

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica



**“SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE
PLATA Y ORO IMPREGNADAS EN CELULOSA BACTERIANA
CON APLICACIÓN ANTIMICROBIANA”.**

Tesis presentada por la Bachiller:

Marquez Cazorla, Jessica Ingrid

para optar el Título Profesional de:

Ingeniera Biotecnóloga

Asesores: PhD. Pereira da Costa, Luiz

PhD. Villanueva Salas, José

ARCAJU – BRASIL / AREQUIPA - PERÚ

2018

UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica

Expediente N°. 20170000024662
N° Trámite en Fac. 345-2017
Fecha Recep. Fac. 07-06-2017

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL

DE: **MARQUEZ CAZORLA, Jessica Ingrid**

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO BIOTECNOLOGO

"SINTESIS Y CARACTERIZACION DE NANOPARTICULAS DE PLATA Y ORO IMPREGNADAS
EN CELULOSA BACTERIANA CON APLICACIÓN ANTIMICROBIANA"

DICTAMINADORES: 1) *Mgter. Fredy Molina Rodríguez* 2) *Ing. Cinthia Córdova Barrios*

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, el Jurado Dictaminador del Plan de Tesis informa que, hechas las observaciones y subsanadas las correcciones, consideramos se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad

FIRMAS:  

(Devolver antes de 8 días hábiles) FECHA 19-06-17

ASESOR: *Dr. José Villanueva Salas*

DICTAMEN ASESORÍA: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como asesor del trabajo de investigación presentado por la recurrente, tengo a bien informar que se ha verificado el cumplimiento de los objetivos y redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes por lo cual considero que se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad
Atentamente

FIRMA 

FECHA 21/12/17

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) *Q. F. Mercedes Jave Márquez* 3) *Ing. Cinthia Córdova Barrios*
2) *Dr. Fredy Molina Rodríguez*

DICTAMEN FINAL: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, atendiendo a su designación como Dictaminadores del presente Borrador de Tesis y luego de hechas las observaciones y correcciones pertinentes, cumpliendo con las exigencias mínimas establecidas para un trabajo de investigación de Tesis profesional, es que consideramos APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.


FIRMA   

(Devolver antes de 15 días hábiles) FECHA 19/03/18

JURADOS: PRESIDENTE
VOCAL
SECRETARIO

FECHA 28/03/18 HORA 19.00

LOCAL C-402

FIRMA DEL DECANO 

FECHA 21/03/18

Dedicatoria

A Dios por ser la fuerza que siempre me guía y haberme permitido seguir adelante y lograr concluir este proyecto. Y a la virgen por llenarme con sus bendiciones.

A mis padres Walter y Josefina; por su amor su trabajo y sacrificios en todos estos años, gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí y convertirme en lo que soy.

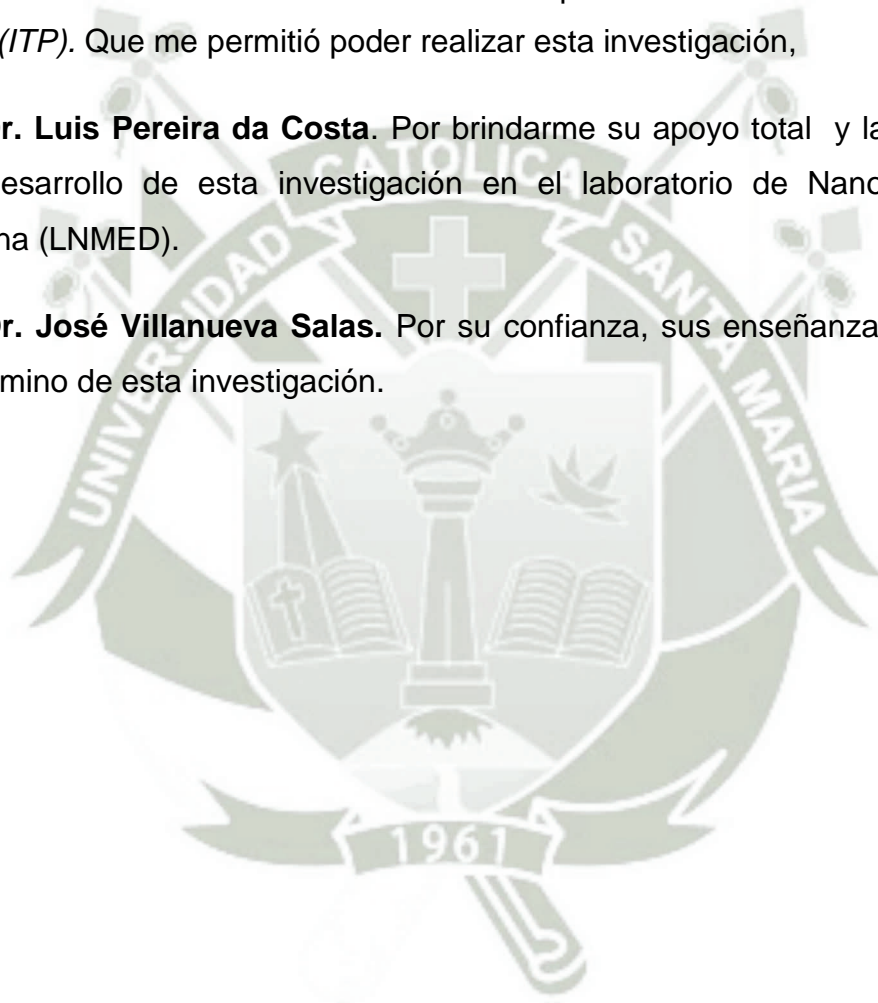
Agradecimientos

A la Universidad Católica Santa María. Especialmente a mi Programa Profesional de Ingeniería Biotecnológica; por inculcarme los conocimientos y valores para poder desarrollarme como una profesional de éxito.

A la Universidad de Tiradentes. En especial al *Instituto de Tecnología y Pesquisa (ITP)*. Que me permitió poder realizar esta investigación,

Al Dr. Luis Pereira da Costa. Por brindarme su apoyo total y la oportunidad para el desarrollo de esta investigación en el laboratorio de Nanotecnología y Biomedicina (LNMED).

Al Dr. José Villanueva Salas. Por su confianza, sus enseñanzas y su apoyo para el término de esta investigación.





RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se aisló y caracterizó bioquímica y molecularmente una cepa de *Gluconacetobacter* a partir de una fuente biológica Kombucha para la producción de celulosa bacteriana.

Posteriormente se verificó la capacidad de biosíntesis de celulosa bacteriana y fueron evaluadas las condiciones de cultivo para aumentar su capacidad de producción, para lo cual se realizó una serie de cultivos estáticos en los siguientes medios: Medio de Ácido Acético-Etanol Rutherford (RAE), Levadura-Peptona-Manitol (YPM) y Agar nutritivo, determinándose que la mayor producción de la celulosa se da en medio RAE en cultivo estático por 10 días a 30 °C con una producción de celulosa de 9.17 g/L. Seguidamente se adicionó por separado a las capas de celulosa bacteriana Nitrato de plata y Cloruro de oro, para la obtención de nanopartículas de plata y oro por reducción del Nitrato de plata y Cloruro de oro con Borohidruro de sodio, para luego obtener el nanocompuesto de la celulosa bacteriana y las nanopartículas de plata y oro por el método de inmersión, dando como resultado nanopartículas de plata y oro de un tamaño de 10 a 14 nm.

Se comprobó la efectividad antimicrobiana in vitro de los nanocompuesto obtenidos utilizando dos bacterias patrones: Staphylococcus aureus (Gram positiva), Pseudomona aeruginosa (Gram negativa) y realizando la prueba de concentración mínima inhibitoria, obteniéndose como resultado que la concentración mínima inhibitoria de plata para la eliminación de Staphylococcus aureus fue 40 $\mu\text{g/mL}$ y para Pseudomona aeruginosa fue 60 $\mu\text{g/mL}$ y la concentración mínima inhibitoria de oro para la eliminación de Staphylococcus aureus fue 1.76 $\mu\text{g/mL}$ y para Pseudomona aeruginosa fue 1.76 $\mu\text{g/mL}$.

Finalmente, las membranas de celulosa bacteriana impregnadas con las nanopartículas fueron caracterizadas estructuralmente mediante microscopía electrónica de barrido, espectroscopia FT-IR y espectroscopia UV-visible.

Palabras Claves: Gluconacetobacter, Celulosa Bacteriana, Medio RAE, Nanopartículas, Nitrato de plata, Cloruro de oro.



ABSTRACT

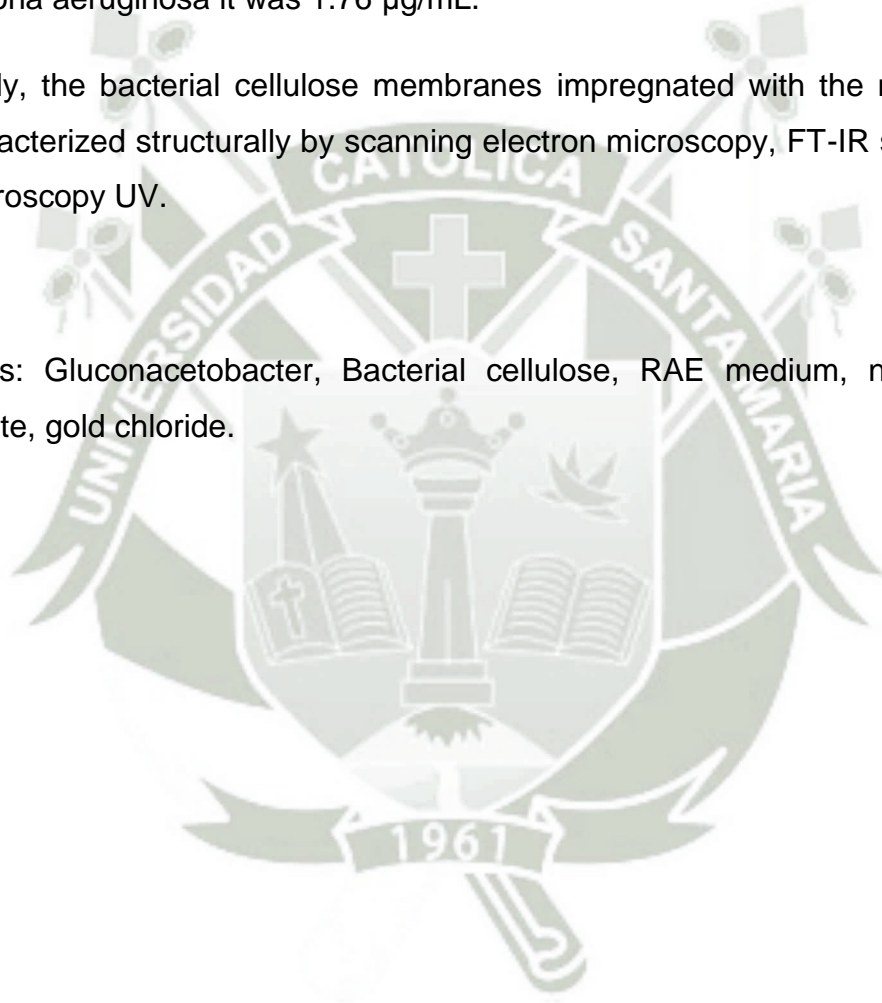
In the present work of investigation a strain of *Gluconacetobacter* was isolated and characterized biochemistry and molecularly from a biological source Kombucha for the production of bacterial cellulose.

Subsequently, the capacity of bacterial cellulose biosynthesis was verified and it was used for the evaluation of the conditions of the crop to increase its production capacity, for which a series of static cultures was carried out in the following media: Acetic Acid-Ethanol Rutherford (RAE)), Yeast-Peptone-Mannitol (YPM) and nutritive agar, determining that the highest and best production of cellulose occurs in the RAE medium in the static culture for 10 days at 30 °C with a cellulose production of 9.17 g/L. Next, it was added separately to the bacterial cellulose layers. Silver nitrate and gold chloride, for obtaining silver and gold nanoparticles, with the reduction of silver nitrate and gold chloride with sodium borohydride, to then obtain the nanocomposite of bacterial cellulose and silver nanoparticles and gold by the immersion method, resulting in silver and gold nanoparticles with a size of 10 to 14 nm.

The in vitro antimicrobial effectiveness of the nanocomposites using the bacterial standards was tested: *Staphylococcus aureus* (Gram positive), *Pseudomonas aeruginosa* (Gram negative) and performing the inhibition test of the minimum concentration, obtaining as a result that the minimum inhibitory concentration of the silver for the elimination of *Staphylococcus aureus* was 40 $\mu\text{g/mL}$ and for *Pseudomonas aeruginosa* it was 60 $\mu\text{g/mL}$ and the minimum gold inhibiting concentration for the elimination of *Staphylococcus aureus* was 1.76 $\mu\text{g/mL}$ and for *Pseudomonas aeruginosa* it was 1.76 $\mu\text{g/mL}$.

Finally, the bacterial cellulose membranes impregnated with the nanoparticles were characterized structurally by scanning electron microscopy, FT-IR spectroscopy and spectroscopy UV.

Key words: *Gluconacetobacter*, Bacterial cellulose, RAE medium, nanoparticles, silver nitrate, gold chloride.



ÍNDICE DE CONTENIDO

Introducción.....	xvi
Hipótesis.....	xvii
Objetivos.....	xviii
CAPÍTULO I.....	1
1. Marco Teórico.....	1
1.1. Kombucha.....	1
1.2. Celulosa.....	3
1.3. Celulosa Bacteriana.....	5
1.4. Género <i>Gluconacetobacter xylinum</i> : El Organismo Modelo.....	7
1.4.1. Características de la Género <i>Gluconacetobacter</i>	8
1.5. Biosíntesis de Celulosa Bacteriana.....	9
1.6. Técnicas de Fermentación.....	11
1.6.1. Cultivo Agitado	11
1.6.2. Cultivo Estático.....	12
1.7. Efecto de la Composición del Medio de Cultivo Sobre la Producción de Celulosa Bacteriana	13
1.7.1. Medio RAE	13
1.7.2. Medio YPM.....	14
1.7.3. Agar Nutritivo.....	14
1.8. Efecto de las Condiciones de Cultivo Sobre las Propiedades de la Celulosa Bacteriana	14
1.8.1. Temperatura.....	14
1.8.2. pH.....	15
1.8.3. Tiempo de Incubación.....	16
1.9. Cinética de Crecimiento Microbiano.....	16
1.9.1. Curva de Crecimiento	17
1.10. La Nanotecnología y la Nanociencia.....	18
1.10.1. Historia de la Nanotecnología	19

1.11. Las Leyes del Universo Nanométrico.....	20
1.12. Tipos de Nanotecnología.....	20
Top-Down.....	20
Bottom-Up.....	21
1.12.1. Metodologías para la síntesis de nanopartículas.....	21
1.12.2. Métodos de síntesis Top-Down.....	23
1.12.3. Métodos de síntesis Bottom-Up.....	24
1.13. Nanopartículas de Plata.....	31
1.13.1. Aplicaciones de las Nanopartículas de Plata.....	31
1.13.2. Toxicidad de las Nanopartículas de Plata.....	32
1.13.3. Factores Intrínsecos en la Toxicidad de Nanopartículas de Plata.....	32
1.14. Nanopartículas de Oro	33
1.14.1. Aplicaciones Terapéuticas del Oro.....	34
1.14.2. Aplicaciones Terapéuticas de las Nanopartículas de Oro....	35
1.14.3. Características de las Nanopartículas de Oro.....	37
1.15. Impacto Social de la Nanotecnología.....	38
CAPÍTULO II.....	40
2. Materiales y Métodos.....	40
2.1. Lugar de Ejecución.....	40
2.1.1. Ubicación.....	40
2.1.2. Aspectos Técnicos.....	40
2.1.3. Actividades que Realiza el LNMed.....	41
2.2. Materiales.....	41
2.2.1. Material Biológico.....	41
2.2.2. Material de Vidrio	41
2.2.3. Instrumentos y Equipos.....	42
2.2.4. Medios de Cultivo	43

2.2.5. Reactivos Químicos.....	43
2.2.6. Otros Materiales.....	44
2.3. Métodos.....	44
2.3.1. Obtención de la Muestra Kombucha.....	44
2.3.2. Preparación del Té de Kombucha.....	45
2.3.3. Aislamiento de Cepa.....	45
2.3.4. Características de los Microorganismos.....	45
Caracterización Macroscópica.....	45
Caracterización Microscópica.....	46
Caracterización Bioquímica.....	46
Caracterización Molecular.....	47
2.3.5. Identificación Microbiológica de Celulosa.....	49
2.3.6. Pre-Inóculo.....	49
2.3.7. Inóculo y Condiciones de Cultivo	49
2.3.8. Dosaje de ácido acético.....	50
2.3.9. Determinación de la Producción de Celulosa.....	50
2.3.10. Curva de Crecimiento Microbiana	51
2.3.11. Planteamiento Experimental.....	51
2.3.12. Incorporación y Reducción de Nitrato de Plata (AgNO_3) y Cloruro de Oro (AuCl_3)	51
2.3.13. Caracterización Estructural de la Celulosa Producida.....	54
2.3.14. Evaluación de la Actividad Antimicrobiana.....	55
CAPÍTULO III.....	57
3. Resultados y Discusiones.....	57
3.1. Preparación del Té de Kombucha.....	57
3.2. Caracterización de las Cepas.....	58
Caracterización Macroscópica.....	58
Caracterización Microscópica.....	60

Caracterización Bioquímica.....	61
Caracterización Molecular.....	65
3.3. Identificación Microbiológica de celulosa bacteriana.....	66
Hidrólisis enzimática de celulosa	66
3.4. Cultivo de los microorganismos para producción de celulosa.....	67
3.5. Inóculo y condiciones de cultivo	69
Determinación de la Mejor Condición de Cultivo.....	69
Determinación de la Producción de Celulosa de las bacterias B1 y B3 en las diferentes Condiciones de Cultivo.....	69
Concentración del Inóculo.....	69
3.6. Evaluación de las condiciones de cultivo.....	70
Temperatura y Tiempo de Incubación.....	70
Dosaje de Ácido Acético.....	71
Curva de crecimiento	72
3.7. Incorporación y Reducción de la Sal Nitrato de Plata a las Membranas de Celulosa Bacteriana	74
3.7.1. Síntesis de las Nanopartículas de Plata.....	76
3.8. Incorporación de Cloruro de Oro a las Membranas de Celulosa Bacteriana	77
3.8.1. Síntesis de las Nanopartículas de Oro.....	78
3.9. Caracterización Estructural de la Celulosa Bacteriana.....	79
3.9.1. Infrarrojo.....	79
3.9.2. Microscopía en la Electrónica de Barrido.....	80
3.10. Caracterización Estructural de las Nanopartículas de Plata.....	81
3.10.1. Evaluación de la Presencia de las Nanopartículas Obtenidas por UV Visible	81
3.10.2. Evaluación de la Presencia de las Nanopartículas Obtenidas por Infrarrojo	83
3.10.3. Evaluación de la presencia de las Nanopartículas Obtenidas por Microscopía Electrónica de Barrido.....	86
3.11. Caracterización Estructural de las Nanopartículas de Oro.....	88
3.11.1. Evaluación de la Presencia de las Nanopartículas Obtenidas por UV Visible	88

3.11.2. Evaluación de la Presencia de las Nanopartículas Obtenidas por Infrarrojo	90
3.11.3. Evaluación de la presencia de las Nanopartículas Obtenidas por Microscopía Electrónica de Barrido.....	92
3.12. Actividad Antimicrobiana.....	95
3.12.1. Test de Concentración Mínima Inhibitoria.....	95
CAPÍTULO IV.....	101
Referencias Bibliográficas.....	103
Anexos.....	110

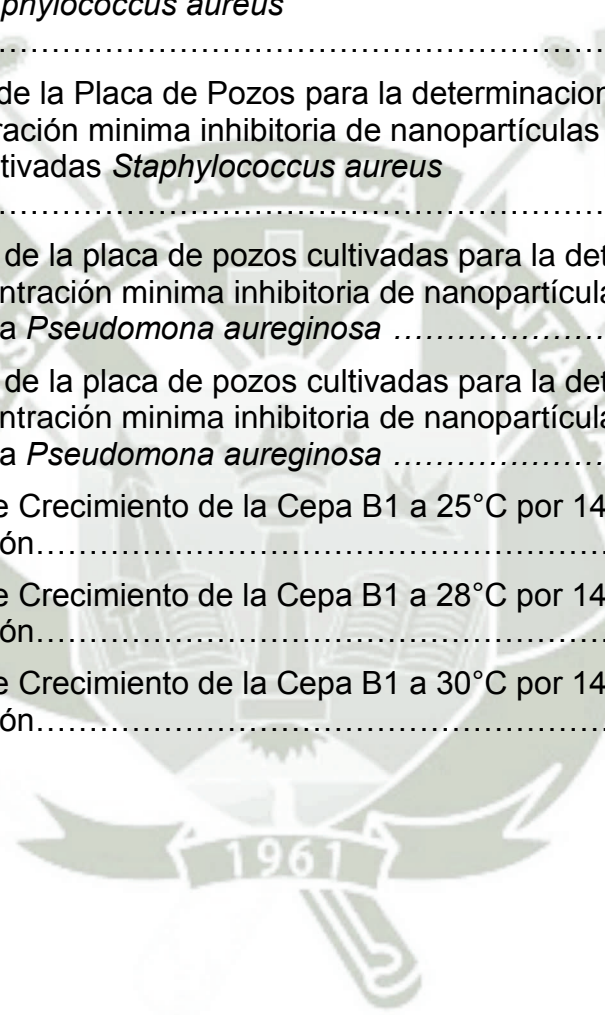


ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Kombucha	1
Figura 2. A. Estructura molecular de la Celulosa Bacteriana. B. Microestructuras de Celulosa Bacteriana. 1 Cadena Lineal de Celulosa Bacteriana. 2 Microfibrilla de Celulosa Bacteriana. 3 Paquete de Microfibrillas.....	3
Figura 3. Interconversión de los Polimorfos de la Celulosa	4
Figura 4. Microfotografía de <i>Gluconacetobacter xylinum</i>	8
Figura 5. Biosíntesis de Celulosa Bacteriana	10
Figura 6. Formación de la Celulosa y su Excreción al Medio de Cultivo a través de la Membrana Celular del Microorganismo <i>Acetobacxter xylinum</i>	11
Figura 7. Gráfica Log de la Concentración Celular vs Tiempo	18
Figura 8. Representación Gráfica de los Tipos de Nanotecnología. A. Top-Down (Reducción de Tamaño) .B. Bottom-Up (Auto Ensamblado).....	22
Figura 9. Aplicaciones Terapéuticas de las Nanopartículas de Oro.....	37
Figura 10. Esquema dela Micro placa Utilizada en la Dilución de las Nanopartículas	56
Figura 11. Recipiente con el Cultivo de Kombucha a los 15 Días	57
Figura 12. Colonias de los Microorganismos Aislados en Medio RAE	58
Figura 13. Colonias de los Microorganismos Aislados en Medio YPM	59
Figura 14. Colonias de los Microorganismos Aislados en Medio Agar Nutritivo.....	59
Figura 15. Tinción de Gram donde se Puede Apreciar los Bacilos Gram Negativos (B1, B3, B4) y el Bacilo Gram Positivo (B2). A. Tinción de los Microorganismos del Medio RAE. B. Tinción de los Microorganismos del Medio Agar Nutritivo.....	61
Figura 16. A. Prueba de Oxidasa Positiva y Negativa. B. Prueba de Oxidasa Positiva	62
Figura 17. A..Medio SIM donde se Aprecie Motilidad y Prueba de Indol Positiva y Negativa B.Fermentacion de glucosa.C.Crecimineto en Medio YPM.....	64
Figura 18. Gel del Producto Amplificado del Gen 16S rRNA de las Bacterias aisladas de la Kombucha.....	65

