A. M., Campelo, J. M., Romero, A. A., Carmona, D., Balas, F. y Luque, R. 2011. A dry milling approach for the synthesis of highly active nanoparticles supported on porous materials. *ChemSusChem*, **4**(11), 1561-1565. DOI: 10.1002/cssc.201100265

- Piqué, T. M., y Vázquez, A. 2012. Uso de espectroscopía infrarroja con transformada de fourier (FTIR) en el estudio de la hidratación del cemento. *Concreto y cemento. Investigacion y desarrollo*, **3**(2), 62–71.
- Posadas Estevez, B. V. 2017. Biosíntesis y caracterización de NPs de Ag con *Eysenhardtia polystachya* (palo azul) y su inhibición sobre el crecimiento de *Clostridium* sp. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma del Estado de México. México.
- Qiao, B., Wang, T., Gao, H., y Jin, Y. 2015. High density silanization of nano-silica particles using γ -aminopropyltriethoxysilane (APTES). *Applied Surface Science*, **351**, 646–654. Elsevier B.V. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.05.174>
- Qiu, C., Asgari, P., Mao, X. J., Jeon, J. y Schug K. A. 2020. Gas chromatography-vacuum ultraviolet spectroscopic analysis of organosilanes. *Talanta*, **223**(Part 2), 121781. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121781>
- Quintili, M. 2012. Nanociencia y Nanotecnología... un mundo pequeño. *Centro de Estudios en Diseño y Comunicación*, **42**, 125–155.
- Quiñones-Jurado, Z. V., Waldo-Mendoza, M. Á., Aguilera-Bandin, H. M., Villabona-Leal, E. G., Cervantes-González, E., y Pérez, E. 2014. Silver Nanoparticles Supported on TiO_2 and Their Antibacterial Properties: Effect of Surface Confinement and Nonexistence of Plasmon Resonance. *Materials Sciences and Applications*, **5**(1), 895–903. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.4236/msa.2014.512091>
- Rao, T., Babji, P., Ahmad, N., Khan R., Hassan, I., Shahzad, S., y Husain, F. 2019. Green synthesis and structural classification of *Acacia nilotica* mediated-silver doped titanium oxide (Ag/TiO_2) spherical nanoparticles: Assessment of its antimicrobial and anticancer activity. *Saudi Journal of Biological Sciences*, **26**(7), 1385-1391. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.09.005>
- Rodríguez, M. A., Rubio, J., Rubio, F., Liso, M. J. y Oteo, J. L. 2001. Reacción del γ -aminopropiltriethoxisilano (γ -APS) con partículas de pizarra. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*. **40**(2):101-107.

- Rodríguez-Ángeles, G. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli. Salud pública de México, **44**(5), 464–475. Retrieved from <http://www.insp.mx/salud/index.html>
- Rueda-Gordillo, F., y Hernández-Solís, S. 2008. Prevalencia de Candida albicans aislada de la cavidad oral de pacientes con cáncer. Revista Odontológica Latinoamericana, **0**(2), 38–41. Retrieved from <http://www.odontologia.uady.mx/revistas/rol/pdf/V00N2p38.pdf>
- Salerno, M., Landoni, P., y Verganti, R. 2008. Designing foresight studies for Nanoscience and Nanotechnology (NST) future developments. Technological Forecasting and Social Change, **75**(8), 1202–1223. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.techfore.2007.11.011>
- Seders Dietrich, L. A., Sahu, M., Biswas, P., y Fein, J. B. 2012. Experimental study of TiO₂ nanoparticle adhesion to silica and Fe (III) oxide-coated silica surfaces. Chemical Geology, **332–333**, 148–156. Elsevier B.V. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemgeo.2012.09.043>
- Seery, M. K., George, R., Floris, P., y Pillai, S. 2007. Silver doped titanium dioxide nanomaterials for enhanced visible light photocatalysis. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, **189**(2007), 258-263. doi:10.1016/j.jphotochem.2007.02.010.
- Shi, D., Yang, H., y Xue, X. 2020. Preparation, Characterization and Antibacterial Properties of Cobalt doped Titania Nanomaterials. Chinese Journal of Chemical Engineering, **28**(5), 1474-1482. <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2020.03.017>
- Smart, L. y Moore, E. 2005. Solid state chemistry. CRC Press Taylor & Francis Group. New York
- Smith, K. P. y Kirby, J. E. 2019. Rapid Susceptibility Testing Methods. Clinics in Laboratory Medicine, **39**(3), 333-344. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2019.04.001>
- Sudha, P. N., Sangeetha, K., Vijayalakshmi, K., y Barhoum, A. 2018. Nanomaterials history, classification, unique properties, production and market. In A. Barhoum y A. S. Hamdy M. (Eds.), Emerging Applications of Nanoparticles