Figura 19. Gel del Producto Amplificado del Gen 16S acsAB de las Bacterias aisladas de la Kombucha	66
Figura 20. Membranas de Celulosa Bacteriana formadas por las Bacterias B1 y B3 A.Cultivo de Cepa B1 y B3 en Medio de Cultivo RAE.B. Cultivo de Cepa B1 y B3 en Medio de cultivo YPM.....	67
Figura 21. Cultivo de Cepa B1 y B3 en Medio de Cultivo Agar Nutritivo.....	68
Figura 22. Efecto en las Condiciones de Cultivo	71
Figura 23. Relación en la producción de Ácido Acético y pH.....	72
Figura 24. Curva de crecimiento de la cepa B1 a 30°C por 14 días de incubación.....	73
Figura 25. Efecto de las condiciones de cultivo en la producción de celulosa bacteriana	74
Figura 26. Película de Celulosa Bacteriana Producida por la Cepa B1 en Cultivo RAE.....	75
Figura 27. Membrana de Celulosa Bacteriana Sumergida en Solución de 100mM.....	76
Figura 28. Membrana de Celulosa Bacteriana Tratada con Borohidruro de Sodio.....	77
Figura 29. Membranas de Celulosa Bacteriana a Concentraciones 0,441 mM y 0,736 mM	78
Figura 30. Espectro FT-IR de la Celulosa Bacteriana	79
Figura 31. Imagen MEB de Celulosa	80
Figura 32. Espectro UV-Vis Nanopartículas de Plata Sintetizadas	82
Figura 33. Espectro FT-IR de las Nanopartículas a concnetracion.A.20mM y B. 40mM	84
Figura 34. A Espectro FT-IR de las Nanopartículas a 60mM. B. Espectro FT-IR de las Nanopartículas a 100mM	85
Figura 35. Imágenes Obtenidas por MEB, Nanopartículas de Plata.A 20mM ...	86
Figura 36. Imágenes Obtenidas por MEB, Nanopartículas de Plata.A 40mM.B.60 mM	87
Figura 37. Imágenes Obtenidas por MEB, Nanopartículas de Plata.A 100mM .	88
Figura 38. Espectro UV-Vis Nanopartículas de Oro Sintetizadas	90
Figura 39. A. Espectro FT-IR de las Nanopartículas A.0.441mM. B. Espectro FT-IR de las Nanopartículas a 0.736 mM	91

Figura 40. Espectro FT-IR de las Nanopartículas a 1.472mM	92
Figura 41. Imagen Obtenida por Microscopía Electrónica de Barrido de Nanopartículas de Oro a Concentración 0.442mM	93
Figura 42. Imágenes Obtenidas por Microscopía Electrónica de Barrido, Nanopartículas de oro. A. Nanopartículas de Oro a Concentración 0.736 mM B. Nanopartículas de Oro a Concentración 1.472mM....	94
Figura 43. Imagen de la Placa de Pozos Cultivadas para la determinacion de la concentración minima inhibitoria de nanopartículas de plata y oro para <i>Staphylococcus aureus</i>	97
Figura 44. Imagen de la Placa de Pozos para la determinacion de la concentración minima inhibitoria de nanopartículas de plata y oro para Cultivadas <i>Staphylococcus aureus</i>	98
Figura 45. Imagen de la placa de pozos cultivadas para la determinacion de la concentración minima inhibitoria de nanopartículas de plata y oro para para <i>Pseudomona aureginosa</i>	100
Figura 46. Imagen de la placa de pozos cultivadas para la determinacion de la concentración minima inhibitoria de nanopartículas de plata y oro para para <i>Pseudomona aureginosa</i>	101
Figura 47. Curva de Crecimiento de la Cepa B1 a 25°C por 14 días de Incubación.....	144
Figura 48. Curva de Crecimiento de la Cepa B1 a 28°C por 14 días de Incubación.....	144
Figura 49. Curva de Crecimiento de la Cepa B1 a 30°C por 14 días de Incubación.....	145



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Propiedades Físicoquímicas de la Celulosa (Ing. invest. Y tecnol. 2011).....	5
Tabla 2.	Clasificación de los Principales Géneros Productores de Celulosa Bacteriana (Jonas and Farah, 1998, modified).....	7
Tabla 3.	Clasificación de los Microorganismos según su Temperatura.....	15
Tabla 4.	Clasificación de los Microorganismos según su pH.....	16
Tabla 5.	Condiciones Cultivo	50
Tabla 6.	Características Macroscópicas de las Colonias de Bacterias	60
Tabla 7.	Características Microscópicas de las Colonias de Bacterias	60
Tabla 8.	Resultados de las Pruebas Bioquímicas Realizadas	63
Tabla 9.	Identificación Molecular de los Microorganismos aislados de la Kombucha.....	65
Tabla 10.	Resultado Producción Preliminar de CB	68
Tabla 11.	Concentración del Inóculo en cel/ mL	70
Tabla 12.	Cuadro de Concentración y Biomasa para un Tiempo y Volúmen determinado.....	73
Tabla 13.	Espectros UV-Vis Obtenidos en la Síntesis de Nanopartículas de Plata Realizadas	82
Tabla 14.	Posición de los Picos de Absorción de Nanopartículas de Plata de Diferente Tamaño en el Espectro UV-Vis	83
Tabla 15.	Espectros UV-Vis Obtenidos en las Síntesis de Nanopartículas de Oro Realizadas	89
Tabla 16.	Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria de las Nanopartículas de Plata y Oro en la Bacteria Gram Positiva	96
Tabla 17.	Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria de las Nanopartículas de Plata y Oro en la Bacteria Gram Negativa	99

ABREVIATURAS

- CB Celulosa bacteriana
- CMI Concentración mínima inhibitoria
- AuNPs Nanopartículas de Oro
- AgNPs Nanopartículas de Plata
- ADN Acidó desoxirribonúleico
- MEB Microscopía electrónica de barrido
- EDX Energy dispersive X-ray
- IF-TR Infrarrojo con transformada de Fourier
- NPs Nanopartículas
- BAA Bacterias productoras de ácido acético
- UV Espectroscopía UV-Visible
- PIE Punto isoeléctrico

INTRODUCCIÓN

La Kombucha, conocida popularmente como “té de hongos”, es una bebida fermentada originaria del noreste de china con un gran consumo debido a sus propiedades terapéuticas, conocido como uno de los muchos tónicos naturales.

Kombucha es un nombre en inglés designado para un consorcio gelatinoso de levaduras y bacterias productoras de ácido acético, con el crecimiento del cultivo de Kombucha se forma una película celulósica en la superficie del medio. La celulosa bacteriana es un bio-producto del metabolismo de la glicólisis y es producida por algunas cepas del género *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Gluconacetobacter*, *Rhizobium*, *Sarcina*, entre otras. Entre los géneros mencionados *Gluconacetobacter* es la fuente más conocida de celulosa bacteriana debido a su habilidad de producir altos niveles del polímero a partir de diversas fuentes de carbono y nitrógeno en medios de cultivo.

Actualmente la celulosa bacteriana puede tener nuevas aplicaciones en el área médica puesto que es biocompatible, lo que hace de este material ideal para su aplicación en quemaduras, regeneración celular en caso de traumas mecánicos o úlceras crónicas, gracias a que funciona como un sustituto temporal de tejido y es permeable a gases.

La nanotecnología es un término que engloba el conjunto de ciencias y técnicas que se aplican a escala atómica, molecular y macromolecular. En los últimos años, la evolución en el desarrollo de productos elaborados a partir de nanotecnología ha experimentado un espectacular crecimiento. La nanotecnología ha cambiado la perspectiva funcional de los materiales empleados en la medicina, ofreciendo éstos una mejor funcionalidad debido principalmente a su tamaño manométrico.

Las nanopartículas para propósitos medicinales se definen como las partículas coloidales sólidas con un rango de tamaño de 1 a 1.000 nm. Consisten de materiales macromoleculares y se pueden usar terapéuticamente también como transportadores de fármacos en los cuales el principio activo (fármaco o material activo biológicamente)

está disuelto, entrampado o encapsulado, o en el cual el principio activo está adsorbido o enlazado covalentemente. Un ejemplo son las nanopartículas de plata que exhiben diferentes propiedades una vez aplicadas a los sistemas biológicos. Actualmente, la nano plata es el nano material más utilizado, representando aproximadamente la cuarta parte de todos los nanos materiales comercializados en el mercado, en comparación con los sistemas tradicionales de tratamiento.

Es bien conocido que la plata y el oro tienen propiedades antimicrobianas muy potentes. El tamaño nanométrico les confiere la habilidad para penetrar distintas membranas biológicas como la pared bacteriana, incrementando su efecto bactericida, mejorando así las propiedades que presentan estas sales inorgánicas en soluciones y reduciendo el riesgo del problema de toxicidad. De los diferentes tipos de síntesis que se emplean para el desarrollo de las nanopartículas, los métodos físicos tienen la ventaja de ser capaces de producir grandes cantidades de nanopartículas, a su vez, tienen la desventaja de no tener un suficiente control sobre el tamaño de la partícula, produciendo Nanopartículas con un amplio rango de tamaño que pueden originar un efecto poco controlable y predecible cuando es administrado en un sistema biológico. De esta manera, los métodos de síntesis química coloidal tienen la capacidad de sintetizar nanopartículas uniformes con un tamaño de partícula estrecho.

Además de tener todavía mucho por investigar en este campo, todas estas propiedades y características le confieren a la nanotecnología médica amplia visión y competitividad como biomaterial.



HIPÓTESIS

Si las nanopartículas de plata y oro presentan características antimicrobianas es posible que al estar adheridas a una capa de celulosa bacteriana le confieran actividad antimicrobiana.

OBJETIVOS

General

Sintetizar y caracterizar nanopartículas de plata y oro impregnadas en celulosa bacteriana con aplicación antimicrobiana.

Específicos

1. Aislar, caracterizar e identificar el microorganismo productor de celulosa presente en el té de Kombucha.
2. Evaluar el efecto de las condiciones de cultivo en la producción de celulosa bacteriana a partir del microorganismo identificado de la fuente biológica Kombucha.
3. Impregnar y reducir el Nitrato de plata y Cloruro de oro en películas de celulosa bacteriana.
4. Evaluar la actividad antimicrobiana de las películas de celulosa impregnadas con nano partículas.

Capítulo I: Marco Teórico

1.1 Kombucha.

La Kombucha, es una bebida fermentada conocida popularmente como “té de hongos” por ser una simbiosis de levaduras y bacterias productoras de ácido acético cultivadas en té negro endulzado. Las levaduras fermentan el azúcar del té negro endulzado a etanol y dióxido de carbono, los cuales son oxidados a acetaldehído, el cual es convertido a ácido acético por las bacterias. La glicólisis es también usada por las bacterias del ácido acético para sintetizar celulosa bacteriana ^[1]. El pH bajo y la presencia de metabolitos antimicrobianos reducen la aparición de bacterias, levaduras y hongos filamentosos contaminantes posiblemente patógenos ^[2]. Durante el proceso fermentativo, se forma una masa cremosa en la superficie de la solución del té tomando la forma del recipiente, como se observa en la Fig. 1. Después de una semana a diez días el cultivo original “madre” produce una segunda camada de crecimiento muchas veces llamada de cultivo “bebé”. Simultáneamente el té fermentado, produce una bebida carbonatada levemente ácida, con sabor a sidra ^[3].



Figura 1. Kombucha.

Tomado de: ‘The Kombucha consortia of yeast and bacteria’, de Jarrel, J. (2000).USA ^[2].

Las bacterias excretan una matriz mucilaginosa en la cual las levaduras están insertadas en grupos distintos, la mayor parte de la masa gelatinosa macroscópica es celulosa microbiana. La estructura de las fibras de celulosa protege a los microorganismos de varios “estrés” [4]. En la temperatura correcta, se multiplican continuamente. Primero se expande por toda la superficie y enseguida engrosa [5] hasta alcanzar una capa gruesa.

Existen diversas fuentes sobre la composición microbiana de la Kombucha y los diferentes metabolitos del té negro. Investigaciones en relación a la composición química del té de Kombucha se tornan complicadas por el hecho que su composición varía no solamente por la variedad del té utilizado sino también por el método de preparación, tiempo de fermentación y el tipo de hongo utilizado [3]. El análisis del líquido fermentado revela la presencia del ácido acético, láctico y gluconico como los principales compuestos químicos. El ácido gluconico es considerado el principal agente terapéutico de la Kombucha, actuando en el hígado como un agente de desintoxicación. La actividad antimicrobiana está relacionada a la presencia de ácido úsnico, ácido acético, bacteriocinas y compuestos fenólicos. Compuestos aromáticos también están presentes como el alcohol, aldehídos, cetonas, ésteres y aminoácidos [2].

Las bacterias más comúnmente envueltas en la fermentación de la Kombucha son las bacterias de la familia *Acetobacteraceae*, bacterias productoras de ácido acético (BAA), especialmente el género *Gluconacetobacter*, dentro del cual la especie *Gluconacetobacter xylinus* es el mayor productor de celulosa dentro de los microorganismos conocidos, también hay otros géneros que han sido aislados de la Kombucha como *Gluconobacter* y *Lactobacillus*. Estas variaciones pueden ser debido a las condiciones climáticas, geográficas, culturales y a las especies salvajes, locales o debido a la contaminación cruzada entre los cultivos, por lo tanto no es posible establecer una composición microbiana exacta para la Kombucha. También han sido relatadas variaciones en las especies durante el proceso de fermentación [2]. Varias especies de levaduras también han sido aisladas de la Kombucha dentro de las familias *Saccharomyces*, *Cándida* y *Kloeckera* como: *Pichia*, *Saccharomycoides*, *Schizosaccharomyces*, *Torulospora* y *Zygosaccharomyces* [2].

1.2 Celulosa.

La celulosa es la más abundante macromolécula orgánica de la tierra, aproximadamente 10^{11} toneladas de celulosa son producidas y destruidas anualmente, siendo las plantas vasculares los mayores productores de celulosa [6]. Además de las plantas, la biosíntesis de celulosa también ocurre en muchos grupos de algas, hongos, protozoarios, bacterias (incluyendo a las cianobacterias) y a los tunicados del reino animal [7]. La celulosa es un polímero de residuos de glucosa unidos por enlaces covalentes entre los carbonos 1 y 4 (β_{1-4}) formando así una cadena lineal, las cadenas lineales normalmente se asocian o cristalizan por puentes de hidrógeno y por fuerzas de Vander Waals. Cuando estas cadenas de puente de hidrógeno se asocian en un número de al menos diez conforman una estructura denominada microfibrilla de celulosa [8]. Como se aprecia en la Fig. 2.

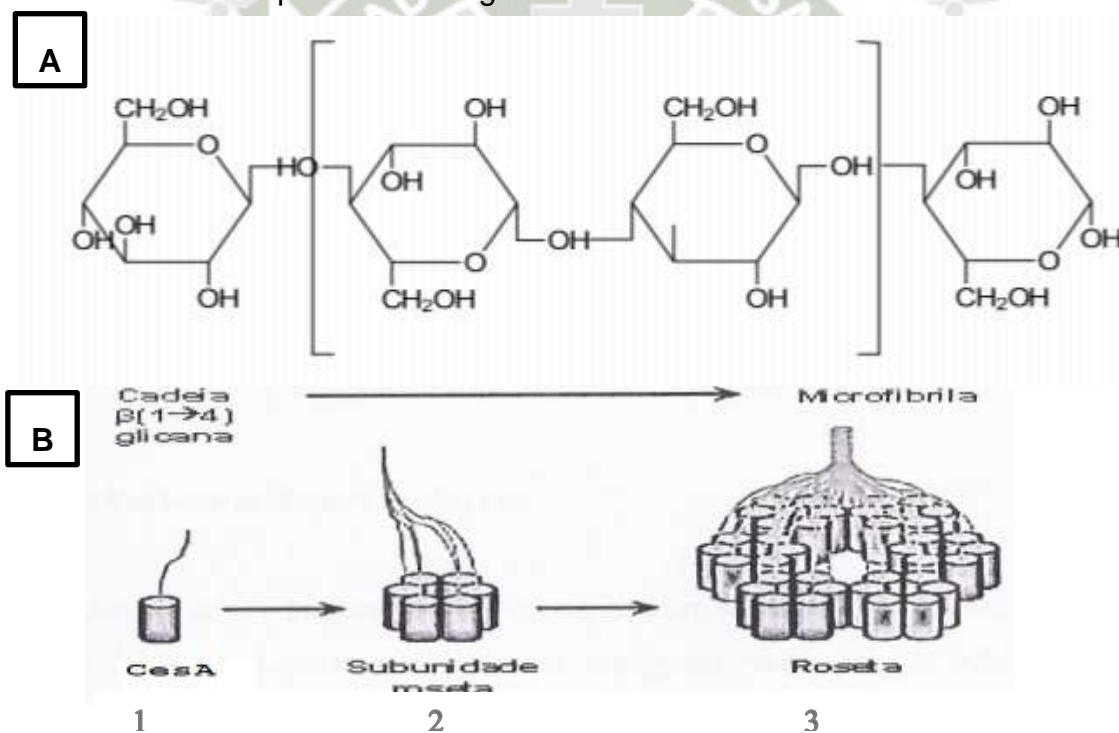


Figura 2. A. Estructura molecular de la celulosa bacteriana. B. Microestructuras de celulosa. 1. Cadena lineal de celulosa. 2. Microfibrilla de celulosa. 3. Paquete de microfibrillas.

Tomado de: 'Produção de celulosa bacteriana', de Recouvreux, D. (2014). Brasil [20].

La microfibrilla de celulosa posee una estructura que alterna entre regiones muy ordenadas (cristalinas) y regiones menos ordenadas (amorfas), la mayor parte de

ocasiones una muestra contiene más de estas formas. Es así que existen cuatro diferentes tipos: tipo I, II, III, IV que pueden ser convertidas unas en otras^[9].Fig. 3.

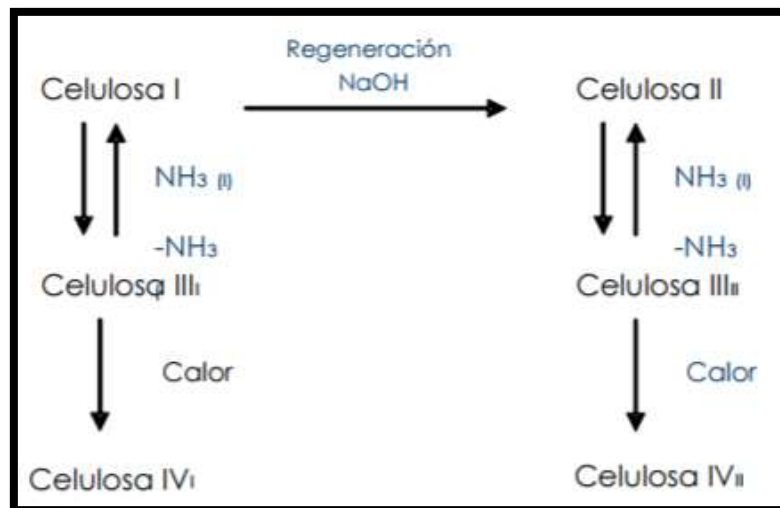


Figura 3. Interconversión de los polimorfos de la celulosa.

Tomado de: 'Celulosa: La estructura se deshace lentamente', O 'Sullivan, A. (1997).Reino Unido^[8].

De las configuraciones existentes la celulosa I y la celulosa II son las más importantes mientras que la III y la IV existen en consecuencia de tratamientos específicos de la celulosa con amoníaco o aminas y glicerol respectivamente.

La estructura de la celulosa I, también conocida como celulosa nativa, se encuentra en una mayor proporción dentro de la naturaleza, coexiste bajo la mezcla de formas cristalinas $I\alpha$ (a) y $I\beta$. Las dos estructuras varían en el modo en el que sus cadenas se unen por enlaces de puentes hidrógeno, la celulosa $I\alpha$ se convierte por calor en celulosa $I\beta$ siendo la segunda más estable. La tipo II es obtenida mediante tratamiento de la celulosa tipo I con solución acuosa alcalina o mediante disolución y regeneración. La transformación de celulosa II a celulosa I no se conoce por lo que podemos decir que es termodinámicamente más estable^[10]. La celulosa $I\alpha$ y la $I\beta$ difieren en relación a su estado cristal, la conformación molecular y puentes de hidrógeno y son estas diferencias que influyen en las propiedades físicas de la celulosa, las cuales podemos observar en la Tabla 1. La celulosa de algunas algas y bacterias es rica en $I\alpha$ en cuanto que la celulosa del algodón, de la madera y de los tunicados son ricas en $I\beta$ ^[7].

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de la celulosa.

Propiedad (unidad)	Valor
Fórmula semi desarrollada	$(C_6H_{10}O_5)_n$
Masa molecular(Kg/Kmol)	160-560
Densidad(Kg/m ³)	1.27-1.61
Punto de fusión(°C)	260-270
Solubilidad	Insoluble en agua
Degradación(°C)	≥270
pH	6.0-8.0

Nota. Tomado de: 'Produção de celulosa bacteriana', de Recouvreux, D. (2014). Brasil^[20].

1.3 Celulosa Bacteriana.

La celulosa bacteriana es un producto extracelular que fue descrito por Brown por primera vez en 1886 donde expuso su descubrimiento de una película que se formaba en las superficies de las fermentaciones acéticas, que por medio de diferentes ensayos identificó como celulosa, así gracias a la habilidad de formar celulosa “la planta del vinagre”, del griego *Xylinalina*, que significa tejido de madera^[11].

Fue también descrita por Louis Pasteur como “una película gelatinosa y escurridiza”. La porción sólida, que es semejante a un gel, es menor a 1% y es extremadamente pura porque no contiene lignina ni otras sustancias mezcladas con la celulosa^[12]. La celulosa bacteriana pertenece a productos del metabolismo primario y es principalmente un recubrimiento protector, mientras que en las plantas la celulosa (PC) desempeña un papel estructural. La celulosa es sintetizada por bacterias que pertenecen a distintos géneros *Acetobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium* y *Sarcina*^[13].

Sus productores más eficientes son bacterias Gram negativas, bacterias ácido acéticas, específicamente las bacterias pertenecientes al género *Gluconacetobacter xylinum*, que se ha aplicado como microorganismo modelo para estudios básicos y aplicados en celulosa ^[14]. Las investigaciones se han centrado en el mecanismo de síntesis de biopolímeros, así como en su estructura y propiedades, que determinan el uso práctico ^[15].

Una de las más importantes características de la celulosa bacteriana es su pureza química, que distingue esta celulosa de la de celulosa vegetal, usualmente asociadas con hemicelulosa y la lignina, cuya remoción es inherentemente difícil, debido a las propiedades únicas, desde la estructura reticulada ultrafina, la celulosa bacteriana ha encontrado una multitud de aplicaciones en las industrias del papel, textil y alimentos y como biomaterial en cosmética y medicina ^[16].

Una aplicación más amplia de este polisacárido depende obviamente de la escala de producción y su costo. Por lo tanto, los estudios básicos se centran en investigaciones que mejoren el desarrollo del proceso de producción. La celulosa vegetal y la celulosa bacteriana son químicamente semejantes (cadenas β -1,4 glicano) pero difieren en cuanto al grado de polimerización, 13000 a 14000 celulosa vegetal y 2000 a 6000 celulosa bacteriana ^[17] y en cuanto al diámetro de las redes reticuladas que en la celulosa bacteriana, es de aproximadamente 1 centésimo del diámetro de las fibras de celulosa de origen vegetal. La celulosa bacteriana posee una estructura cristalina, microfibrillas en forma lineal (las dos unidades de celobiosa están dispuestas en paralelo), confiriendo a las moléculas de celulosa una orientación plana y el diámetro de las redes reticuladas son menores que 100 angstrom.

Estas características confieren a la celulosa bacteriana propiedades peculiares como: elevada pureza química (libre de lignina y hemicelulosas), alta fuerza de tensión, elevada cristalinidad, elevada capacidad de retención y absorción de agua, elasticidad, durabilidad, además de esto es biodegradable, biocompatible, atóxica y no alergénica ^[18]. La clasificación de los principales productores de celulosa bacteriana se presenta a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2. Clasificación de los principales géneros productores de celulosa bacteriana.

Género	Estructura de celulosa	Función biológica
<i>Acetobacter</i>	Pila extracelular Compuesto de cintas	Mantener el microorganismo en función aeróbico
<i>Achromobacter</i>	Fibrillas	Floculación en aguas residuales
<i>Aerobacter</i>	Fibrillas	Floculación en aguas residuales
<i>Agrobacterium</i>	Fibrillas cortas	Fijar en los tejidos de las plantas
<i>Alcaligenes</i>	Fibrillas	Floculación en aguas residuales
<i>Pseudomonas</i>	Sin fibrillas distintas	Floculación en aguas residuales
<i>Rhizobium</i>	Fibrillas cortas	Fijar en los tejidos de las plantas
<i>Sarcina</i>	Celulosa amorfa	Desconocido
<i>Zoogloea</i>	No bien defina	Floculación en aguas residuales

Nota. Tomado de: 'Producción y aplicación de celulosa bacteriana', de Jonas, R. (1998). España ¹¹.

1.4 Género *Gluconacetobacter xylinum*: El organismo modelo.

Esta bacteria es el arquetipo para el estudio de biogénesis de celulosa bacteriana, ya que el producto es de alta pureza y de estructura similar a la de origen vegetal. Las ventajas obvias para manipulación y estudio del proceso de biosíntesis, han hecho de *Gluconacetobacter xylinum* un modelo único. *Gluconacetobacter xylinum*, que realiza la

oxidación incompleta de diversos azúcares y alcoholes (proceso conocido como fermentación oxidativa). Su hábitat natural son frutas y vegetales en proceso de descomposición; es capaz de producir celulosa bacteriana sobre medios líquidos y sólidos formando una “película” o “nata” sobre la superficie.

La película de celulosa bacteriana funciona como mecanismo de “flotación”, permitiéndole a *Gluconacetobacter xylinum* estar en la interfase aire/líquido para obtener con mayor facilidad el O₂ necesario para su crecimiento. La película es una barrera física que protege a la bacteria de la radiación UV, aumenta la capacidad de colonizar sustratos y su carácter altamente higroscópico le permite retener humedad previniendo la desecación del sustrato^[18]. Fig. 4.

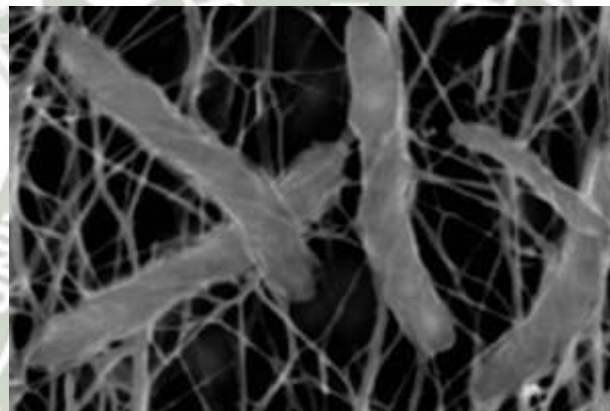


Figura 4. Microfotografía de *Gluconacetobacter xylinum*.

Tomado de: ‘Effective cellulose production by a coculture of *Gluconacetobacter xylinus* and *Lactobacillus mali*.’, de Seto, A. (2006).Japón^[3].

1.4.1. Características del género *Gluconacetobacter*.

Elas producen ácido acético en presencia de oxígeno. El intervalo de la temperatura óptima de reproducción está entre 15 °C y 34 °C. Otra propiedad interesante de las cepas de *Gluconacetobacter xylinum* es su tolerancia a condiciones ácidas, siendo capaces de crecer en valores de pH menores a 5.0. Estas cepas son también aeróbicas obligatorias, bacilos Gram negativos, bastonados elipsoidales, rectos o ligeramente curvos, móviles o no, catalasa positiva (son capaces de descomponer el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en agua

(H₂O) y oxígeno (O₂), incapaces de liquificar gelatina y no reducen nitratos ni nitritos (bioquímica). La temperatura de muerte térmica de estas cepas esta entre los 65 °C y 70 °C. Las cepas producen y excretan celulosa extracelularmente en forma de película (agregado de microfibrillas celulósicas) en la interfase aire líquido del medio de cultivo en cultivo estático^[19].

1.5 Biosíntesis de Celulosa Bacteriana.

Para la biosíntesis de celulosa bacteriana dos vías anfibólicas importantes operan en esta bacteria: el ciclo de las Pentosas fosfato y el ciclo de Krebs. El primero participa en la oxidación de carbohidratos mientras el segundo oxida ácidos orgánicos. La glucólisis no es operante debido a la carencia en la enzima fosfofructocinasa 1, que es responsable de la conversión de fructosa-6-fosfato a fructosa-1,6- bifosfato. La bacteria es capaz de producir glucosa de *novo* a partir de sustratos como glicerol, citrato y otros intermediarios del ciclo de Krebs mediante gluconeogénesis y puede convertir hexosas fosfato (fructosa, manosa) a glucosa- 6-fosfato, para la síntesis del polisacárido^[8].

La biosíntesis de celulosa en bacterias es un proceso que ocurre a través de varias etapas, que envuelve varias enzimas y un operón (un conjunto de genes que se encuentran funcionalmente relacionados contiguos y controlados coordinadamente, siendo todos estos expresados en apenas un RNA mensajero denominado *BCS* (Bacterial Cellulose Synthesis)). Este operón codifica enzimas y proteínas que componen una asociación para la polimerización de la glucosa y la formación de celulosa, siendo conservado entre varias especies de bacterias Gram negativas^[15]. Las bacterias del género *Gluconacetobacter* producen celulosa a partir de fuentes de carbono como glucosa, sacarosa, glicerol, manitol o arabitol. La síntesis de celulosa consta de dos etapas principales: la primera es la conversión de la fuente de carbono en uridin difosfato glucosa (UPD- glucosa), que es el sustrato usado para producir la celulosa; la segunda etapa es la formación de la celulosa y su excreción al medio del cultivo^[16]. La primera etapa inicia con el ingreso del sustrato al microorganismo y su conversión a glucosa-6-fosfato por la enzima glucoquinasa, con la participación de una molécula de adenosina trifosfato (ATP) y liberando una molécula de adenosina

difosfato (ADP); posteriormente, la glucosa-6-fosfato pasa a glucosa-1-fosfato por la acción de la enzima fosfoglucomutasa. En el siguiente paso, la glucosa-1-fosfato es convertida en UDP-glucosa en presencia de la enzima UDPG pirofosforilasa; finalmente, por la acción de la enzima celulosa sintasa, que es la encargada de realizar la polimerización de la glucosa, formándose la celulosa ^[15]. La segunda etapa es la polimerización de la glucosa seguida de la excreción de la celulosa al medio de cultivo. La membrana celular del microorganismo posee una serie de poros de 3.5 nm alineados diametralmente. En la cara interna de la membrana se encuentra el complejo enzimático celulosa-sintasa rodeando cada uno de los poros ^[20]. La celulosa es excretada al medio de cultivo como una subfibrilla elemental de 1.5 nm de longitud. Al juntar estas subfibrillas se forma una microfibrilla y la unión de estas microfibrillas produce las fibras de celulosa ^[8,21]. Fig. 5 y 6.

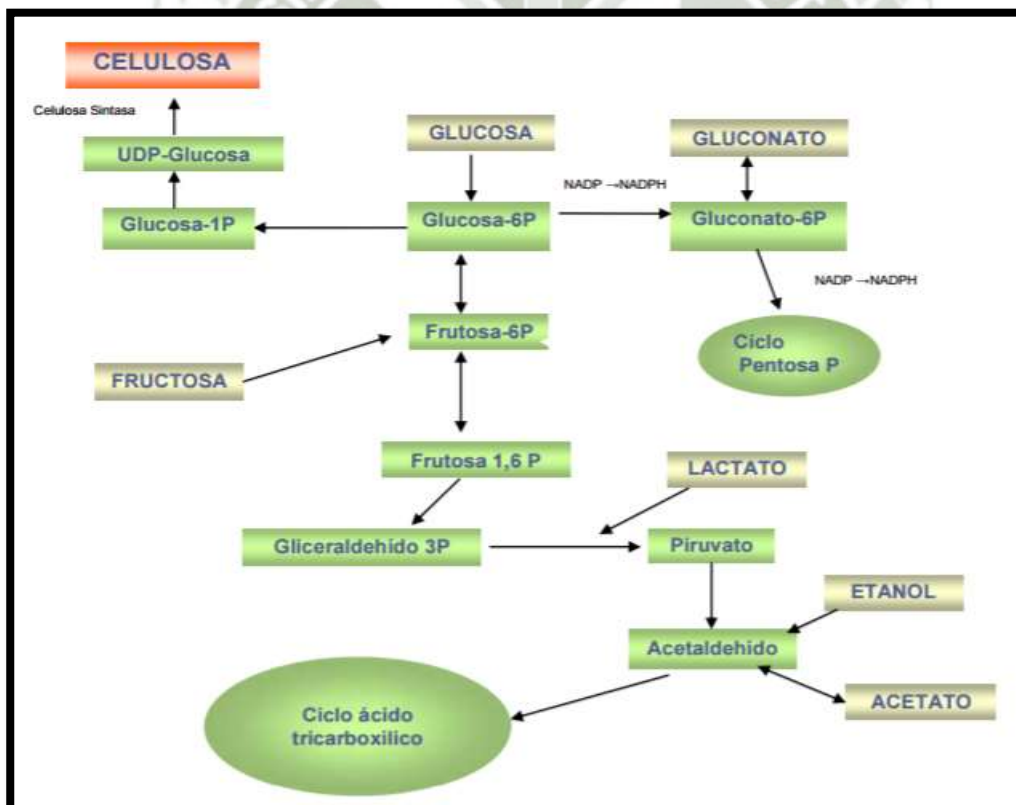


Figura 5. Biosíntesis de celulosa bacteriana.

Tomado de: 'Síntesis de celulosa por *Acetobacter xylinum*', de Hestrin, S. (1954).Israel^[21].

Aún no se conoce la razón por la cual los microorganismos producen la celulosa, se cree que es una estrategia de sobrevivencia, en el biofilm los nutrientes están más accesibles (la concentración es mayor que en el medio líquido) y para protegerse de los rayos ultravioleta, las variaciones de pH, presencia de sustancias tóxicas, metales pesados, reducción en la disponibilidad de agua y otros organismos patógenos [22].

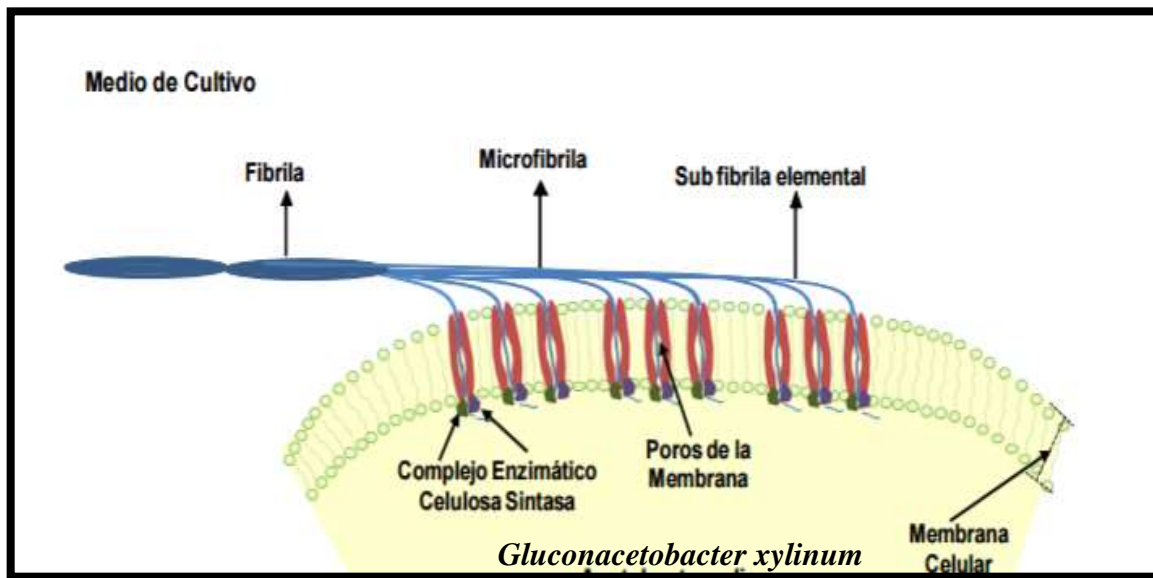


Figura 6. Formación de la celulosa y su excreción al medio de cultivo a través de la membrana celular del microorganismo *Gluconacetobacter xylinum*.

Tomado de: 'Síntesis de celulosa por *Acetobacter xylinum*', de Hestrin, S. (1954).Israel^[21].

1.6 Técnicas de Fermentación.

Las técnicas utilizadas para producir celulosa bacteriana son el cultivo estático y el agitado; en cada técnica se obtiene celulosa con morfología diferente. A continuación, se presentan las principales características de ambas técnicas.

1.6.1. Cultivo Agitado.

Al realizar las fermentaciones en cultivo agitado se pueden obtener pellets de celulosa o aglomeraciones amorfas de las fibras, los cuales dependen del tipo de reactor y condiciones de operación empleadas. Estos cultivos pueden realizarse por lotes o en continuo, en reactores de tanque agitado o airlift. El cultivo agitado se

investiga con miras a escalar el proceso a nivel industrial, pero las bajas productividades reportadas, menores que en cultivos estáticos, hacen que no sea fácil su escalamiento; la baja productividad obedece al hecho de que la agitación favorece el crecimiento de células no productoras de polímero que consumen el sustrato, denominadas celulosa(-); algunos autores atribuyen este fenómeno a mutaciones que lesionan la maquinaria enzimática encargada de la polimerización de la glucosa. Un inconveniente adicional que presenta este método de cultivo es la habilidad de las células de *Gluconacetobacter* para convertir la glucosa en ácidos glucónico y cetoglucónico, por lo que se consume la glucosa del medio en detrimento del rendimiento para la celulosa^[23-24].

1.6.2. Cultivo Estático.

En el cultivo estático la celulosa se obtiene en forma de gel, en el cual la celulosa es aproximadamente el 1% del peso total. Estudios realizados muestran que en un primer estado el microorganismo incrementa su población gracias al consumo de oxígeno disuelto que se encuentra en el medio de cultivo; durante este tiempo, el microorganismo sintetiza cierta cantidad de celulosa en el medio líquido. Sólo las bacterias que se encuentran cerca de la interfase aire/medio de cultivo y tienen disponibilidad de oxígeno, pueden mantener su actividad y producir celulosa, la cual forma capas superpuestas; a medida que transcurre el tiempo de fermentación, el espesor de la película se incrementa por la generación de nuevas capas en la superficie, formando una estructura de capas suspendidas en el medio de cultivo. La celulosa bacteriana sintetizada por el método estático se puede lograr a través de un proceso de uno o dos pasos. En el proceso de un solo paso el medio se inocula y luego se cultiva estáticamente por los días establecidos. En el método de dos pasos antes del cultivo estático se obtienen cepas con crecimiento masivo y de alta vitalidad a través de un cultivo con incubación aeróbica. Este proceso hará mejorar el rendimiento de celulosa y acortar el ciclo de fermentación. El principal inconveniente con las fermentaciones en cultivo estático es que se requiere de tiempos relativamente largos y un área superficial extensa, lo que no hace práctica su producción a gran escala^[24]. Bajo este concepto se busca mejorar

el rendimiento en la producción de celulosa en este tipo de cultivo, tomando en cuenta el ajuste de parámetros tales como diferentes medio de cultivo, pH, temperatura, tiempo de incubación.

1.7 Efecto de la Composición del Medio de Cultivo sobre la Producción de Celulosa Bacteriana.

La composición del medio de cultivo es variable acorde con la cepa utilizada en el sistema, para la producción de celulosa va a depender de una combinación óptima de nutrientes incluyendo carbono, nitrógeno, sales minerales. Pudiendo usar diferentes tipos de sustratos como glucosa, fructuosa, manitol, sacarosa y glicerol^[11]. El efecto de la concentración inicial de glucosa en la producción de celulosa es importante ya que la formación de ácido glucónico como un subproducto disminuye el pH del cultivo^[25].

El nitrógeno que representa entre el 12% y el 15% del peso seco. Es el constituyente principal de las proteínas y los ácidos nucleicos. La mayoría de las bacterias son capaces de usar el amonio como fuente de nitrógeno, mientras que otras pueden usar los nitratos. La adición de nitrógeno extra favorece la producción de la biomasa, pero disminuye la producción de celulosa^[26]. Es también estudiado el efecto del extracto de levadura en el crecimiento microbiano y la producción de celulosa en medios con diferentes fuentes carbono ya que es un componente rico en vitaminas especialmente del complejo B, aminoácidos y otros factores de crecimiento. El extracto de levadura se añade al medio en un rango de 5-10 g/L mientras que las fuentes de carbono esta alrededor de 25-40 g/L^[27].

En general podemos decir que no se ve afectada drásticamente la estructura, la morfología y las características de la celulosa bacteriana por la fuente de nutrientes.

1.7.1. Medio RAE.

Método descrito por Sokollek y Hammes, contiene glucosa 4% como fuente de carbono, peptona 1%, extracto de levadura 1%, fosfato de sodio dibásico 0.34%, ácido cítrico 0.14% y agar 2%.

1.7.2. Medio YPM.

Contiene extracto de levadura 0.5%, peptona 0.3%, manitol 2.5% y agar 2%.

1.7.3. Agar Nutritivo.

El agar nutritivo es un medio de cultivo usado normalmente como rutina para todo tipo de bacterias. Es muy útil porque permanece sólido incluso relativamente a altas temperaturas. Además, el crecimiento bacteriano en este agar se da en la superficie, por lo que se distinguen mejor las colonias pequeñas. Contiene peptona 0.5%, extracto de carne 0.3% y agar 2%.

1.8 Efecto de las Condiciones de Cultivo sobre las Propiedades de la Celulosa Bacteriana.

El crecimiento de los microorganismos se encuentra influenciado por varios factores. Entre ellos los más importantes son el tiempo de incubación, la temperatura, el pH y el requerimiento de O₂ ya que *Gluconacetobacter* es aeróbico obligado. Son las diferentes condiciones de cultivo que ocasionan las variaciones en el desarrollo de la biomasa y por lo tanto influyen directamente en la producción de celulosa bacteriana.

1.8.1. Temperatura.

Cada microorganismo tiene una temperatura óptima en la cual su crecimiento es más rápido; una temperatura mínima por debajo de la óptima y el microorganismo no se desarrolla, una temperatura máxima por encima de la óptima ocasiona que el crecimiento no sea posible, estas tres temperaturas se denominan temperaturas cardinales y son características de cada microorganismo. El rango de temperaturas entre las que un microorganismo puede crecer es variable, hay microorganismos con un rango estrecho llamados ESTENOTERMALLES y se encuentran en hábitat de temperatura relativamente constante.

Los microorganismos de rangos más amplios se encuentran en medios ambientales donde la temperatura varía considerablemente y éstos son llamados EURITERMALES^[28]. A continuación, en la Tabla 3 se muestra la clasificación de

los microorganismos según su temperatura de crecimiento^[30]. Se ha encontrado en estudios anteriores que a temperaturas elevadas, disminuye la fracción Ia de la celulosa, y que a temperaturas de 10 °C se presenta su máxima fracción de celulosa Ia. Sin embargo la cepa a esta temperatura tiene un crecimiento limitado, así como su producción de celulosa bacteriana, la cual se encuentra en su máximo a temperaturas cercanas a los 30 °C.

Tabla 3. Clasificación de los microorganismos según su temperatura de crecimiento.

Tipo de microorganismo	Temperatura mínima (°C)	Temperatura óptima (°C)	Temperatura máxima (°C)
Psicrófilo	-5+5	15	15-20
Mesófilo	5-15	37	35-47
Termófilo	40-45	60	60-90
Hipertermófilo	90	106	115

Nota. Tomado de: 'Metabolismo y Nutrición Microbiana', de Recouvreur, D. (2009).Brasil^[20].

1.8.2. pH.

La mayoría de los microorganismos se desarrollan mejor en medios con un pH neutro, aunque hay microorganismos que requieren medios más o menos ácidos. La presencia de ácidos o bases en cantidades que no impidan el crecimiento bacteriano modifican el pH del medio, pueden sin embargo alterar sus procesos metabólicos normales. La acidez o alcalinidad de un medio de cultivo se expresa por su pH. A continuación, en la Tabla 4 se muestra la clasificación de los microorganismos según su pH.

Para la mayoría de las bacterias el pH óptimo de crecimiento está entre 6.5 y 7.5 aun cuando algunas pocas especies pueden crecer en los extremos del rango de pH. Las levaduras y los mohos pueden crecer a valores de pH más bajos. Cuando se cultivan los microorganismos en un medio de cultivo originalmente ajustado a un pH dado de 7 por ejemplo, es probable que este pH cambié como resultado del metabolismo de esos microorganismos, el cambio de pH puede ser tan grande que eventualmente podría inhibir el crecimiento de esos microorganismos. Para mantener un pH relativamente constante durante el crecimiento microbiano, se le añaden sustancias buffer a muchos medios de cultivo [28].

Tabla 4. Clasificación de los microorganismos en relación al pH.

Tipo de microorganismo	Rango aproximado
Acidófilo	0-5.5
Neutrófilo	5.5-8
Alcalófilo	8.5-11.5

Tomado de: 'Produção de celulosa bacteriana', de Recouvreux, D. (2014).Brasil^[20].

1.8.3. Tiempo de Incubación.

El tiempo de incubación requerido para obtener un crecimiento bacteriano adecuado depende del tipo de bacteria que se va a cultivar, la mayoría de las bacterias crecen en un período de tiempo de 24 a 48 horas.

1.9 Cinética de Crecimiento Microbiano.

Se define crecimiento microbiano como un aumento en la cantidad de constituyentes y estructuras celulares, cuando hay crecimiento en ausencia de división

celular hay aumento en el tamaño y peso de la célula, visto desde un punto individual. Mientras que cuando el crecimiento es seguido de división celular hay un aumento en el número de células, visto desde un punto poblacional. Es importante distinguir entre el crecimiento de células individuales y el crecimiento de poblaciones, ya que en los microorganismos debido a su pequeño tamaño no se hacen estudios de crecimiento individual sino estudios de crecimiento de poblaciones.

El crecimiento de una población es el aumento del número de células como consecuencia de un crecimiento individual y posterior división. El crecimiento de una población ocurre de una manera exponencial. El crecimiento exponencial es una consecuencia del hecho de que cada célula se divide dando dos células hijas, las cuales al dividirse darán cada una dos células hijas, así es que en cada período de división la población se duplica. La velocidad del crecimiento es el cambio en el número de células o en la masa celular experimentando por unidad de tiempo^[30].

1.9.1. Curva de Crecimiento.

El crecimiento bacteriano es la división de una bacteria en dos células hijas en un proceso llamado fisión binaria.

En un sistema cerrado o cultivo en medio no renovado también conocido como cultivo monofásico se obtiene una curva de crecimiento. Esta curva de crecimiento puede dividirse en distintas fases llamadas: fase de latencia, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte. En la Fig. 7 se ilustra una curva de crecimiento microbiano dividida en sus 4 fases.

- Fase I (Fase Lag). Período de latencia o adaptación: No hay aumento significativo de la densidad celular, el crecimiento es asincrónico.
- Fase II (Fase Log). Período de crecimiento exponencial: El crecimiento es sincrónico y se alcanza la máxima velocidad de crecimiento.
- Fase III (Fase estacionaria). Período estacionario: No hay cambios significativos de la densidad celular con respecto al tiempo, existe un equilibrio entre los microorganismos vivos y muertos.

- Fase IV (Fase de muerte). Es la fase en la que el equilibrio desaparece y predominan los microorganismos muertos. No hay nutrientes para el recambio y las condiciones del medio de cultivo son adversas para el crecimiento ^[32].



Figura 7. Gráfica Log de la concentración celular vs tiempo.

Tomado de: 'Introducción a la Microbiología Médica', de Totoro, GJ. (2007). Ed. Médica Panamericana ^[30].

1.10 La Nanotecnología y la Nanociencia.

La nanociencia y la nanotecnología son un campo inter y multidisciplinario se presentan como un área nueva de investigación en el estudio de los materiales donde convergen diversas ramas del conocimiento que permiten estudiar fenómenos inéditos que ocurren a nivel atómico y molecular. El prefijo nano viene del griego enano y significa una milmillonésima parte de algo. La importancia de la nanotecnología radica en que en un mundo nanométrico los materiales pueden adquirir o realzar propiedades diferentes a las que tienen a escala macroscópica. Actualmente ya se encuentran algunas aplicaciones prácticas de la nanotecnología y se prevé que habrá muchas más, por lo cual es necesario evaluar el impacto que tendrían.

“La nanociencia y la nanotecnología son dos relativamente recientes disciplinas definidas en la escala de longitud donde científicos e ingenieros de múltiples campos descubren fascinantes fenómenos y aplicaciones y nos proveen con

nuevas y exquisitas herramientas para diseñar novedosos materiales y componentes en electrónica así como avances fundamentales en aplicaciones en la física, la química, la biología molecular, la medicina, el medio ambiente, las industrias químicas, las farmacéuticas”^[32].