- and Architectural Nanostructures (1st ed., pp. 341–384). Elsevier Inc. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-51254-1/00012-9>
- Thuy, T., Tran, T., Ha, T., Vu, T., y Nguyen, H. T. 2013. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Tithonia diversifolia* leaf extract and their antimicrobial activity. *Materials Letters*, **105**, 220–223. Elsevier. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2013.04.021>
 - Tri, P. N., Rtimi, S. y Ouellet, C. M. 2019. Nanomaterials-Based Coatings. Fundamentals and Applications. Matthew Deans. Chennai, India
 - Vallejo-Montesinos, J., Gámez-Cordero, J., Zarraga, R., Pérez Pérez, M. C., y González-Calderón, J. A. 2019. Influence of the surface modification of titanium nanodots deposition and its effect under the properties of starch-chitosan (SC) films. *Polymer Bulletin*, **1(0123456789)**, 1–27. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s00289-019-02740-z>
 - Vallejo, W., Díaz U., C., Navarro, K., Valle, R., Arboleda, J. W., y Romero, E. 2016. Estudio de la actividad antimicrobiana de películas delgadas de dióxido de titanio modificado con plata. *Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, **40(154)**, 69–74. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.18257/raccefyn.289>
 - Vargas Urbano, M. A., Ochoa Muñoz, Y. H., Ortegón Fernández, Y., Mosquera, P., Rodríguez Páez, J. E., y Camargo Amado, R. J. 2011. Nanopartículas de TiO₂, fase anatasa, sintetizadas por métodos químicos. *Ingeniería & Desarrollo*, **29(2)**, 186–201. ISSN 0122-3461
 - Velázquez-Meza, M. E. 2005. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinoresistente. *Salud pública de México*, **47(5)**, 381–387. Retrieved from doi:47:381-387
 - Vimal, R. P., Rajesh, N. P. y Vandana, J.R. 2013. Kinetic Parameter Estimation of Lignite by Thermo-gravimetric Analysis. *Procedia Engineering*, **51(2013)**, 727-734. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2013.01.104>
 - Wahyuni, E. T., Roto, R., Novarita, D., Suwondo, K. P., y Kuswandi, B. 2019. Preparation of TiO₂/AgNPs by photodeposition method using Ag(I) present in

- radiophotography wastewater and their antibacterial activity in visible light illumination. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, **7**(2019), 2213-3437. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103178>.
- Wang, S., Wen, S., Shen, M., Guo, R., Cao, X., Wang, J. y Shi, X. 2011. Aminopropyltriethoxysilane-mediated surface functionalization of hydroxyapatite nanoparticles: synthesis, characterization, and in vitro toxicity assay. *International Journal of Nanomedicine*. **6**:3449–3459. DOI: 10.2147/IJN.S27166
 - Xu, L., Li, Q., Myers, M., Chen, Q., y Li, X. 2019. Application of nuclear magnetic resonance technology to carbon capture, utilization and storage: A review. *Journal of Rock Mechanics and Geotechnical Engineering*, **11**, 892-908. Elsevier B.V. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.jrmge.2019.01.003>
 - Zanella, R. 2012. Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño. *Mundo Nano, Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Tecnologías*. **5**(1):69-81. DOI: 10.22201/ceiich.24485691e.2012.1.45167
 - Zendejas-Manzo, G. S., Avalos-Flores, H., y Soto-Padilla, M. Y. 2014. Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Rev Biomed*, **25**(3), 129–143. Retrieved from <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb142534.pdf>
 - Zhang, Y., y Erkey, C. 2006. Preparation of supported metallic nanoparticles using supercritical fluids: a review. *The Journal of supercritical fluids*, **38**(2), 252-267. DOI: 10.1016/j.supflu.2006.03.021
 - Zhao, J., Milanova, M., Warmoeskerken, M. M. C. G., y Dutschk, V. 2012. Surface modification of TiO₂ nanoparticles with silane coupling agents. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **413**, 273–279. Elsevier B.V. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.11.033>