“Nanociencia es el estudio de los fenómenos y la manipulación de materiales a escala nanométrica. Nanotecnología es el diseño, caracterización y aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas complejos mediante el control de la forma, el tamaño y las propiedades de la materia a escala nanométrica”^[33].

1.10.1. Historia de la Nanotecnología.

Las referencias iniciales a la nanotecnología fueron presentadas por Richard Feynman en 1959 considerado como el padre de la "nanociencia", premio Nobel de Física, el gran físico escribió un artículo en el cual vislumbro la posibilidad de manipular materiales a escala atómica y molecular, inspirando el desarrollo actual de la nanotecnología.

“Las leyes de la física, hasta donde yo puedo comprender, no nos prohíben la posibilidad de manipular la naturaleza átomo por átomo... no es un intento de violar ninguna ley; pero en la práctica, no se ha hecho porque somos muy grandes, los problemas de la química y la biología pueden ser en gran parte resueltos si nuestra habilidad para ver lo que estamos haciendo y para hacer cosas a nivel atómico finalmente es desarrollada”^[34].

El desarrollo de la nanotecnología finalmente no pudo ser evitado, fue así que años después el científico norteamericano Eric Drexler popularizó los potenciales de la nanotecnología molecular entre las décadas de los 70-80. Predijo además que la nanotecnología podría usarse para solucionar muchos de los problemas de la humanidad, pero también podría generar armas poderosas. Fue el científico japonés Norio Taniguchi de la Universidad de Ciencia de Tokio quien empleó por vez primera el término “nanotecnología” en una conferencia en 1974. Su definición era: “La nanotecnología consiste principalmente en el procesado,

separación, consolidación y deformación de materiales átomo por átomo, molécula por molécula”^[35].

1.11 Las Leyes del Universo Nanométrico.

Las leyes que rigen la materia a escala nanométrica son distintas a las de la escala macroscópica. Las reglas que permiten entender el comportamiento de este “nano universo” están dadas por las leyes de la mecánica cuántica, la cual determina las propiedades de la materia cuando se ubican en el rango de interés de las nanotecnologías. Algunos principios fundamentales de la mecánica cuántica son:

- El intercambio de energía entre átomos y partículas solo puede ocurrir en paquetes discretos llamados cuantos de energía.
- Las ondas de luz, bajo determinadas condiciones, se pueden comportar como partículas (fotones).
- En algunas circunstancias, las partículas se pueden comportar como ondas.
- Los cambios de geometría y de tamaño en un sistema o la alteración de las posiciones de los componentes provocan cambios significativos en la distribución o en el número de dichos niveles y da lugar a que las propiedades que caracterizan un objeto se transformen.

Este hecho es de gran importancia ya que determina cómo la materia modifica las propiedades que posee a nivel macroscópico cuando su volumen se va reduciendo^[35].

1.12 Tipos de Nanotecnología.

Actualmente se considera que existen dos tipos de nanotecnología, los cuales se encuentran a continuación representados en la Fig. 8.

Top-Down: Reducción de tamaño.

Literalmente desde arriba (mayor) hasta abajo (menor), los mecanismos y las estructuras se miniaturizan a escala nanométrica, este tipo de nanotecnología ha

sido el más frecuente hasta la fecha, más concretamente en el ámbito de la electrónica donde predomina la miniaturización de los componentes.

Bottom-Up: Auto ensamblado.

Literalmente desde abajo (menor) hasta arriba (mayor). Se comienza con una estructura nanométrica como una molécula y mediante un proceso de montaje o auto ensamblado, se crea un mecanismo mayor que el mecanismo con el que comenzamos. Este enfoque, que algunos consideran como el único y "verdadero" enfoque nanotecnológico, ha de permitir que la materia pueda controlarse de manera extremadamente precisa. De esta manera podremos liberarnos de las limitaciones de la miniaturización, muy presentes en el campo de la electrónica. Este último concepto irrumpió en 1986 cuando Eric Drexler propuso construir objetos más grandes a partir de sus componentes atómicos y moleculares. En la actualidad se usa la terminología de "Nanotecnología Molecular" para describir esta aproximación^[36].

1.12.1. Metodologías para la síntesis de Nanopartículas.

Uno de los objetivos centrales de la nanociencia es construir pequeñas estructuras para el diseño de materiales avanzados, nanodispositivos de alto rendimiento y miniaturización de dispositivos electrónicos. Las nanopartículas inorgánicas son particularmente atractivas como piezas de construcción para tales propósitos, debido a sus propiedades únicas, ópticas, electrónicas, magnéticas y catalíticas. Algunos autores coincidieron que muchas nanopartículas pueden ser moduladas simplemente cambiando su tamaño, forma o la funcionalización de la superficie de la nanopartícula, sin cambiar la composición del material^[38]. Hasta ahora se han realizado avances significativos utilizando estrategias de química húmeda para sintetizar nanopartículas de alta calidad, de una gran variedad de materiales inorgánicos incluyendo oro, plata, óxido de hierro y semiconductores.

La manipulación de las condiciones de síntesis permite el control racional de la morfología de las partículas y provee los medios para adaptar las propiedades de

los materiales durante el proceso de síntesis. Otro aspecto fundamental de la síntesis de nanopartículas es su estabilización, de tal manera que pueda mantenerse su tamaño y su forma en función del tiempo. Los avances en los procesos de síntesis han permitido el control preciso sobre los parámetros estructurales que gobiernan la formación de las nanopartículas lo que ha permitido adaptar las propiedades de estos átomos artificiales de acuerdo con su uso específico. La síntesis y el ensamblado modular de nanopartículas permiten explotar sus propiedades únicas, lo que puede llevar a nuevas aplicaciones en catálisis, electrónica, fotónica, magnetismo así como sensado químico y biológico. Los métodos de síntesis de nanopartículas suelen agruparse en dos categorías, las aproximaciones “de arriba hacia abajo” y las “de abajo hacia arriba” [37-38]. La primera consiste en la división de sólidos másicos en porciones más pequeñas. Este enfoque puede involucrar la molienda o el desgaste, métodos químicos y la volatilización de un sólido seguido por la condensación de los componentes volatilizados. La segunda aproximación, “de abajo hacia arriba”, consiste en la fabricación de nanopartículas a través de la condensación de átomos o entidades moleculares en una fase gaseosa o en solución.

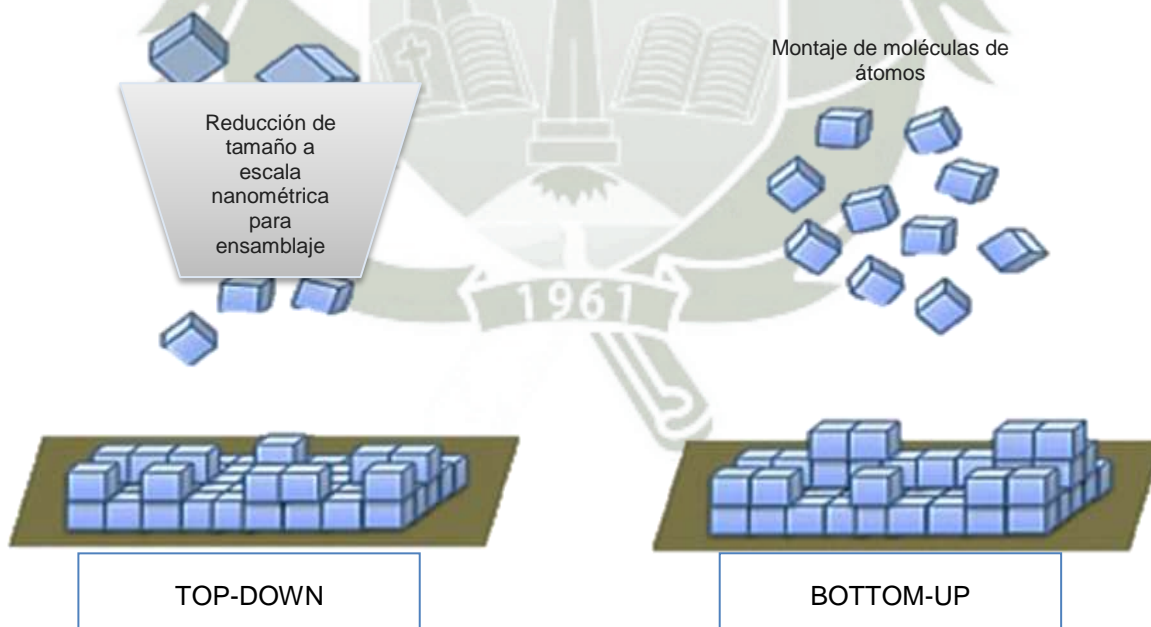


Figura 8. Representación gráfica de los tipos de nanotecnología.

Tomado de: 'Introduction to Technology', de Charles, P. (2003).USA [39].

1.12.2. Métodos de síntesis Top-Down.

Existen varios métodos que utilizan la aproximación “de arriba hacia abajo”, los más representativos son:

La evaporación térmica.

Consiste en el calentamiento hasta la evaporación del material que se pretende depositar. Se lleva a cabo en una cámara de vacío en la que se condensa el vapor sobre una lámina fría requiriendo en todo momento un control preciso de las condiciones de crecimiento para no producir una modificación de la morfología de la capa depositada.

El depósito químico en fase vapor (CVD).

Consiste en la descomposición de uno o varios compuestos volátiles, en el interior de una cámara de vacío (reactor), cerca de la superficie de un sólido para dar lugar a la formación de un material en forma de capa delgada o de nanopartículas.

La preparación de clusters gaseosos.

Utiliza un láser pulsado de alta potencia para producir vapores atómicos metálicos que son acarreados en un gas inerte y posteriormente son depositados en un óxido monocristalino u otro sustrato, bajo condiciones de ultra-alto vacío.

La implantación de iones.

Es un método que consiste en que los iones de un material pueden ser implantados en un sólido, cambiando por tanto las propiedades físicas y químicas de este último, ya que el ion implantado puede ser de un elemento distinto al que lo compone, también se pueden causar cambios estructurales en el sólido implantado, puesto que la estructura cristalina del objetivo puede ser dañada. El equipamiento necesario para la implantación de iones suele consistir en una fuente de iones que produce los iones del elemento deseado, un acelerador donde dichos iones son

electrostáticamente acelerados hasta alcanzar una alta energía, y una cámara donde los iones impactan contra el objetivo.

La molienda de partículas de tamaño macro o micrométrico.

Se realiza por medio de molinos de alta eficiencia; las partículas resultantes son clasificadas por medios físicos, recuperándose las de tamaño nanométrico. Dado que la molienda enérgica y continua de los materiales iniciales puede inferir cambios energéticos en los sólidos, debido a la acumulación de defectos en situación de no-equilibrio, lo que puede causar una disminución de las energías de activación, activando los sólidos para llevar a cabo reacciones químicas en estado sólido. La activación mecano química de sólidos cristalinos puede producir también alteraciones y cambios tanto texturales como estructurales, que pueden resultar de gran interés en el desarrollo de materiales ^[38,39].

Como puede constatarse en lo aquí descrito, varios de los métodos que utilizan la aproximación “de arriba hacia abajo”, salvo la molienda requieren de instrumentación compleja y complicada, lo cual los hace costosos, por tanto, muchas veces se prefieren los métodos que utilizan la aproximación “de abajo hacia arriba”.

1.12.3. Métodos de síntesis Bottom-Up.

Existen diversos métodos que utilizan la aproximación de “abajo hacia arriba” para la síntesis de nanopartículas, los más empleados son aquellos que utilizan procedimientos químicos. Por lo general, inician con la reducción de los iones metálicos a átomos metálicos, seguido por la agregación controlada de estos átomos. El método químico es el más conveniente para la obtención de nanopartículas uniformes y pequeñas. Los métodos más representativos de esta aproximación son:

El método coloidal.

Los coloides son partículas individuales, que son más grandes que las dimensiones atómicas, pero lo suficientemente pequeños como para exhibir

movimiento browniano. Este rango de tamaño de partículas en una solución coloidal suele oscilar en el rango de nanómetros, por ello el método coloidal es un método eficiente de producción de nanopartículas [40-41]. Este método consiste en disolver una sal del precursor metálico o del óxido a preparar, un reductor y un estabilizante en una fase continua o dispersante (un líquido en este caso). Este último puede jugar el papel de reductor, de estabilizante o ambos. En principio el tamaño promedio, la distribución de tamaños y la forma o morfología de las nanopartículas pueden ser controlados variando la concentración de los reactantes, del reductor y del estabilizante así como la naturaleza del medio dispersante. Por este método se pueden formar dispersiones estables por períodos de tiempo muy largos, por ejemplo, Michel Faraday, en 1857, creó dispersiones coloidales de oro, que hoy en día aún permanecen estables. A principios de los años cincuenta del siglo pasado, Turkevitch reportó el primer método estándar y reproducible para la preparación de coloides metálicos (partículas de oro de 20 nm por medio de la reducción de (AuCl_4) con citrato de sodio). Adicionalmente fue el primero en proponer un mecanismo paso a paso de la formación de nanoclusters basado en la nucleación y crecimiento [42-43].

Reducción fotoquímica y radioquímica.

La síntesis de nanopartículas metálicas modificando el sistema químico por medio de altas energías se asocia con la generación de reductores fuertes altamente activos como electrones, radicales y especies excitadas. La reducción fotoquímica (fotólisis) y la radicación-química (radiólisis) difieren en el nivel de energía utilizado. La síntesis fotoquímica está caracterizada por energías por debajo de 60 eV, mientras que la radiólisis utiliza energías de 103-104 eV. Los métodos de reducción fotoquímica y radioquímica tienen la ventajas sobre el método de reducción química. Debido a la ausencia de impurezas formadas cuando se usan reductores químicos, estos métodos producen nanopartículas de alta pureza. Además, la reducción fotoquímica y radioquímica permiten producir nanopartículas en condiciones de estado sólido y a bajas temperaturas. La reducción fotoquímica

en solución se emplea frecuentemente para sinterizar partículas de metales nobles. Estas partículas se obtienen a partir de las correspondientes sales en agua, alcohol o solventes orgánicos^[44].

Irradiación con microondas.

La técnica de irradiación con microondas produce nanopartículas con una muy baja dispersión de tamaño, aunque no siempre se logre un control preciso en la morfología, como pasa en la mayoría de las técnicas de “abajo hacia arriba”. Las microondas actúan como campos eléctricos de alta frecuencia, capaces de calentar cualquier material conteniendo cargas eléctricas como las moléculas polares en un disolvente o iones conductores en un sólido. Los solventes polares se calientan y sus componentes moleculares se ven obligados a girar con el campo y pierden energía en colisiones. Las muestras conductoras y semiconductoras se calientan cuando los iones y los electrones contenidos en ellas forman una corriente eléctrica y la energía se pierde debido a la resistencia eléctrica del material. En los últimos años, el proceso de calentamiento asistido por microondas se ha utilizado como una alternativa atractiva para la síntesis de materiales a escala nanométrica, dado que es un método rápido, uniforme y efectivo, que permite incrementar las cinéticas de reacción en uno o dos órdenes de magnitud. Nanopartículas coloidales de Pt, Ru, Ag y Pd estabilizados por polímeros han sido preparadas por calentamiento con microondas, a partir de las sales precursoras del metal disueltas en soluciones de etilenglicol^[45]. Por otra parte, el calentamiento por microondas de las muestras líquidas permite la disminución de las fluctuaciones de temperatura en el medio de reacción, proporcionando, así, un entorno más homogéneo para la nucleación y el crecimiento de las partículas metálicas^[45-46].

Utilización de dendrímeros.

La síntesis de nanopartículas también se ha llevado a cabo usando micelas, emulsiones y dendrímeros como nanorreactores que permiten la síntesis de

partículas de formas y tamaños definidos, esto se logra alterando la naturaleza de los dendrímeros. Los dendrímeros son moléculas altamente ramificadas, las que incluyen un núcleo central, unidades intermediarias repetitivas y grupos funcionales terminales ^[47]. Los dendrímeros representan nuevos tipos de macromoléculas que combinan el alto peso molecular y baja viscosidad de sus soluciones con su forma molecular tridimensional y la presencia de una estructura espacial. El tamaño de los dendrímeros varía de 2 a 15 nm y representan nanorreactores naturales ^[48-49].

Síntesis solvotermal.

Con el nombre general de síntesis solvotermal se agrupan una serie de técnicas en las que un precursor metálico disuelto en un líquido, en un recipiente cerrado, es calentado por encima de su punto de ebullición, lo que genera una presión superior a la atmosférica (normalmente moderada). El líquido habitual es el agua, y de ahí el nombre de “síntesis hidrotermal”; sin embargo, cada vez se van utilizando con mayor frecuencia otros medios líquidos: disolventes orgánicos, amoníaco líquido, hidracina, etc, y tenemos entonces la síntesis solvotermal. En este tipo de técnicas normalmente los tiempos de reacción son largos (comparados con otros métodos químicos). La síntesis hidrotermal se refiere a reacciones heterogéneas en medio acuoso por encima de 100 °C y 1 bar. Una característica distintiva de la síntesis hidrotermal es que los reactivos que difícilmente se disuelven en agua pasan a la disolución por acción del propio disolvente o de mineralizadores. El objetivo de esta técnica es lograr una mejor disolución de los componentes de un sistema y así se logran disolver o hacer reaccionar especies muy poco solubles en condiciones habituales (por ejemplo: sílice, aluminosilicatos, titanatos, sulfuros) ^[50].

Método sol-gel.

El método sol-gel es un proceso químico en fase húmeda ampliamente utilizado en la ciencia de los materiales. Este método se utiliza principalmente para

la fabricación de nanomateriales (normalmente un óxido metálico). Se parte de una solución química que actúa como precursor de una red integrada ya sea de partículas discretas o de una red de polímeros. Los precursores típicos del proceso sol-gel son los alcóxidos metálicos y los cloruros metálicos, que sufren varias reacciones de hidrólisis y policondensación para formar una dispersión coloidal, que luego de una polimerización lenta forma un gel. En general, los alcóxidos son muy sensibles a la humedad (se descomponen muy fácilmente ante la presencia de ésta), es por ello que la hidrólisis para la formación del gel es llevada a cabo usando alcoholes como un solvente común para los diferentes líquidos inmiscibles. Un gel polimérico es una red macromolecular infinita, la cual está hinchada por solvente. Un gel puede ser creado cuando la concentración de la especie dispersa aumenta. El solvente es atrapado en la red de partículas y así la red polimérica impide que el líquido se separe, mientras el líquido previene que el sólido colapse en una masa compacta. La deshidratación parcial de un gel produce un residuo sólido elástico que se conoce como xerogel. Finalmente, este material es completamente deshidratado y eventualmente tratado térmicamente en flujo de gas para obtener el material nanoestructurado final. El método sol-gel ha sido usado en los últimos años para preparar una amplia variedad de materiales nanoestructurados. El método es atractivo porque involucra procesos a baja temperatura. También la alta pureza y homogeneidad son atribuibles a su forma de preparación en sistemas multicomponente^[41].

Un método que se utiliza comúnmente para estabilizar las nanopartículas es depositarlas en un soporte, generalmente un óxido metálico, para impedir su sinterización, re-cristalización y agregación. Este tipo de materiales nanoestructurados soportados son de gran utilidad en áreas como la catálisis, aplicaciones ópticas, médicas, entre otras. Los métodos clásicos de depósito de nanopartículas en óxidos metálicos son:

1. La Impregnación: Consiste en el llenado de los poros del soporte con una solución del precursor metálico (normalmente una sal) en el que el volumen puede ser el necesario para llenar el volumen de poros o bien un exceso de

volumen que luego de un periodo de maduración es removido por evaporación, de tal forma que el precursor metálico y su contra-ion permanecen sobre la superficie del soporte. Este es un método sencillo y barato, por tanto, es el método clásico de preparación de catalizadores a nivel industrial; sin embargo, con la desventaja de que se tiene muy poco control de la manera en que interacciona el precursor metálico con el soporte, además de que no se logra una eliminación eficiente del contra-ión del precursor metálico. Una vez que se logra la interacción de los precursores metálicos con el soporte, el material obtenido se somete a tratamientos térmicos en mezclas de gases reductoras u oxidantes, para obtener las nanopartículas depositadas en el soporte ^[51-52].

- 2. Adsorción Iónica:** En este método se puede utilizar tanto la adsorción de aniones como de cationes. Los cationes pueden ser adsorbidos a través de interacción electrostática con los grupos superficiales del soporte cargados negativamente (O^-), esto se logra cuando el pH de la solución en la que está suspendido el soporte es superior al punto isoeléctrico del soporte (PIE). Las especies aniónicas pueden ser adsorbidas en los grupos superficiales del soporte cargados positivamente (OH_2^+), cuando el pH de la solución es inferior al PIE. Las superficies de óxidos o hidróxidos pueden ser protonadas o desprotonadas dependiendo del pH de la solución. El valor en el cual la carga eléctrica total de la superficie es cero es el punto de carga cero, que tiene el mismo valor en pH que el PIE ^[51-52].
- 3. Depósito-Precipitación (DP):** Consiste en el depósito de un óxido hidratado o de un hidróxido sobre la superficie de un soporte, como resultado de un aumento gradual y homogéneo del pH de la solución en la que el soporte es suspendido. Los agentes basificantes típicos son los hidróxidos, como el NaOH, o el KOH, los carbonatos o las bases de retardo como la urea. El precipitado puede ser nucleado por la superficie del soporte, y cuando se lleva a cabo correctamente toda la fase activa es ligada al soporte sin que permanezca flotando en la solución. Este método así como las adsorciones iónicas presentan la ventaja sobre la impregnación de que la mayor parte de los contra-iones del precursor

metálico pueden eliminarse de manera eficiente por medio de lavados repetidos de las muestras luego del depósito del precursor metálico. Como en los métodos anteriores, la obtención de las nanopartículas depositadas se logra luego de un tratamiento térmico del precursor metálico en interacción con el soporte, en atmósferas de gases reductoras u oxidantes, dependiendo de las propiedades químicas de la especie depositada y el estado de oxidación deseado del material depositado^[52].

4. Depósito de Coloides: En principio el tamaño promedio y la distribución del tamaño de partícula pueden ser controlados seleccionando adecuadamente las condiciones de síntesis. La ventaja de usar una ruta coloidal para preparar materiales metálicos soportados radica en el hecho de que las condiciones de preparación pueden ser manipuladas para obtener partículas con una distribución de tamaños estrecha en torno al tamaño deseado, inclusive por este método puede ser controlada la forma de las partículas. Actualmente existen reportados en la literatura una buena cantidad de métodos para la síntesis de coloides metálicos, en los que se han utilizado una gran cantidad de reductores como el citrato de sodio, tiocianato de sodio, poli(etilen-imina), cloruro de tetrakis(hidroximetil)fosfonio y Borohidruro de sodio^[53]. Como se mencionó arriba también pueden utilizarse estabilizantes. Las nanopartículas metálicas pueden ser inmovilizadas en el soporte sumergiéndolo en la suspensión coloidal, seguido por un proceso de lavado y secado. En una preparación exitosa las partículas una vez soportadas no deberían ser significativamente más grandes que las obtenidas en el solución; para lograr lo anterior se requiere mantener un delicado balance entre varios parámetros tales como la naturaleza y concentración del estabilizante, la relación metal/estabilizante y, por supuesto, la naturaleza del soporte^[51]. En principio, el depósito de partículas coloidales no es un problema a menos que sea necesario remover el estabilizante por tratamiento térmico explicado por Grunwaldt.

5. Deposito Fotoquímico. Consiste en la reacción que ciertos cationes metálicos con potenciales redox apropiados pueden ser depositados en el soporte y

reducidos por fotoelectrones creados por la iluminación de semiconductores, tales como óxidos de zinc, tungsteno y titanio. El mecanismo de fotorreducción ha sido ampliamente estudiado ^[54]. En este método se pueden utilizar también estabilizantes orgánicos, para evitar el crecimiento desmedido de las partículas tales como PVA y PVP. Los soportes que no tienen un bandgap adecuado (Fe_2O_3 y SnO_2) normalmente no son adecuados para ser utilizados como soportes en este método ^[55]. La desventaja de este método es que su eficacia es muy sensible a las características tanto del bulto como de la superficie del soporte. La mayor ventaja es que no es necesario tratar térmicamente las muestras ya que luego de la preparación, el metal se encuentra reducido por la irradiación con UV ^[55].

El tamaño y la morfología de partículas soportadas son altamente dependientes de los parámetros utilizados durante la síntesis (temperatura de depósito, tiempo de contacto, pH, tipo de gas y temperatura utilizados durante el tratamiento térmico), del soporte utilizado (características electrónicas, morfológicas, defectos superficiales, etc.) y del precursor metálico ^[52].

1.13 Nanopartículas de Plata (AgNPs)

1.13.1. Aplicaciones de las nanopartículas de plata.

En los últimos años, la plata ha ganado mucho interés debido a su buena conductividad, estabilidad química, actividad catalítica y antibacteriana. Las nanopartículas de plata se están convirtiendo en una de las categorías de productos de mayor crecimiento en la industria de la nanotecnología. Su fuerte actividad antimicrobiana es la principal característica para el desarrollo de productos con nanopartículas de plata, actualmente, una amplia categoría de productos se encuentran disponibles en el mercado.

En el ámbito médico, existen apósitos para heridas, también tienen su aplicación en el sector alimentario, concretamente en agricultura y en el envasado de los alimentos. Dentro del campo de la agricultura, las nanopartículas de plata se

emplean para prolongar la conservación de frutos, ya que además de su actividad antibacteriana presentan un efecto fungistático que retarda el crecimiento de hongos fitopatógenos. Además, también se está evaluando la utilización de las nanopartículas de plata en el tratamiento de enfermedades que requieren una concentración mantenida de fármaco en sangre o con un direccionamiento específico a células u órganos^[56].

1.13.2. Toxicidad de las nanopartículas de plata.

Una de las características que lo hace más atractivo para la aplicación de las nanopartículas de plata es la baja probabilidad del desarrollo de resistencia por parte de los microorganismos en comparación a los antibióticos^[55]. Con respecto a la toxicidad de las NPs se ha observado la aparición de argiria en heridas abiertas tratadas con concentraciones excesivas de Ag. Sin embargo, en ciertos estudios se sugiere que, por su tamaño y por sus propiedades microbicidas, las AgNPs pueden ser usadas sin ningún inconveniente en el ser humano^[82].

En trabajos que involucran células eucariotas, como células hepáticas humanas y fibroblastos, se considera que las AgNPs son tóxicas ya que provocan daños en la respiración celular y en los ciclos de división celulares si se utilizan grandes cantidades^[86]. Sin embargo, debido a la variabilidad en concentración, tiempo de exposición, tamaño y forma de las AgNPs, este tema continúa siendo investigado.

1.13.3. Factores intrínsecos en la toxicidad.

Investigaciones previas sugieren que existen diversas propiedades físico-químicas de las nanopartículas de plata que están involucradas en su toxicidad intrínseca. Entre las más relevantes tenemos:

Tamaño.

Es una de las propiedades más importantes de las NPs. Muchas publicaciones han mostrado que la toxicidad de las AgNPs depende del tamaño. Además, el

tamaño de las AgNPs también influye en la distribución tisular, en la penetración dermal e intestinal y en la captación celular^[58].

Superficie específica.

El tamaño y la superficie específica de las NPs están en estrecha relación, ya que conforme disminuye el tamaño de las AgNPs la superficie específica aumenta dejando un mayor número de átomos expuestos en la superficie atómica^[58].

Aglomeración.

La estabilidad de las AgNPs también influye en la toxicidad. Las NPs tienen una tendencia natural a formar aglomerados o agregados. Estos dos fenómenos pueden cambiar el lugar de depósito de las AgNPs en el organismo, ya que un agregado o aglomerado de NPs se deposita en unas zonas u otras debido al distinto diámetro hidrodinámico. Además, también modifica la toxicidad, ya que al ser una estructura relativamente compacta, el área superficial es menor y por tanto la toxicidad también será menor^[61].

Carga superficial.

Existen estudios donde se han observado una correlación directa entre la carga superficial y la toxicidad de las AgNPs. Un ejemplo de esto fue que se observaron que las AgNPs estabilizadas con citrato con cargas superficiales negativas fueron menos citotóxicas que las AgNPs con cargas superficiales positivas estabilizadas con polietilimina ramificada.

Solubilidad.

Cuando las NPs se disuelven pierden su estructura de NPs y las propiedades toxicológicas específicas de estas, siguiendo entonces consideraciones toxicológicas similares a las de otro contaminante con efectos sistémicos^[61].

Forma.

La forma también influye en la toxicidad de las AgNPs. Se ha comprobado que las formas de triángulo truncado son más tóxicas que las formas esféricas y alargadas, ya que contienen más caras y por tanto son más reactivas ^[61] siendo las esféricas las que presentan menor toxicidad.

1.14 Nanopartículas de Oro (AuNPs)

Las nanopartículas de metales nobles y más específicamente las nanopartículas de oro, exhiben unas excelentes propiedades físicas, químicas y biológicas, que son intrínsecas a su “tamaño nanométrico”. Destacan especialmente sus peculiares e inesperadas propiedades fototérmicas, por las que al ser activadas en presencia de luz láser, desprenden calor, actuando como auténticos “nanocalefactores”. Las AuNPs pueden ser producidas con distintos tamaños y formas y ser fácilmente funcionalizadas con un amplio abanico de ligandos (anticuerpos, polímeros, sondas de diagnóstico, fármacos, material genético). Por todo ello, las AuNPs despiertan un gran interés en el campo de la biomedicina ^[62].

También destaca la utilidad de las AuNPs en la elaboración de “sistemas transportadores inteligentes” que permiten controlar, en el espacio y en el tiempo, la liberación del compuesto terapéutico asociado, ya que ésta es desencadenada por un estímulo biológico interno.

1.14.1. Aplicaciones terapéuticas del oro.

Aunque pueda parecerlo, la utilización de oro con fines médicos no es nueva, sino que se remonta a la antigüedad, existiendo constatación de la utilización de oro coloidal en China en el año 2500 antes de Cristo. El descubrimiento por Robert Koch del efecto bacteriostático del cianuro de oro frente al bacilo de la tuberculosis, marca el comienzo de su utilización en la medicina moderna siendo introducido en la terapia de la tuberculosis en 1920 ^[63]. Una de las indicaciones actuales más importantes del oro es en el tratamiento de la artritis reumatoide y otras

enfermedades reumáticas, incluyendo psoriasis y lupus eritematoso. En el tratamiento de la artritis reumatoide en principio se utilizaron tiolatos (tiomalato, tioglucosa) de oro que eran inyectados intramuscularmente en forma de solución. Pero estos compuestos, que experimentaban una rápida distribución a órganos como el riñón, hígado y bazo, no estaban exentos de poder causar desórdenes sanguíneos así como nefrotoxicidad y hepatotoxicidad. Por este motivo se introdujo en 1985 una segunda generación de fármacos de oro conteniendo ligandos fosfina, que eran más liofílicos y permanecían más tiempo en circulación, reduciéndose de manera significativa la nefrotoxicidad [24-25]. En las pasadas décadas también se puso de manifiesto la actividad antimicrobiana, antimalárica y anti-VIH de diversos complejos orgánicos de oro [29]. Otras aplicaciones médicas del oro incluyen su utilización en dispositivos médicos tales como marcapasos y “stents”, así como implantes de oído y odontología [25].

1.14.2. Aplicaciones terapéuticas de las nanopartículas de oro.

Como se puede observar en la Fig. 9, son diversas las aplicaciones de las nanopartículas de oro y sobre todo en el área médica.

Liberación de fármacos y macromoléculas terapéuticas.

Estudios recientes confirman el gran potencial de las AuNPs en la elaboración de nanotransportadores de fármacos y macromoléculas terapéuticas.

Las AuNPs también son útiles en la preparación de “sistemas inteligentes” que liberan la molécula terapéutica encapsulada como consecuencia de la activación de un estímulo interno (liberación mediada por un cambio de pH o liberación mediada por glutatión) o externo (liberación desencadenada por una fuente de luz láser) [64].

Terapia génica.

La terapia génica representa una novedosa estrategia para el tratamiento de diversas enfermedades genéticas o adquiridas, resultando particularmente prometedora en el tratamiento de ciertos cánceres [82]. El éxito de esta modalidad

terapéutica depende de la identificación de un vehículo adecuado para el transporte del material genético (ADN plasmídico, RNA de transferencia oligonucleótidos antisentido). Para ello, un nanotransportador ideal ha de proporcionar al ácido nucleico una protección eficaz frente a la degradación por las nucleasas, favorecer su internalización al interior de las células y permitir una liberación en forma funcional en el núcleo de las mismas^[83].

En sus inicios, se recurría a la utilización de vehículos de tipo vírico, los cuales resultaban muy eficaces, sin embargo presentaban importantes inconvenientes relacionados con su citotoxicidad e inmunogenicidad^[84], que dificultaban su posible utilización en clínica. Estas limitaciones fueron subsanadas con la introducción de los sistemas de liberación sintéticos no virales, generalmente catiónicos, tipo liposomas, dendrímeros, lipoplexes y polyplexes que presentan, por el contrario, una eficacia menor debido a la barreras a que se enfrentan entre el lugar de administración y su localización en el núcleo de la célula^[65].

Terapia del cáncer.

Los tratamientos de quimioterapia tradicionales empleados en la terapia del cáncer presentan importantes limitaciones relativas a la reducida especificidad de los agentes quimioterapéuticos por las células tumorales, la corta vida media de los fármacos debido al rápido aclaramiento *in vivo* y la resistencia a muchos fármacos ejercida por las células tumorales.

En consecuencia, es objetivo prioritario la identificación de un sistema nanotransportador que permita orientar selectivamente (vectorizar) y en principio, liberar de manera eficaz la dosis adecuada del fármaco citotóxico en el tumor o células cancerígenas. Esto permitirá mejorar la eficacia y reducir la dosis de fármaco administrado así como los efectos secundarios consecuencia de una distribución aleatoria del fármaco en el organismo^[17].

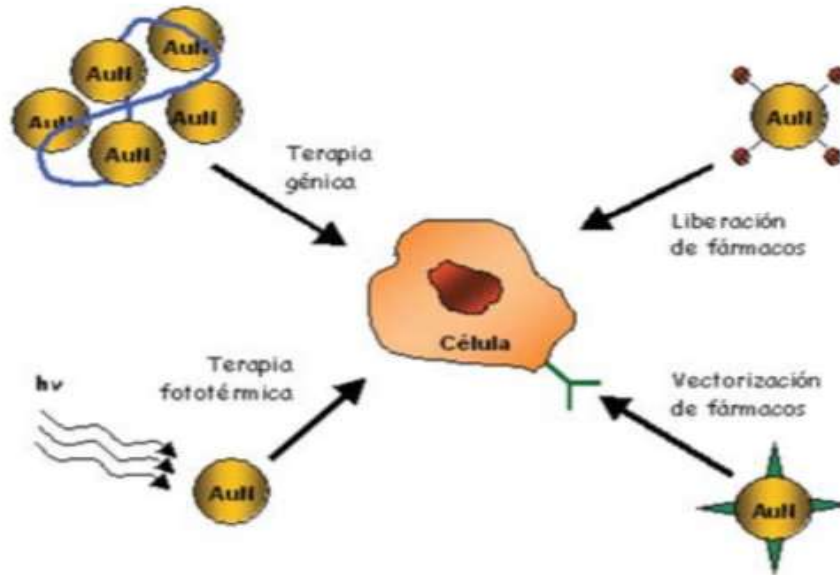


Figura 9. Aplicaciones terapéuticas de las nanopartículas de oro.

Tomado de: 'Gold in Medicine', de Higby, GJ. (1982).USA^[61].

1.14.3 . Características de las nanopartículas de oro.

Las nanopartículas de oro presentan, en principio, una baja toxicidad y como acabamos de comentar unas propiedades peculiares e increíblemente interesantes las cuales pueden ser modificadas mediante su funcionalización con múltiples ligandos, con la finalidad de obtener nano-sistemas óptimos para las distintas aplicaciones terapéuticas.

- **Biocompatibilidad y baja toxicidad:** El oro coloidal presenta una elevada estabilidad química, ha sido utilizado históricamente con fines médicos. En consecuencia, cabría esperar que las AuNPs presentasen una baja toxicidad y elevada biocompatibilidad. Se ha demostrado que las características superficiales de las AuNPs influyen en su toxicidad. Las nanoestructuras catiónicas presentan mayor toxicidad que las aniónicas, las nanopartículas aniónicas con núcleo de tamaño 2 nm son prácticamente no tóxicas mientras que las equivalentes catiónicas son moderadamente tóxicas encontrándose la toxicidad probablemente relacionada con la lisis celular (mediada inicialmente por una unión electrostática) dependiente de la concentración^[34].

- **Facilidad de síntesis y multifuncionalidad:** Las AuNPs se pueden preparar fácilmente, obteniéndose sistemas coloidales monodispersos estables con un tamaño entre 1 nm y 150 nm, utilizando diversas técnicas. Las AuNPs presentan una elevadísima área superficial, por lo que pueden ser fácilmente funcionalizadas y bioconjugadas, modificando sus propiedades superficiales. Una AuNP de 2 nm de diámetro de núcleo podría, en principio, ser conjugada a ~ 100 moléculas en los ligandos disponibles ($n = \sim 108$)^[50].

1.15 Impacto Social de la Nanotecnología.

En el siglo XXI la nanotecnología tendrá un fuerte impacto en la vida humana, al menos tan importante como el que tuvieron en el siglo XX los antibióticos, los circuitos integrados, la microelectrónica y los polímeros hechos por el hombre.

Como ya existen algunas aplicaciones de las nanotecnologías es necesario evaluar el impacto que tendrán en la sociedad. Puesto que en la nanotecnología convergen varias disciplinas, como ya se expuso, es previsible que su efecto se perciba en muchos y variados campos, desde la ciencia de materiales hasta la electrónica, desde la computación hasta la medicina.

En cuanto a la medicina, el diagnóstico de enfermedades y el suministro de fármacos se investigan intensamente. Dado que en estas áreas es indispensable realizar exámenes y procedimientos de validación rigurosos, el avance no será evidente hasta dentro de 10 años aproximadamente; se puede prever que para entonces habrá algunas aplicaciones como el uso de proteínas, ADN y biopolímeros en biosensores. Actualmente está en fase de experimentación el uso de nanopartículas para curar enfermedades genéticas como la fibrosis cística, y en la misma situación se encuentran las nanopartículas magnéticas que permitirían posicionar fármacos en sitios específicos mediante sistemas de campos magnéticos externos. Las nanotecnologías también pueden ayudar a resolver problemas de contaminación y uso de fuentes de energía. Las soluciones que ofrecen pueden alinearse en dos direcciones:

- Mejor aprovechamiento de las fuentes de energía renovables.

- Reducción del consumo de energía y de los efectos sobre el ambiente en los procesos industriales o de transporte, entre otros.

La aplicación de las nanotecnologías llegará también al sector agrícola. A nivel mundial todas las empresas que dominan el negocio de los transgénicos están invirtiendo en nanotecnologías, promoviendo la creación de nanocápsulas de liberación lenta que se usarán en agentes biológicos, por ejemplo, como fármacos, insecticidas, fungicidas, plaguicidas, herbicidas y fertilizantes ^[66].



Capítulo II: Materiales y Métodos

2.1 Lugar de ejecución.

2.1.1. Ubicación.

El trabajo experimental se realizó en instalaciones del Instituto de Tecnología e Pesquisa – ITP; en el Laboratorio de Nanotecnología y Nanomedicina – LNMed de la Universidad de Tiradentes de Aracaju-Brasil.

Director del Laboratorio: Luiz Pereira da Costa, PhD.

2.1.2. Aspectos técnicos.

Ubicación geográfica

Av.: Murillo Dantas, 300-Farolândia

Aracaju-SE/Brasil

Plano de ubicación





2.1.3. Actividades que realiza el LNMed.

El LNMed representa una avanzada plataforma tecnológica para el impulso de la nanociencia y la nanotecnología. Se estudia la investigación científica y el desarrollo de aplicaciones específicas en actividades de síntesis, caracterización y aplicaciones de sistemas nanotecnológicos.

2.2 Materiales.

Material biológico.

Aspergillus niger.

Kombucha.

Pseudomona aeruginosa.

Staphylococcus aureus.

Material de vidrio.

Baguetas.

Beakers de 10, 50, 100, 150, 200, 250, 500 mL.

Bureta de 25 y 50 mL.

Fiolas de 25 y 50 mL.

Frasco Pírex con tapa rosca 100 mL.

Pipetas 1,2 y 5 mL.

Placas Petri 90 x 15mm.

Probeta 5, 10,25 y 50mL.

Tubos de ensayo 12 x 75 mm.

Tubos de ensayo con tapa rosca 13 x 100 mm.

Instrumentos y equipos.

Autoclave, Numak Yxq.

Balanza Analítica, Ohaus Pioneer.

Centrifuga para eppendorf, Eppendorf 5417R.

Espectrofotómetro, Shimadzu.

Espectrofotómetro FT-I, Shimadzu IR.

Espectrofotómetro UV-Visible, Shimadzu Modelo: UV-1603.

Estufa, JP Selecta.

Incubadora, JP Selecta.

Microscopio electrónico de barrido, FEI Inspect.

PHmetro, Hanna instrument.

Ultrasonido, MEG.

Medios de cultivo.

Medio Agar Nutritivo.

Medio Hugh-Leifson.

Medio Mueller Hinton, Merck.

Medio PDA.

Medio SIM.

Reactivos químicos.

Ácido cítrico, Merck.

Agar-agar, LabKem.

Agua destilada.

Alcohol acetona, Mequim S.A .

Borohidruro de sodio, Merck.

Cloruro de oro.

Cristal violeta, Synth.

Etanol, Avantor JT Baker.

Extracto de carne, Merck.

Extracto de levadura, Merck.

Fosfato de sodio dibásico, Merck.

Glucosa, Merck.

Hidróxido de sodio 0.5 N, Avantor JT Baker.

Kovac, Merck.

Lugol, Merck.

Manitol, Merck.

Nitrato de plata, Merck.

Peptona, Merck.

Safranina, SolarBio.

Otros.

Cubeta de cuarzo.

Micropipetas; (0.1 μL - 2 μL / 1 μL - 10 μL / 10 μL - 100 μL / 100 μL - 1000 μL)

Papel aluminio.

Papel kraft.

Placa de MIC.

Plastifilm rollo.

Puntas para Micropipetas; (Amarilla 5 μL - 200 μL / Blanca 50 μL - 1000 μL)

Tubos eppendorf.

2.3 Métodos.

2.3.1. Obtención de la muestra Kombucha.

La muestra de Kombucha fue obtenida a través del sitio web <http://www.hamashiha.com.br>, en julio del 2016. La empresa Hamashiha se localiza en el estado de Sao paulo/Brasil. Los microorganismos utilizados como patrones

antimicrobianos fueron: *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*, procedentes del laboratorio de microbiología del ITP.

2.3.2. Preparación del té de Kombucha.

Para la muestra inicial se preparó un litro de té de Kombucha, se hirvió un litro de agua con 4 cucharadas de azúcar, posteriormente, se agregó dos sobres de té verde, se esperó que la mezcla enfrié a temperatura ambiente y se agregó 7 cucharadas de vinagre de manzana; finalmente se colocó el cultivo de Kombucha, dejando la mezcla en reposo en un frasco de vidrio cubierto por un paño elástico para evitar que ingresen contaminantes y permitir el intercambio gaseoso, por un período de 15 días en un lugar oscuro sin movimiento.

2.3.3. Aislamiento de la cepa.

Para el aislamiento de las bacterias, la Kombucha se inóculo con un asa bacteriológica utilizando la técnica de agotamiento, los medios donde se inóculo la Kombucha son: Medio RAE (4% de glucosa, 1% de extracto de levadura, 1% de peptona, 0.34% de fosfato de sodio dibásico, 0.14% de ácido cítrico y 2% de agar), Medio YPM (0.5% de extracto de levadura, 0.3% de peptona, 2.5% de manitol) y Agar Nutritivo (0.5% de peptona y 0.3% de extracto de carne). En el Anexo 1 se muestra la preparación de todos los medios de cultivo. Los medios se incubaron a 28 °C por un período de 48h, después de la incubación, las colonias formadas se replicarán en el mismo medio e incubadas en las mismas condiciones. Colonias aisladas serán conservadas en placas Petri conteniendo medio RAE en refrigeración para una próxima replicación.

2.3.4. Características de los microorganismos.

Caracterización macroscópica.

Con la obtención del crecimiento de bacterias, se seleccionó las colonias con las siguientes características: colonias con bordes circular ondulado, superficie convexa de color crema a beige.

Caracterización microscópica.

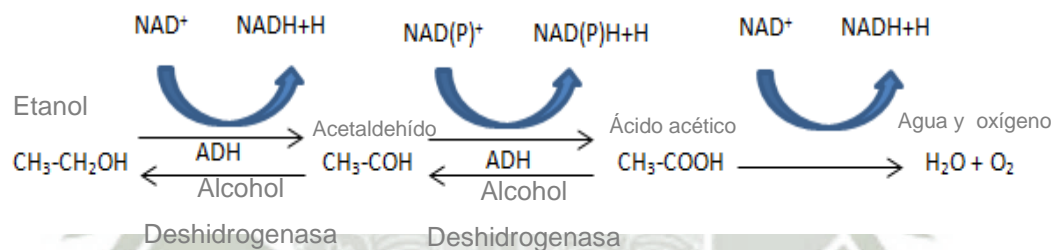
Para verificar las características morfológicas de los microorganismos aislados de los cultivos puros se realizó la coloración de Gram, donde se verificó si las bacterias aisladas de las diferentes colonias son bacterias Gram Negativas. A partir de estos resultados se clasificaron a las bacterias.

Caracterización Bioquímica.

A partir de la clasificación de las bacterias, se obtuvo las cepas adecuadas para la realización de las siguientes pruebas bioquímicas a partir de un cultivo de 72 horas. En el Anexo 2 se muestran los fundamentos de las pruebas bioquímicas.

- Oxidasa: El test fue realizado a través del método de la tira, colonias oxidasa positiva desarrollan una coloración rosa que se va tornando rojo oscuro de 5 a 10 segundos, reacciones posteriores se consideraron negativas.
- Catalasa: La producción de catalasa fue testada mezclando una muestra de la colonia en peróxido de hidrógeno (agua oxigenada). La positividad del test se observa a través de la aparición de burbujas, indicando que la enzima catalasa hidrolizó el H_2O_2 en H_2O y O_2 respectivamente.
- Medio SIM: Se sembró con punción profunda con aguja de inoculación recta a dos tercios de profundidad y se cultivó a 37 °C por 48 horas. Es un medio semisólido destinado a verificar la movilidad, producción de indol y de ácido sulfhídrico en un mismo tubo.
- Medio Hugh-Leifson: La fermentación de glucosa fue observada a través de la inoculación en el medio Hugh-Leifson, la incubación fue realizada a 28 °C por 48 horas, el cambio de coloración del medio de cultivo a un color amarillo fue considerado una reacción positiva.

- Medio YPM(5%): Se utilizó el medio de cultivo YPM con una concentración mayor de manitol al medio inicial (5%), con la finalidad de utilizarlo como un medio de selección, ya que las bacterias pertenecientes al género *Gluconacetobacter* tienen la capacidad de crecer utilizando como fuente de carbono el manitol.
- Súper oxidación de etanol: Esta prueba se realizó en pH 7 y 4,5 utilizando un medio de cultivo compuesto por extracto de levadura, etanol, azul de bromocresol y agar, incubados a 28 °C por 48 horas. La producción de ácido acético fue constatada a través del cambio de color del indicador de pH de azul para amarillo y posterior a la incubación por más 48 horas, el ácido acético fue oxidado a CO₂ y H₂O, observándose a través de la revisión del color del indicador de pH para color azul.



- Oxidación de acetato: Se utilizó un medio de cultivo compuesto por extracto de levadura, acetato de sodio y agar. La incubación se realizó a 28 °C por 48 horas. La positividad del test se observó a través del cambio de color del medio de cultivo para un color amarillo.

Caracterización Molecular.

La siguiente información fue obtenida gracias al laboratorio de nanotecnología y nanomedicina (LNMED). Para la identificación de las bacterias productoras de celulosa bacteriana se realizó los siguientes pasos.

- **Extracción de ADN:** La extracción de ADN se realizó a las bacterias identificadas como Gram negativas. Se utilizó el método de extracción por solventes usando el kit Easy-DNA® Kit (Invitrogen). Este método es convencional y de amplio uso, las células son lisadas y los restos celulares generalmente se remueven por centrifugación. Las proteínas son desnaturalizadas/digeridas utilizando una proteasa y precipitadas con solventes orgánicos tales como fenol, o una mezcla 1:1 de fenol y cloroformo, y el precipitado de proteínas es removido por centrifugación. El ADN purificado suele ser recuperado por precipitación con etanol o isopropanol. En presencia de cationes monovalentes como el Na^+ y a temperatura de $-20\text{ }^\circ\text{C}$, el etanol absoluto precipita eficientemente ácidos nucleicos poliméricos y deja atrás ácidos nucleicos monoméricos y de cadena corta, incluyendo los ribonucleótidos del tratamiento con RNAsa en solución.
- **Amplificación del gen 16S rRNA:** Posterior a la extracción del ADN este es utilizado como molde para amplificar la región 16S rRNA mediante la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La amplificación de la región del gen se llevó a cabo usando los siguientes primers utilizables 27F 1492R. Las condiciones del PCR son las siguientes: $95\text{ }^\circ\text{C}$ por 30 seg, $50\text{ }^\circ\text{C}$ por 30 seg, $72\text{ }^\circ\text{C}$ por 45 seg. Los productos obtenidos por la PCR se ampliaron y purificaron usando el KIT Qiagen PCR purification, continuando las instrucciones del KIT finalmente fueron secuenciados utilizando la técnica de Sanger.
- **Amplificación del gen *acsAB*:** Para la amplificación del gen *acsAB* que codifica la celulosa sintasa, se realizó una reacción de PCR, utilizando los primers *acsAB*-forward ($5' - \text{TGG CGT GGT GTC TAT GAA CTG TCT TT} - 3'$) y *acsAB*-reverse ($5' - \text{CGG ATA TAC TGC TCG TTC AGC GTC AT} - 3'$).

Finalmente se realizó el alineamiento de secuencias homólogas para la identificación de las familias y género al cual pertenecen las bacterias aisladas.

2.3.5. Identificación microbiológica de celulosa bacteriana.

Cultivo previo de los microorganismos.

Todos los microorganismos aislados son cultivados en los diferentes medios de cultivo RAE, YPM y Agar Nutritivo en condiciones estáticas a una temperatura de 28 °C por un período de 7 días para poder verificar que dentro de los microorganismos aislados se encuentren los productores de celulosa.

Hidrólisis enzimática de celulosa.

Para poder comprobar que las membranas obtenidas son de celulosa bacteriana se realizó una identificación microbiológica en donde se utilizó *Aspergillus niger* como hongo con capacidad celulolítica, el cual fue donado por el Laboratorio de microbiología del ITP de la UNIT, posteriormente se preparó medio PDA suplementado con cloranfenicol para evitar el crecimiento de bacterias, se colocó las membranas de celulosa bacteriana y se inoculó encima el hongo *Aspergillus niger* incubado a una temperatura de 30 °C por 15 días, para después poder ser evaluado.

2.3.6. Pre-inóculo.

El pre-inóculo fue realizado en 50 mL de los diferentes medios líquidos de cultivo RAE, YPM y Agar Nutritivo a partir de sus respectivas colonias, siendo incubadas por un período de 7 días a 28 °C. El fin de este inóculo es incrementar la biomasa para continuar con los siguientes pasos del proyecto.

2.3.7. Inóculo y condiciones de cultivo.

Una cantidad de 3 mL de cada pre-inóculo fue inoculado en varias placas Petri de 90 x 15 mm de los diferentes medios de cultivo RAE, YPM y Agar nutritivo respectivamente, incubados en las siguientes condiciones como se observa en la Tabla 5.

Tabla 5. Condiciones de cultivo.

Condiciones/Medios	RAE, YPM, Agar Nutritivo	RAE, YPM, Agar Nutritivo	RAE, YPM, Agar Nutritivo
pH	4	6	7
Temperatura	25 °C	28 °C	30 °C
Tiempo de Incubación	7 días	10 días	14 días

2.3.8. Dosaje de ácido acético.

Después de la elección del medio de cultivo y las condiciones de incubación más apropiada para la producción de celulosa, se procedió a realizar un dosaje de ácido acético en el medio de cultivo seleccionado con la finalidad de establecer la relación ácido acético-pH. Para lo cual se tomó muestras del sobrenadante del medio de cultivo en los días de fermentación correspondientes y se procedió a realizar la reacción de titulación con fenolftaleína al 0.1% como indicador y como titulante se utilizó una solución de NaOH 0.1 M. Finalmente para el cálculo de la concentración de ácido acético en el medio de cultivo se utilizó una muestra patrón de ácido acético al 1%, para la obtención de los datos de pH se utilizó cinta de medición de pH para efectuar la medición de los datos.

2.3.9. Determinación de la producción de celulosa.

Después de los correspondientes días de incubación las muestras fueron recolectadas, retirando la película formada en la superficie del medio sólido con ayuda de una espátula. La película fue purificada a través del tratamiento realizado con Hidróxido de sodio al 0.5 N a 60 °C durante 15 minutos con el objetivo de eliminar las células. En el Anexo 3 se detalla la preparación del Hidróxido de sodio. Posteriormente fueron lavadas 5 veces en agua destilada para remover los componentes del medio u otros residuos y fueron secadas en estufa a 45 °C hasta obtener un peso constante, a partir del cual fue calculado el peso seco.

2.3.10. Curva de crecimiento microbiana.

La curva de crecimiento fue realizada para la evaluación del crecimiento microbiano, determinación del pH, determinación de producción de biomasa con el microorganismo productor de celulosa. El procedimiento fue realizado en triplicado transfiriendo 5 mL del inóculo en 50 mL del medio RAE. La incubación fue hecha a 30 °C en agitador a 150 rpm siendo retirada una muestra cada 12 horas durante 7 días. El crecimiento celular fue evaluado a través de la lectura en absorbancia en espectrómetro a 560 nm. Las curvas de crecimiento microbiano fueron construidas a partir de esos datos.

2.3.11. Planteamiento experimental.

Después de verificar el mejor medio de cultivo, las condiciones más adecuadas y seleccionar la mejor cepa para la producción de celulosa fue iniciada la producción. Con el fin de obtener la mayor cantidad de celulosa bacteriana.

2.3.12. Incorporación y reducción de las sales Nitrato de Plata y Cloruro de Oro.

Pre tratamiento a las membranas de celulosa bacteriana.

Las membranas de celulosa bacteriana obtenidas fueron previamente lavadas con Hidróxido de sodio al 0.5 N, repitiendo el procedimiento por 5 veces para la eliminación de las bacterias y cualquier residuo del medio de cultivo, posteriormente las membranas son nuevamente lavadas con agua destilada para la eliminación de cualquier residuo y el exceso de Hidróxido de sodio.

Adición de Nitrato de Plata.

Para la síntesis de las nanopartículas de plata, inicialmente se preparó una solución madre de 100 mM de Nitrato de plata, de la cual se prepararon 4 diluciones. En el Anexo 4 se muestra el cálculo para la obtención de las diluciones. Posteriormente las membranas de celulosa bacteriana fueron tratadas con las

diferentes concentraciones de Nitrato de plata (20 mM, 40 mM, 60 mM, 100 mM) a temperatura ambiente por la técnica de inmersión, seguidamente las membranas se dejaron en contacto con las diferentes soluciones de Nitrato de plata por un período de 20 minutos. A continuación, las muestras pasaron a centrifugación a 3000 rpm por 5 minutos, descartándose el sobrenadante y se procede a los lavados finales donde las membranas fueron trasladadas a otros tubos eppendorf con agua destilada y pasaron nuevamente por centrifugación 3 veces.

Síntesis de las nanopartículas de plata.

La síntesis de nanopartículas de plata se realizó a partir de las membranas de celulosa obtenidas después de la adición del Nitrato de plata, para la reducción de la sal precursora Nitrato de plata impregnada en la celulosa bacteriana utilizada como soporte y estabilizante y la posterior síntesis de las nanopartículas de plata se utilizó 1 gota del agente reductor Borohidruro de sodio sobre cada muestra de celulosa bacteriana tratada con las diferentes soluciones de Nitrato de plata. Observándose un cambio en el color de la solución impregnada en la celulosa bacteriana de transparente a color marrón-amarillo indicativo de la formación de nanopartículas de plata. Dicho cambio de coloración se observó en un período de 1 a 3 segundos. Finalmente, las muestras de celulosa fueron lavadas con Hidróxido de sodio 0.5 N para evitar la formación de aglomerados y la eliminación del exceso del agente reductor. Terminado el procedimiento las muestras fueron trasferidas a placas y llevadas a estufa para su secado en a una temperatura de 45 °C con puerta abierta por un período de 24 horas para su almacenamiento y posterior análisis.

Adición de Cloruro de Oro.

Para la síntesis de las nanopartículas de oro inicialmente se preparó una solución madre de 0.147 M de Cloruro de oro, de la cual se prepararon 3 diluciones. En el Anexo 5 se detalla los cálculos para la obtención de las diluciones. Posteriormente cada muestra de 47 g de celulosa bacteriana fue tratada con las diferentes concentraciones de Cloruro de oro (0.441 mM, 0.736 mM, 1.472 mM) a

temperatura ambiente y por la técnica de inmersión, seguidamente se dejaron las membranas en contacto con las diferentes soluciones por un período de 20 minutos. A continuación, las muestras pasaron a centrifugación a 3000 rpm por 5 minutos descartándose el sobrenadante y se procedió a los lavados finales para lo cual las membranas fueron trasladadas a nuevos tubos eppendorf con agua destilada y pasaron a centrifugación 3 veces con la finalidad de eliminar cualquier excedente de residuo.

Síntesis de las nanopartículas de oro.

Para la síntesis de las nanopartículas de oro se utilizó las muestras de membranas de celulosa bacteriana anteriormente tratadas con la solución precursora Cloruro de oro, para la reducción y síntesis de dicha sal precursora impregnada en celulosa bacteriana se utilizó como agente reductor Borohidruro de sodio. En el Anexo 6 se describe su preparación. Para la síntesis de las nanopartículas de oro se utilizó 1 a 2 gotas del agente reductor sobre cada muestra de celulosa tratada con las diferentes soluciones de la sal precursora Cloruro de oro. Finalizado el procedimiento se observó un cambio de coloración de la solución impregnada en la celulosa de amarillo a color rojizo lo cual es un indicativo de la formación de nanopartículas de oro. El cambio de coloración se dio de manera instantánea, terminado el procedimiento las muestras fueron lavadas con agua destilada para la eliminación de cualquier residuo y excedente de solución, posteriormente pasaron a placa y fueron llevadas a estufa a 45 °C con puerta abierta por 24 horas y almacenadas para su posterior análisis.

2.3.13. Caracterización estructural de la celulosa bacteriana.

Microscopía electrónica de barrido (MEB).

Para poder determinar las estructuras de las membranas de celulosa bacteriana se utilizó el microscopio electrónico de barrido de marca FEI modelo Inspect, para comenzar con el procedimiento se recortó un círculo de aproximadamente 1 cm de diámetro, cada muestra en evaluación se fijó con

glutaraldehído al 2% durante 25 minutos, a continuación para la deshidratación de las muestras se utilizó una serie de alcohol etílico de graduación creciente de 50%, 70%, 90% adicionalmente se utilizó alcohol propílico para el transporte de las muestras que se realizaron una hora después, el examen comenzó con desecación al vacío con CO₂ las muestras se pegaron en los stubs con una cinta de carbono de doble cara, la cámara de desecado se enfrió hasta alcanzar los 5 °C y posteriormente las muestras fueron introducidas, la cámara se llenó de CO₂ y luego se permitió que el gas se mezcle con el solvente líquido y a continuación se purgo la cámara, esta operación se repitió hasta que la manguera de salida no expulsara más que gas, después de comprobar la sustitución total del disolvente se llenó la cámara con CO₂ y se calentó hasta alcanzar una temperatura de 35 °C, seguidamente se despresurizó la cámara y se retiraron las muestras fue gracias a este proceso que nos permitió reemplazar toda el agua y alcohol de nuestras muestra por CO₂ con la finalidad que la estructura de nuestras muestras no se deforme o sufra descomposición.

A continuación, las muestras pasaron a una cámara de metalizado de muestras, donde se procedió a generar vacío hasta que la presión descendió a aproximadamente 600–400 mtorr. Para la limpieza de la cámara se utilizó gas argón durante 15 s y se esperó a que la presión descienda a 80 mtorr luego se procedió a bañar las muestras en oro por un período de 120 s aproximadamente terminado el bañado se recuperó el argón y se dejó entrar aire en la cámara para poder retirar las muestras metalizadas. Las muestras metalizadas fueron introducidas en la cámara del microscopio electrónico de barrido y se realizó alto vacío de 4×10^{-5} psi así las muestras quedaron listas para poder ser observadas en un rango de 5000 a 30000 veces.

Espectroscopia UV-visible (UV).

La técnica de espectroscopia UV-Vis se realizó con un espectrofotómetro marca Shimadzu, cuya longitud de onda está comprendida entre los 100 y los 800 nm. Las membranas de celulosa bacteriana impregnadas con las nanopartículas de

plata y oro fueron colocadas en el porta muestras. A continuación, se visualizó un gráfico o representación de la respuesta de cada muestra en función de la longitud de onda o frecuencia.

Espectroscopia FT-IR.

La técnica de espectroscopia IR se realizó con un espectroscopio FT - IR marca Shimadzu de rango medio ($400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$). Las membranas de celulosa bacteriana impregnadas con las nanopartículas de plata y oro fueron colocadas en el porta muestras, a continuación la punta de diamante fue bajada hasta tener contacto con la muestra y un rayo monocromo de luz infrarroja fue transmitido a través de la muestra, la energía absorbida por esta fue registrada, este proceso es repetido varias veces para formar la gráfica que emite los espectros que permiten finalmente determinar el compuesto por comparación con una bases de datos del software.

2.3.14. Evaluación de la actividad antimicrobiana.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria.

Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria de las nanopartículas de plata y oro se preparó 4 diferentes muestras en suspensión de celulosa en suero fisiológico, 2 de ellas impregnadas con nanopartículas de plata a concentraciones de 160 mM y 120 mM respectivamente, las dos muestras restantes de celulosa impregnadas con nanopartículas de oro a concentraciones 1.48 mM y 0.88 mM. Se determinó dichas concentraciones para poder evaluar en su totalidad las concentraciones iniciales anteriores de Nitrato de plata y Cloruro de oro por medio de las diluciones que se realizaron en la placa. El procedimiento inició con la preparación de caldo Muller Hinton que se colocó en las 96 pozas de las placas como se observa en la Fig. 10, la primera columna fue el control negativo donde se adicionó solamente caldo para evaluar la presencia de contaminación, la segunda y tercera columna fueron el control positivo donde se colocó las dos bacterias patrones a concentración 1.5×10^8 microorganismos/mL respectivamente, fue a

partir de la tercera columna y primera fila donde se colocó las diferentes muestras de nanopartículas de plata y oro impregnadas en celulosa en sus concentración máximas.

Para las nanopartículas de plata las concentraciones fueron 160 mM y 120 mM. En las nanopartículas de oro las concentraciones fueron 1.48 mM y 0.88 mM, se escogieron dichas concentraciones máximas para que a continuación se puedan realizar las diluciones respectivas, finalmente se les adiciono las bacterias patrones que probaremos y se dejó la microplaca en estufa a 37 °C por un período de 24 horas para su posterior evaluación y análisis.

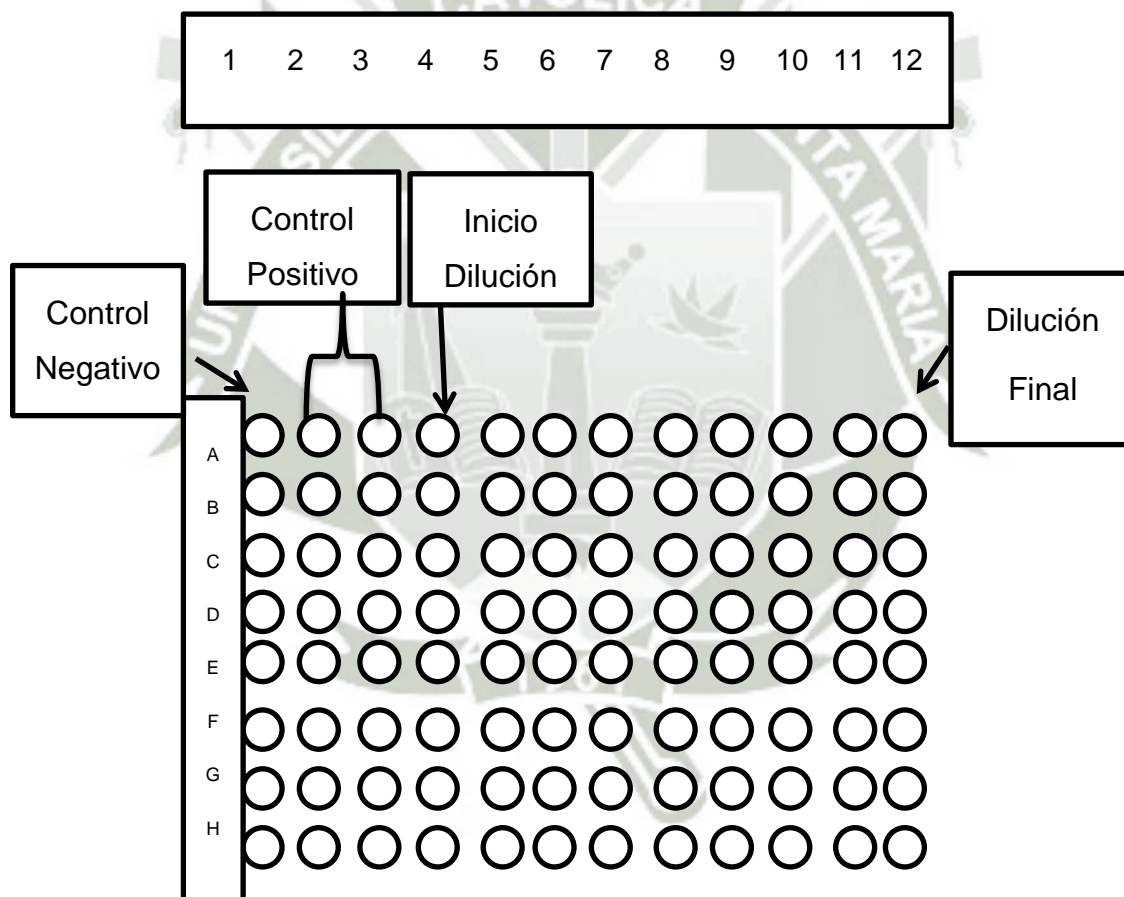


Figura 10. Esquema de la microplaca utilizada en la dilución de las nanopartículas.

Capítulo III: Resultados y Discusiones

3.1 Preparación del Té de Kombucha

Se obtuvo el té de Kombucha preparado a partir de un cultivo de SCOBBY, el cual es un cultivo simbiótico de bacterias y levaduras, el recipiente se mantuvo de forma estática y cubierto por 15 días a temperatura ambiente. Finalmente se observó la formación de una nata blanquecina superficial, la cual tomó la forma del recipiente, de textura cremosa, y de color blanquecino, en parte inferior del recipiente se produjo un incremento del SCOBY inicial, lo que nos indica la formación de un cultivo “bebé”, tal como puede observarse en la Fig. 11. Fue a partir de esta nata blanquecina en la parte superior que se comprobó la presencia de bacterias productoras de celulosa.

Se obtuvo la muestra de celulosa bacteriana de la fuente conocida como “té de Kombucha”. Se preparó esta fuente biológica ya que según referencias bibliográficas las bacterias acidó acéticas, en este caso *Gluconacetobacter*, se encuentra distribuida extensamente por la naturaleza y se pueden encontrar en diversas plantas y frutos ricos en azúcar, requisitos que tiene esta bebida en particular.



Figura 11. Recipiente con el cultivo de Kombucha a los 15 días.

3.2 Caracterización de Cepas

Caracterización macroscópica.

Pasado los 7 días de inoculación en los diferentes medios de cultivo, se obtuvo como resultado el aislamiento de 4 bacterias y 5 levaduras.

En el medio RAE se aislaron 3 microorganismos denominados B1, L1 y L2. En la Fig. 12 se aprecia colonias de coloración beige, redondeadas, irregulares con un diámetro de 5 mm correspondientes a B1, mientras que L1 formó colonias beige, irregulares con un diámetro mayor a 6 mm y L2 formó colonias blancas, irregulares con diámetro mayor a 5 mm.

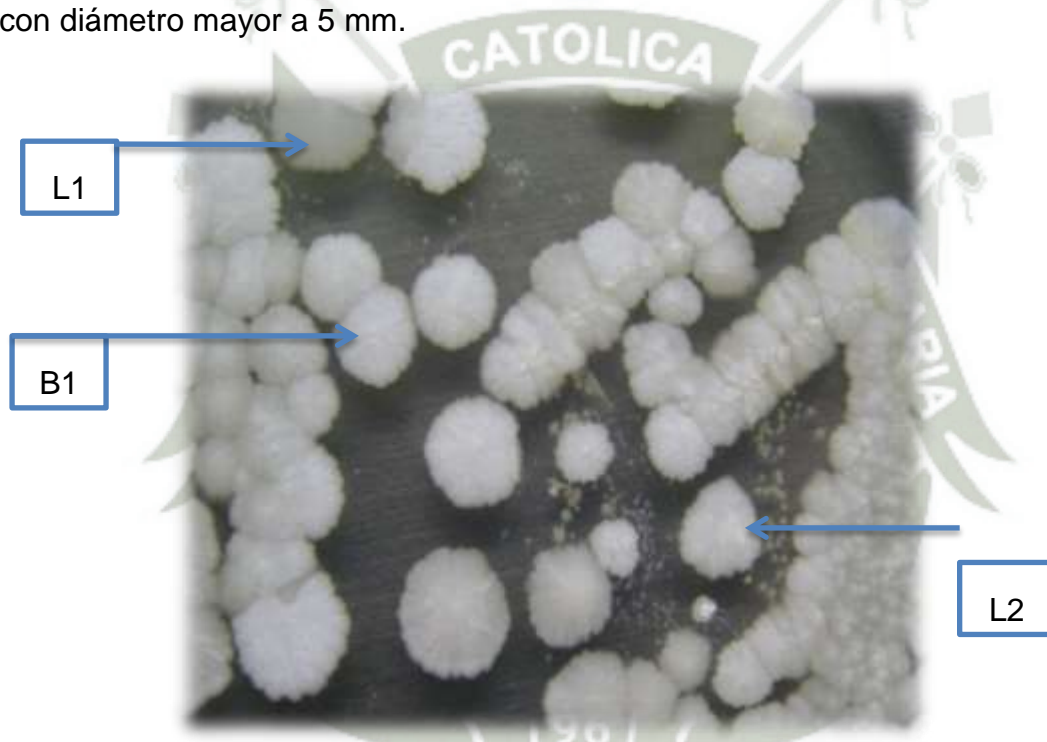


Figura 12. Colonias de los microorganismos aislados en Medio RAE.

En el medio YPM se aisló 2 microorganismos que se denominaron L3 y L4. En la Fig. 13 se puede observar que la colonia de L3 presentó coloración blanquecina, con un diámetro menor a 1 mm y L4 presentó colonias transparentes, regulares y con un diámetro de 1mm.

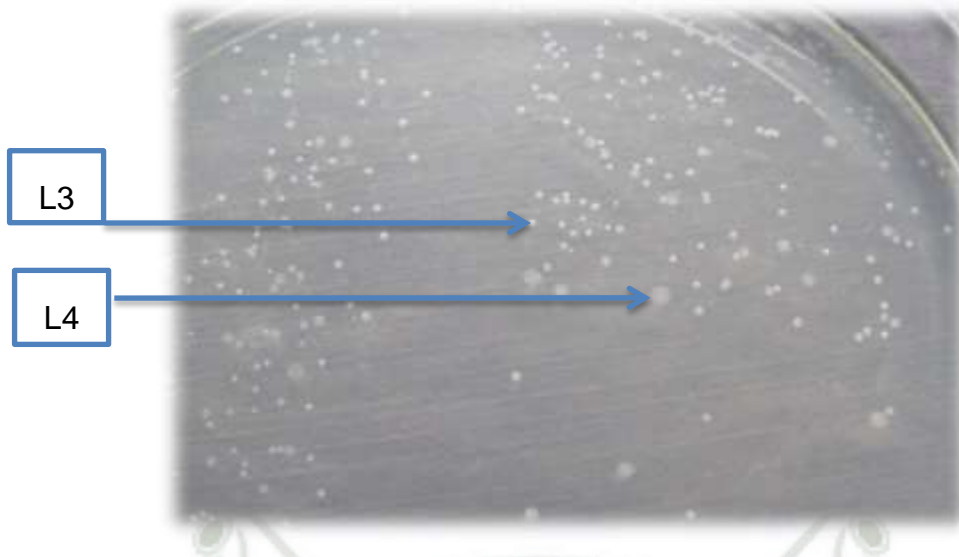


Figura 13. Colonias de los microorganismos aislados en Medio YPM.

En el medio Agar nutritivo, fueron aislados 4 microorganismos que se denominaron B2, B3, B4 y L5 los cuales pueden ser observados en la Fig. 14. B2 presentó colonias blancas, redondeadas, regulares y con diámetro de hasta 1 mm, B3 formó colonias transparentes, redondeadas, regulares con diámetro mayor que 1 mm, B4 presentó colonias de coloración beige redondeadas, regulares con diámetro mayor que 1 mm y L5 formó colonias transparentes, regulares con diámetro de hasta 1 mm.



Figura 14. Colonias de los microorganismos aislados en Medio Agar Nutitivo.

A continuación, en la Tabla 6 se encuentran las principales características macroscópicas obtenidas de las bacterias antes mencionadas.

Tabla 6. Características macroscópicas de las colonias de bacterias.

Características	B1	B2	B3	B4
Tamaño colonias	5 mm	≥ 1 mm	≤1 mm	≤ 1 mm
Color	Beige	Blanca	Transparente	Beige
Borde	Redondeado	Liso	Redondeado	Redondeado
Consistencia	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa
Opacidad	Opaco	Opaco	Opaco	Opaco

Caracterización microscópica

Después de la Tinción de Gram se identificó que las bacterias B1, B3 y B4 son bacilos Gram negativos y la bacteria B2 un coco Gram positivo. Se prosiguió con las pruebas de la caracterización bioquímica con las bacterias Gram negativas ya que pertenecen al grupo de bacterias ácido acéticas productoras de celulosa bacteriana. Los resultados se muestran en la Tabla 7 y en la Fig. 15.

Tabla 7. Características microscópicas de las colonias de bacterias.

Características	B1	B2	B3	B4
Tinción de Gram	Gram -	Gram +	Gram -	Gram -
Morfología	Bacilo	Coco	Bacilo	Bacilo

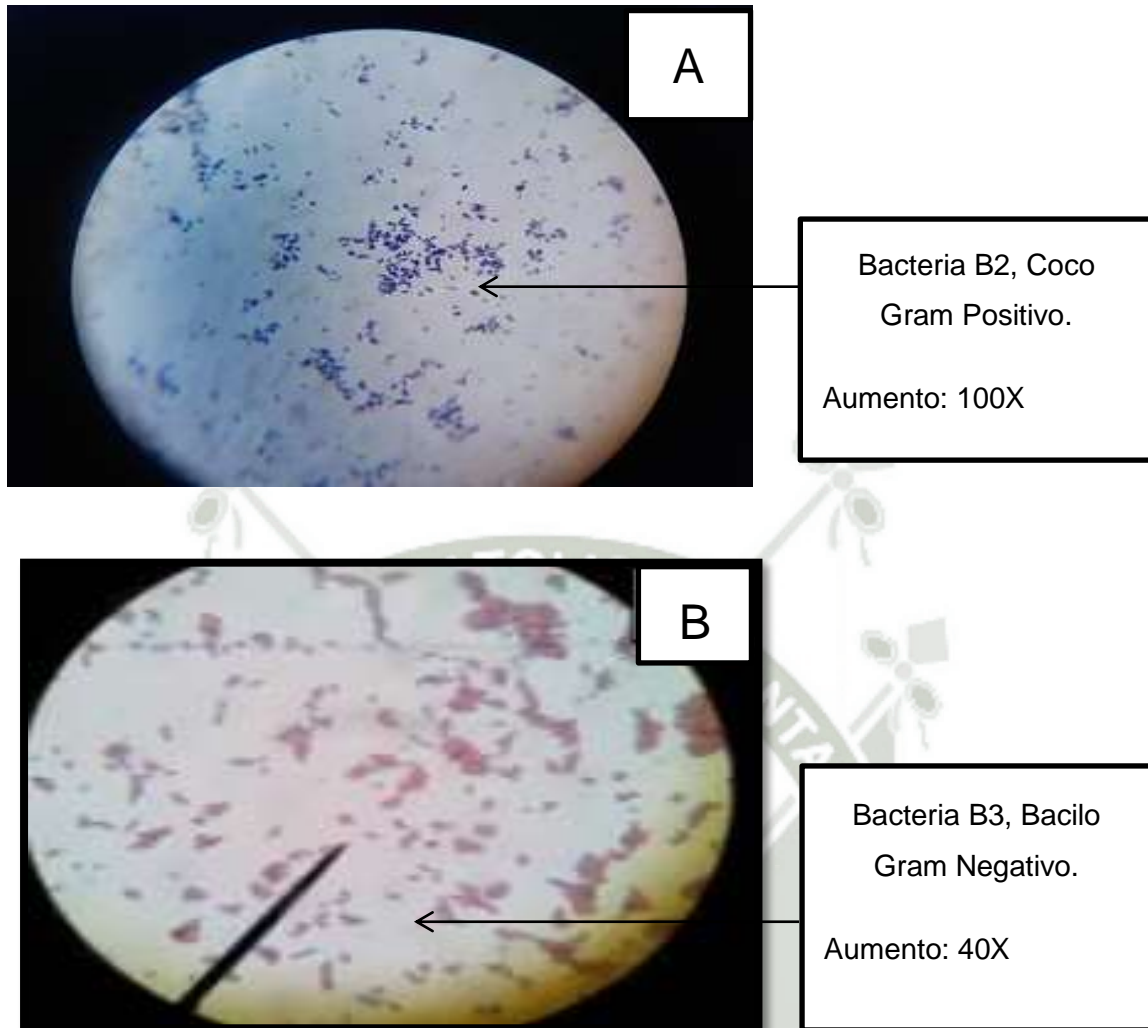


Figura 15. A. Tinción de Gram donde se puede apreciar los Cocos Gram Positivo (B2). B. Tinción de Gram donde se puede apreciar el Bacilo Gram Negativo (B3).

Caracterización bioquímica.

Las cepas donde la prueba de oxidasa reacciono negativamente y catalasa positivamente fueron identificadas preliminarmente como bacterias productoras de celulosa, por lo que se prosiguió con las demás pruebas bioquímicas. El resultado de oxidasa para las bacterias B1 y B3 dio negativo y para la bacteria B4 dio resultado positivo, las tres bacterias reaccionaron positivamente para catalasa, los resultados se observan en la Fig. 16.

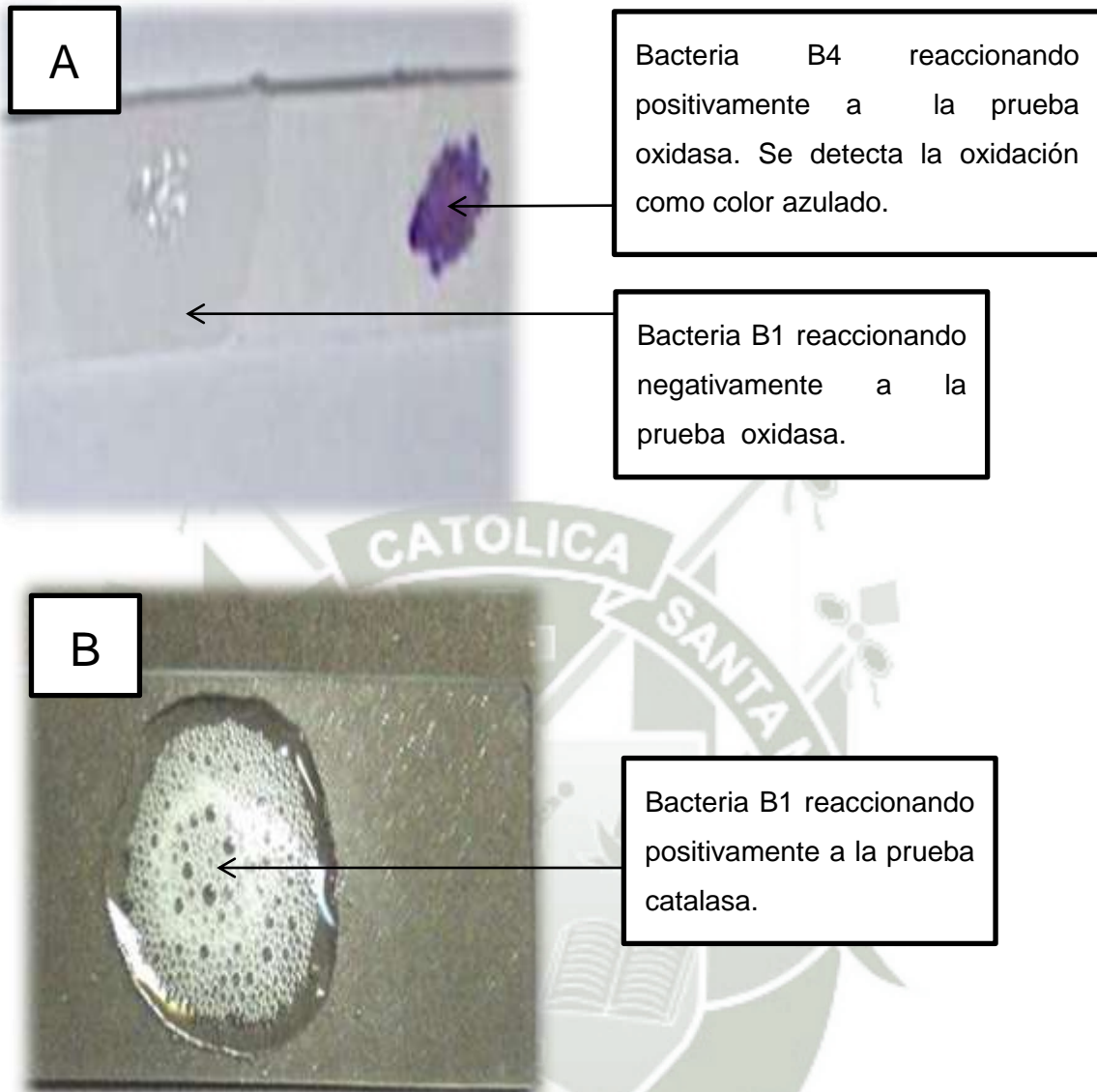


Figura 16. A. Prueba de oxidasa positiva y negativa. B. Prueba de catalasa positiva.

En medio SIM se observó que para todas las bacterias existe motilidad, en ninguna hubo producción de ácido sulfhídrico y las bacterias B1 y B3 reaccionaron positivamente para el indol, el cual fue posible evidenciar gracias al reactivo de Kovac's. Mediante el medio Hugh-Leifson se logró identificar el metabolismo del hidrato de carbono, gracias al viraje de color del medio de verde a amarillo, para el caso de las bacterias ácido acéticas B1 y B3 que consumen glucosa y otros

azúcares se concluyó que tienen un metabolismo oxidativo, debido a que presentaron una ligera producción de ácido en el tubo aeróbico, que se evidenció por el cambio de color superficial del medio de color verde a amarillo. En medio YPM la bacteria B1 presentó crecimiento. Los resultados se observan en la Tabla 8 y la Fig. 17. Como resultado de estas pruebas bioquímicas las cepas de las bacterias B1 y B3 presentan mayor probabilidad de pertenecer al género *Gluconacetobacter*.

Tabla 8. Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas.

Pruebas	Reacción	Cepa		
		B1	B3	B4
Oxidasa	Reacción	Negativa	Negativa	Positiva
Catalasa	Reacción	Positiva	Positiva	Positiva
SIM	Indol	Negativo	Negativo	Positivo
	Ácido sulfhídrico	Negativo	Negativo	Negativo
	Movilidad	Positiva	Positiva	Positiva
Superoxidación de etanol	Reacción	Positivo	Positivo	Negativo
Hugh-Leifson	Metabolismo	Oxidativo	Oxidativo	Fermentativo
Crecimiento en Medio YPM	Crecimiento	Positivo	Positivo	Escaso

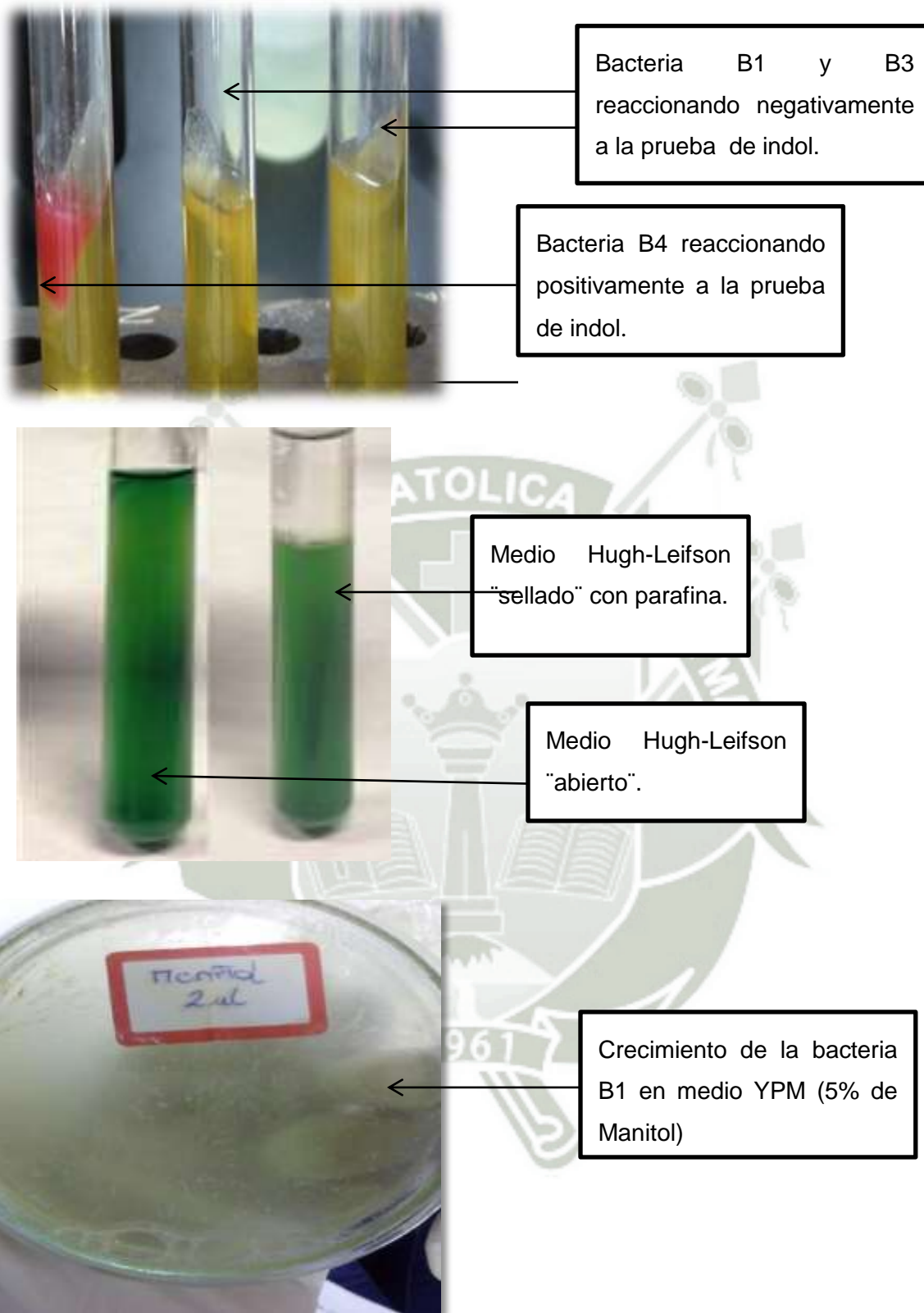


Figura 17. Pruebas bioquímicas de la caracterización de las bacterias aisladas. A. Medio SIM. B. Medio Hugh-Leifson. C. Medio YPM.

Caracterización molecular.

- **Amplificación del gen 16S rRNA.**

Con el alineamiento de las secuencias homólogas se determinó que las bacterias aisladas B1, B3 y B4 pertenecen a la familia *Acetobacteraceae*, siendo la bacteria B1 perteneciente al género *Gluconacetobacter* y las bacterias B3, B4 al género *Acetobacter*. Para verificar las secuencias homólogas fue utilizado el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Los resultados se observan en la Fig. 18 y en la Tabla 9.

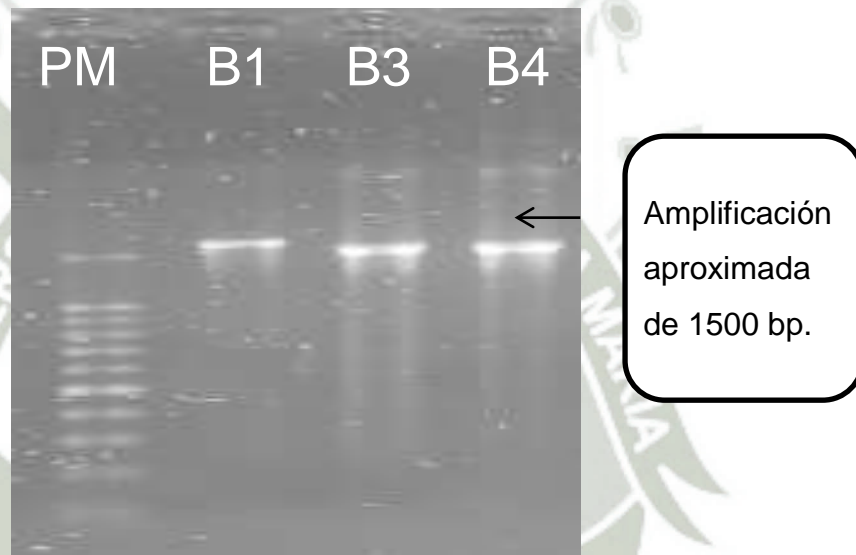


Figura 18. Gel del producto amplificado del gen 16S rRNA de las bacterias aisladas de la Kombucha.

Tabla 9. Identificación molecular de los microorganismos aislados de la Kombucha.

AISLADOS	IDENTIFICACIÓN	N° DE ACCESO	% IDENTIDAD
B1	<i>Gluconacetobacter xylinum</i>	HM046977	94
B2	<i>Acetobacter oeni</i>	EU131161	97
B3	<i>Acetobacter oeni</i>	EU131161	97

- **Amplificación del gen *acsAB*.**

El gen *acsAB* es el que codifica la celulosa sintasa, enzima que realiza la polimerización de la glucosa para la síntesis de celulosa, fue detectado en las bacterias B1 y B3. Fig. 19.

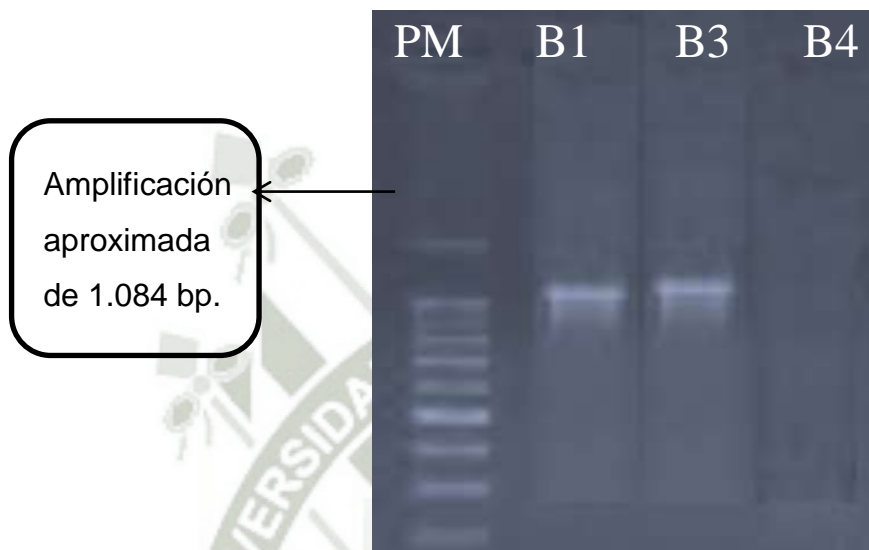


Figura 19. Gel del producto amplificado del gen *acsAB* de las bacterias aisladas de la Kombucha.

3.3 Identificación Microbiológica de Celulosa Bacteriana.

Hidrólisis enzimática de celulosa.

El hongo inoculado *Aspergillus niger* es conocido por poseer enzimas que degradan la celulosa. Muchos hongos filamentosos están naturalmente adaptados al crecimiento sobre superficies, estos requieren contacto cercano con el sustrato debido a su nutrición heterótrofa, secreción de enzimas extracelulares, absorción de nutrientes a través de la pared celular y el crecimiento apical de sus hifas.

Fue inoculado directamente sobre las membranas producidas por las bacterias B1 y B3, en ambos casos el hongo presentó crecimiento, al enjuagar las membranas se observó la presencia de orificios en el lugar donde se inoculó el

hongo, esto quiere decir que el hongo utilizó como sustrato la celulosa utilizando las celulasas para degradar la celulosa a un sustrato más simple como la glucosa, quedando en evidencia que las membranas obtenidas por las bacterias B1 y B3 han sido caracterizadas por el microorganismo *Aspergillus niger*, hidrolizando enzimáticamente la celulosa y utilizándola como único sustrato.

3.4 Cultivo previo de los Microorganismos para la Producción de Celulosa.

Las 2 cepas B1, B3 fueron seleccionadas por sus características macroscópicas, microscópicas, bioquímicas y moleculares, las cuales se utilizaron para la preparación del pre-inóculo en los tres medios de cultivo (RAE, YPM y Agar nutritivo) para la producción de celulosa con el fin de incrementar la biomasa y evaluar su capacidad de producción. Los resultados obtenidos se muestran a continuación en las Figs. 20 y 21 y en la Tabla 10.

Se utilizó 3 mL del pre inóculo de cada cepa para inocular las placas Petri, después de 7 días en incubación a 28 °C se verificó las placas donde se obtuvo resultados positivos para la formación de membranas, las membranas resultantes fueron retiradas y sometidas a lavado con agua destilada e Hidróxido de sodio 0.5 N por una hora a temperatura ambiente para su posterior secado y pesado.



Figura 20. Membranas de celulosa bacteriana formadas por las bacterias B1 y B3 en Medio de cultivo RAE.

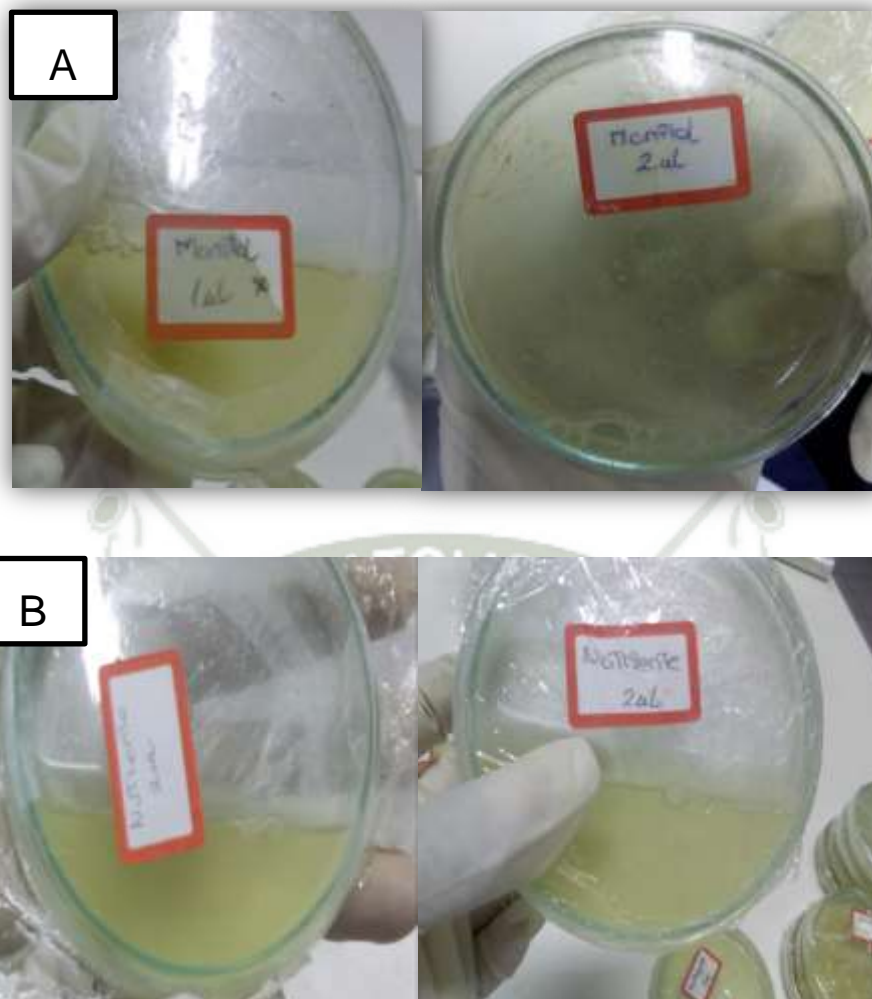


Figura 21. Membranas de celulosa bacteriana formadas por las bacterias B1 y B3. A. Cultivo de cepa B1 y B3 en Medio de cultivo YPM. C. Cultivo de cepa B1 y B3 en Medio Agar Nutritivo.

Tabla 10. Resultados de la producción preliminar de la producción de celulosa.

CEPA / MEDIOS	RAE	YPM	Agar Nutritivo
B1	3.37 g/L	2.12 g/L	2.85 g/L
B3	3.0 g/L	1.98 g/L	2.79 g/L

Las membranas formadas a partir de las cepas B1 y B3 en medio RAE presentaron mayor producción de celulosa con características sobresalientes como mayor resistencia mecánica al momento del lavado, mejor consistencia, soportando temperaturas elevadas al momento del secado sin mostrar desintegración, es por ello que se tomó la decisión de continuar produciendo con este medio de cultivo.

3.5 Inóculo y Condiciones de Cultivo.

Determinación de la mejor condición de cultivo.

Inicialmente se realizó el pre-inóculo y el inóculo en los tres diferentes medios de cultivo RAE, YPM y Agar nutritivo a diferentes condiciones de pH y temperatura, con la finalidad de encontrar el medio y las condiciones de cultivo más adecuadas donde se evidencia una mayor producción de la celulosa bacteriana. En el Anexo 7 se detalla el cálculo de la concentración del inóculo. Encontrándose que el medio RAE a 10 días y 30 °C es la mejor condición.

Determinación de la producción de celulosa de las bacterias B1 y B3 en las diferentes condiciones de cultivo.

Las 2 cepas B1, B3 fueron cultivadas en placas Petri con 15 mL de medio RAE, en las diferentes condiciones de cultivo antes mencionadas, con el objetivo de determinar en cuál de los parámetros se consigue una mayor producción de celulosa bacteriana. Después de los días de incubación correspondientes para cada sistema, las membranas formadas fueron retiradas a tubos eppendorf con Hidróxido de sodio 0.5 N y pasaron a centrifugación por 3 veces para garantizar un lavado integral de la membrana y la eliminación de cualquier residuo, posteriormente fueron lavadas con agua destilada para finalmente ser secadas en la estufa y pesadas hasta obtener un peso seco constante.

Concentración del inóculo.

A partir de un cultivo puro de 72 horas de las cepas B1 y B3 se inoculó placas Petri con medio RAE, se procedió a leer las absorbancias para hallar las respectivas

concentraciones con ayuda de la escala de Mac Farland 0.5. En el Anexo 8 se detalla la preparación de la escala de Mac Farland. Los resultados de la incubación pueden apreciarse en la Tabla 11. Con las cepas y el medio de cultivo seleccionado, se procede a realizar la evaluación de diferentes condiciones de cultivo, con la finalidad de encontrar los parámetros donde ocurra una mayor producción de celulosa bacteriana.

Tabla 11. Concentración de inóculo en cel/mL.

Cepa	Absorbancia	Concentración
B1	0.109	1.10×10^8 cel./mL
B3	0.98	1.13×10^8 cel./mL

3.6 Evaluación de las Condiciones de Cultivo.

Temperatura y tiempo de incubación.

Se colocó ambas cepas en diferentes placas Petri con medio RAE, las cuales fueron incubadas a las siguientes temperaturas 25 °C, 28 °C, 30 °C con los siguientes tiempos de incubación: 7, 10, 14 días para cada muestra respectivamente con la finalidad de conocer la producción de celulosa. En el Anexo 9 se muestra la tabla completa de las mediciones.

Para conocer la biomasa del cultivo de las cepas B1 y B3 fueron conformados sistemas por Erlenmeyer de 300 mL de medio RAE y 30 mL del inóculo en las mismas condiciones. A continuación, en la Fig. 22 podemos observar la diferencia en la producción de celulosa bacteriana obtenida al final del tiempo de incubación de cada sistema evaluado.

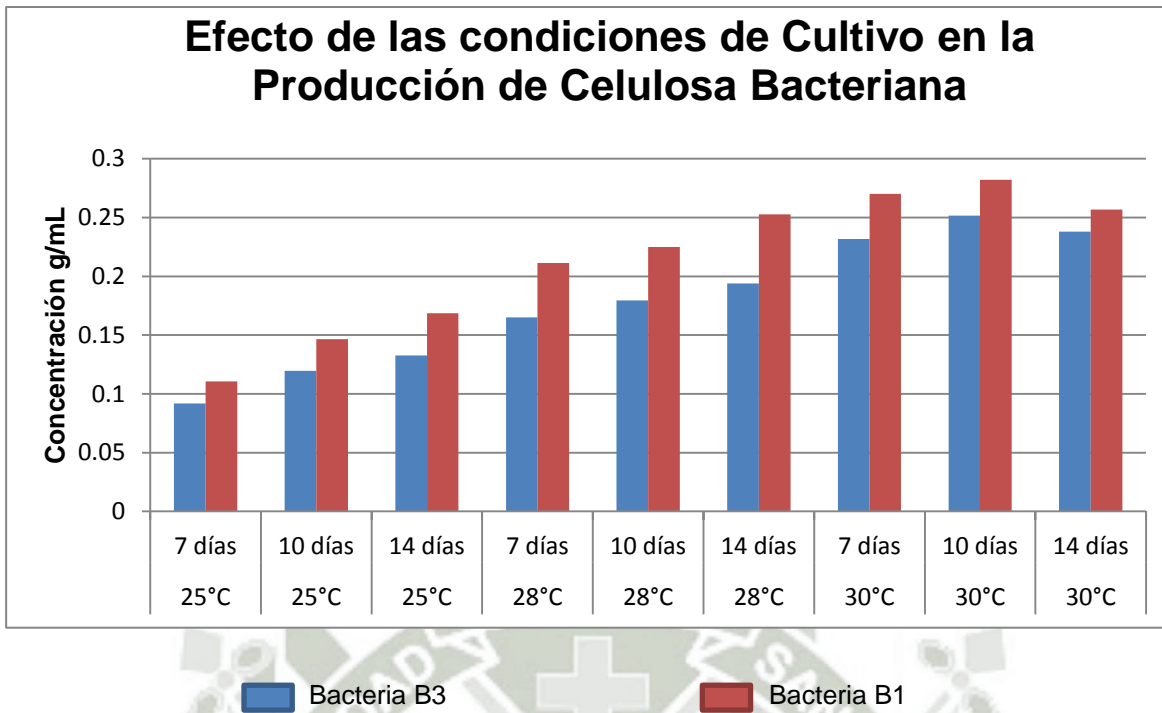


Figura 22. Efecto en las condiciones de cultivo.

Dosaje de ácido acético.

La realización del dosaje de ácido acético tuvo como objetivo encontrar la relación “ácido acético-pH”, en la cepa B1, ya que fue la cepa con mayor producción de celulosa bacteriana. Al finalizar los correspondientes días de incubación para cada sistema se obtuvo como resultado una relación indirecta; es decir que a mayores días de fermentación la concentración de ácido acético aumentaba y por lo tanto el pH del medio disminuía, una característica propia del género *Gluconacetobacter* al pertenecer a la familia de bacterias ácido acéticas. En el Anexo 10 se detalla los datos obtenidos.

Es importante el dosaje de ácido acético, debido a que si el pH del medio es extremadamente bajo inhibe el crecimiento de las bacterias y por lo tanto disminuye la producción de celulosa bacteriana. En 14 días de fermentación que fue el tiempo máximo para el sistema, se obtuvo un pH de hasta 3.5, como podemos observar en la Fig. 23.

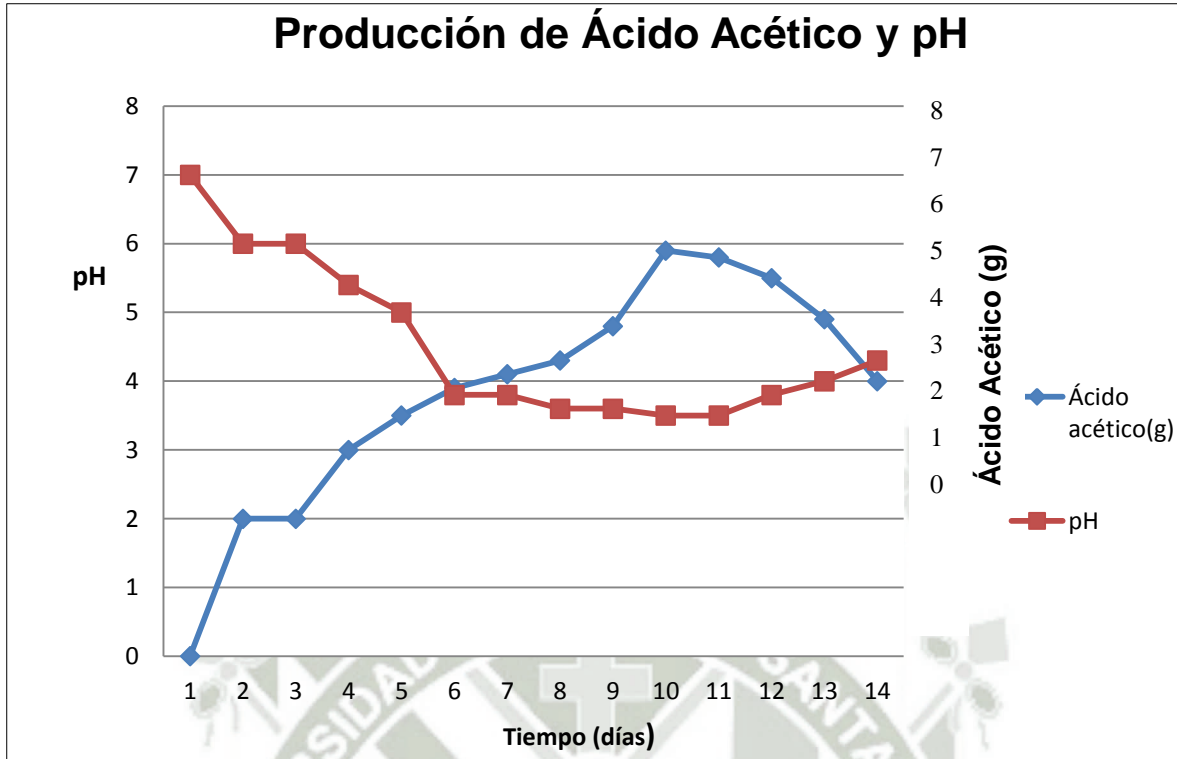


Figura 23. Relación producción ácido acético y pH.

Curva de Crecimiento.

Después de conocer que la cepa B1 en condición de cultivo de 10 días a 30 °C genera una mayor producción de celulosa bacteriana se procedió a determinar la concentración celular para cada condición de cultivo, con el objetivo de encontrar la relación concentración celular y producción de celulosa. En la Fig. 24 se observa la curva de crecimiento de la cepa B1.

Para los cálculos se extrajeron muestras del sistema líquido de la cepas B1, cada 12 horas durante el tiempo correspondiente de incubación, las muestras extraídas fueron 10 mL previamente homogenizadas y después pasaron a la lectura por densidad óptica (DO) en el espectrofotómetro. En el Anexo 11 se detalla el total de datos obtenidos por densidad óptica y en el Anexo 12 se muestran las curvas de crecimiento en las diferentes condiciones de cultivo. Los resultados pueden observarse en la Tabla 12.

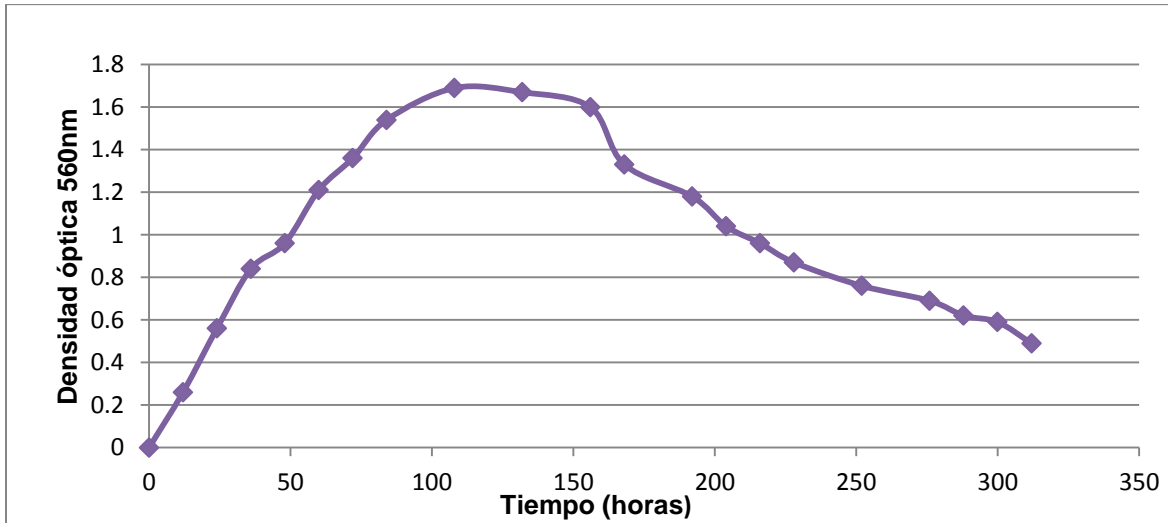


Figura 24. Curva de crecimiento de la cepa B1 a 30°C por 14 días de incubación.

Tabla 12. Cuadro de concentración y biomasa para un tiempo y volumen determinado.

Tiempo H	Temperatura °C	Tiempo incubación	Volumen mL	B1	
				Concentración D.O	Biomasa g/mL
168	25 °C	7 días	190	1.28	0.1105
240	25 °C	10 días	110	1.49	0.1466
336	25 °C	14 días	30	1.62	0.1686
168	28 °C	7 días	190	1.66	0.2112
240	28 °C	10 días	110	1.74	0.2248
336	28 °C	14 días	30	1.59	0.2528
168	30 °C	7 días	190	1.33	0.2822
240	30 °C	10 días	110	0.97	0.2700

En la Fig. 25 se aprecian los valores de biomasa y concentración celular para un tiempo de 168 a 336 horas (7-14 días), el volumen fue decreciendo mientras se tomaban las muestras para densidad óptica cada 12 horas. Los resultados de curvas de crecimiento se muestran para el medio RAE y la cepa B1 por ser este el medio y la cepa que mejores resultados de producción de celulosa bacteriana

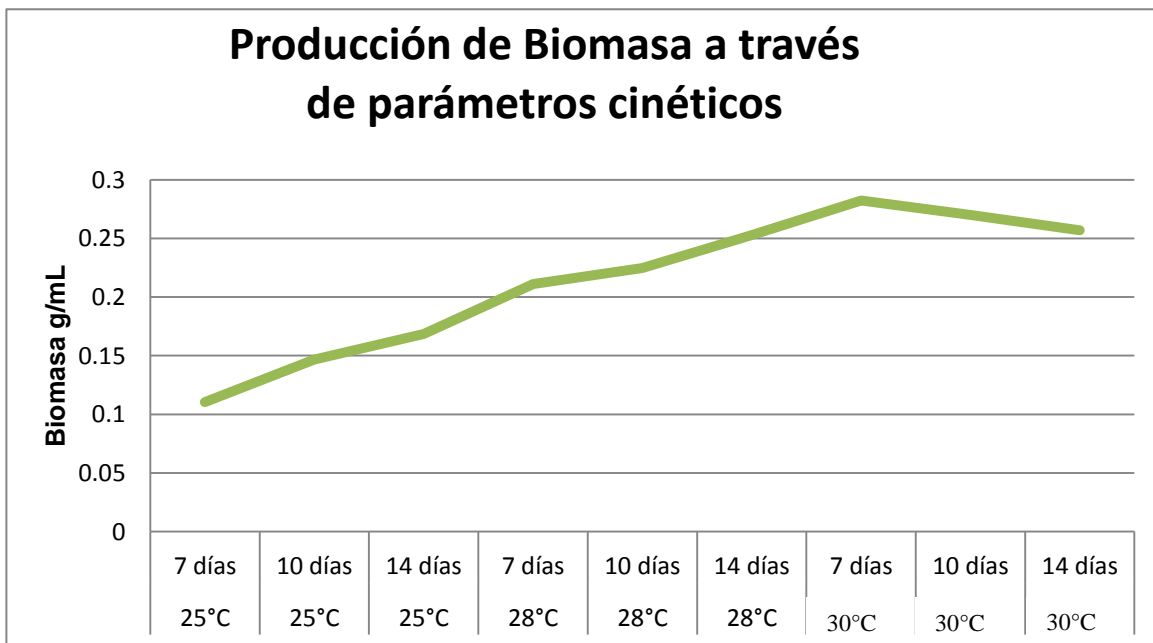


Figura 25. Efecto de las condiciones de cultivo en la producción de celulosa.

3.7 Incorporación y Reducción de la Sal Nitrato de Plata a las Membranas de Celulosa Bacteriana

Pre tratamiento a las membranas de celulosa bacteriana.

Se prosiguió el cultivo de la cepa B1 en medio RAE a una temperatura de 30 °C por un tiempo de incubación de 7 días, ya que se identificó como la mejor condición productora de celulosa bacteriana. El nuevo cultivo se realizó en Erlenmeyer con 50 mL de medio RAE como puede observarse en la Fig. 26, pasado los 7 días de incubación la membrana de celulosa formada en el Erlenmeyer da como resultado una capa homogénea superior gruesa de color amarillento y de textura cremosa, la membrana de celulosa bacteriana fue recolectada y lavada con

Hidróxido de sodio al 0.5 N, repitiendo el procedimiento 3 veces, posteriormente son nuevamente lavadas por agua destilada.



Figura 26. Película de celulosa bacteriana producida por la cepa B1 en Medio RAE.

Incorporación de Nitrato de Plata a las membranas de celulosa bacteriana.

Las membranas de celulosa bacteriana fueron tratadas por 4 soluciones con diferentes concentraciones de la sal precursora, Nitrato de plata las cuales son: 20 mM, 40 mM, 60 mM, 100 mM. Pasado el tiempo de reposo de 20 minutos se pudo observar un cambio ligero de coloración en todas las membranas de celulosa bacteriana, éste cambio de coloración se vio intensificado en las membranas de celulosa de acuerdo al aumento de concentración de la sal precursora con la cual se las iba tratando, por lo tanto como se muestra en la Fig. 27, la concentración mayor de 100 mM fue la que se observó con una coloración marrón más intensa.

Posteriormente se comprobó inicialmente la impregnación del Nitrato de plata en las diferentes membranas tratadas de celulosa bacteriana, ya que al momento

de realizar los diversos lavados las membranas no perdían totalmente la ligera coloración que adquirieron después de estar en contacto con la sal precursora.

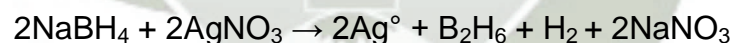


3.7.1. Síntesis de las nanopartículas de plata.

Figura 27. Membrana de celulosa bacteriana sumergida en solución de 100 mM de AgNO_3

Obtención de las nanopartículas de plata por reducción química del Nitrato de plata con Borohidruro de sodio.

Se usó Borohidruro de sodio (NaBH_4) 2 mM y Nitrato de plata (AgNO_3) 1 M, de acuerdo a la siguiente reacción:



Las membranas de celulosa bacteriana previamente tratada con Nitrato de plata y posteriormente puesta en contacto con el agente reductor Borohidruro de sodio dieron como resultado la reducción de la sal precursora dando paso a la formación de las nanopartículas de plata. Durante esta reacción se observó la formación de una pequeña espuma gris, la cual se diluyó rápidamente, observándose un cambio de coloración en la membrana de marrón a gris, el cual se mantuvo intensamente como podemos observar en la Fig. 28.

Después de ser secadas en la estufa las membranas de celulosa bacteriana presentaron una reducción de tamaño como consecuencia de la deshidratación

controlada que acaban de sufrir, al mismo tiempo la coloración grisácea se mantuvo sin presentar mayor cambio, dando como indicativo que la celulosa bacteriana es un buen soporte para las nanopartículas de plata.

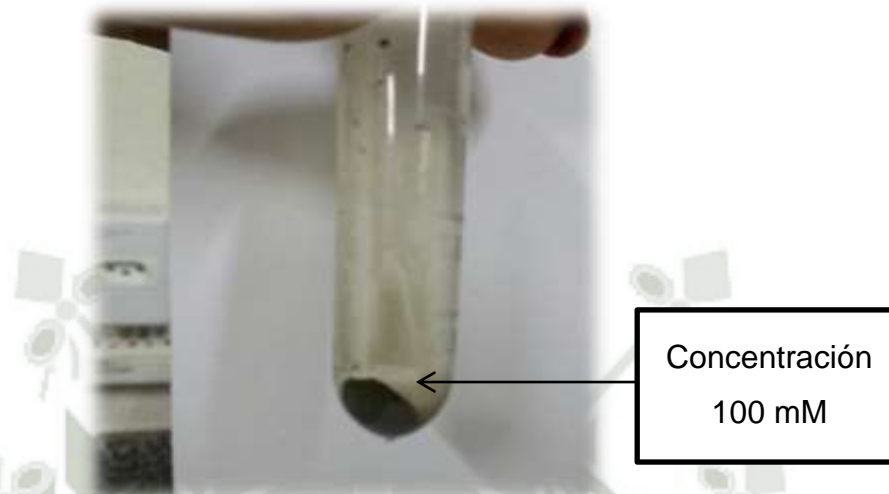


Figura 28. Membrana de celulosa bacteriana tratada con 100 mM de Nitrato de Plata reaccionando con Borohidruro de Sodio.

Impregnación de las nanopartículas de plata en celulosa bacteriana.

Debido a su estructura y de la reactividad que la celulosa ofrece frente a varios grupos funcionales, las membranas de celulosa son un soporte adecuado y por lo tanto escogido para el anclaje de las NPsAg. La celulosa bacteriana está constituida por puentes hidrógeno (C-H) interiormente. La reactividad química de la superficie de celulosa bacteriana es determinada principalmente por los grupos hidroxilos. Además de estos, se verifican también la presencia de oxidrilos en la superficie de la celulosa.

3.8 Incorporación de Cloruro de Oro a las Membranas de Celulosa Bacteriana

Las membranas de celulosa bacteriana fueron tratadas por 3 soluciones de diferentes concentraciones de la sal precursora Cloruro de oro las cuales son: 0.441 mM, 0.736 mM, 1.472 mM. Pasado el tiempo de reposo de 20 minutos se observó un cambio de coloración en todas las membranas de celulosa bacteriana, pasando de tener una coloración inicial blanquecina a una coloración mostaza-grisácea.

3.8.1. Síntesis de las nanopartículas de oro.

Obtención de las nanopartículas de oro por reducción química del Cloruro de oro con Borohidruro de sodio.

Se usó Borohidruro de sodio (NaBH_4) 2 mM y Cloruro de oro (AuCl_3) 0.147 M, de acuerdo a la siguiente reacción:



Las membranas de celulosa bacteriana previamente tratadas con Cloruro de oro y posteriormente con Borohidruro de sodio dieron como resultado la reducción de la sal precursora dando paso a la formación de las nanopartículas de oro. Durante esta reacción se observó la formación de una pequeña espuma, la cual se diluyó rápidamente, observándose un cambio de coloración en la membrana de mostaza a rojiza, el cual se mantuvo intensamente como podemos observar en la Fig. 29.

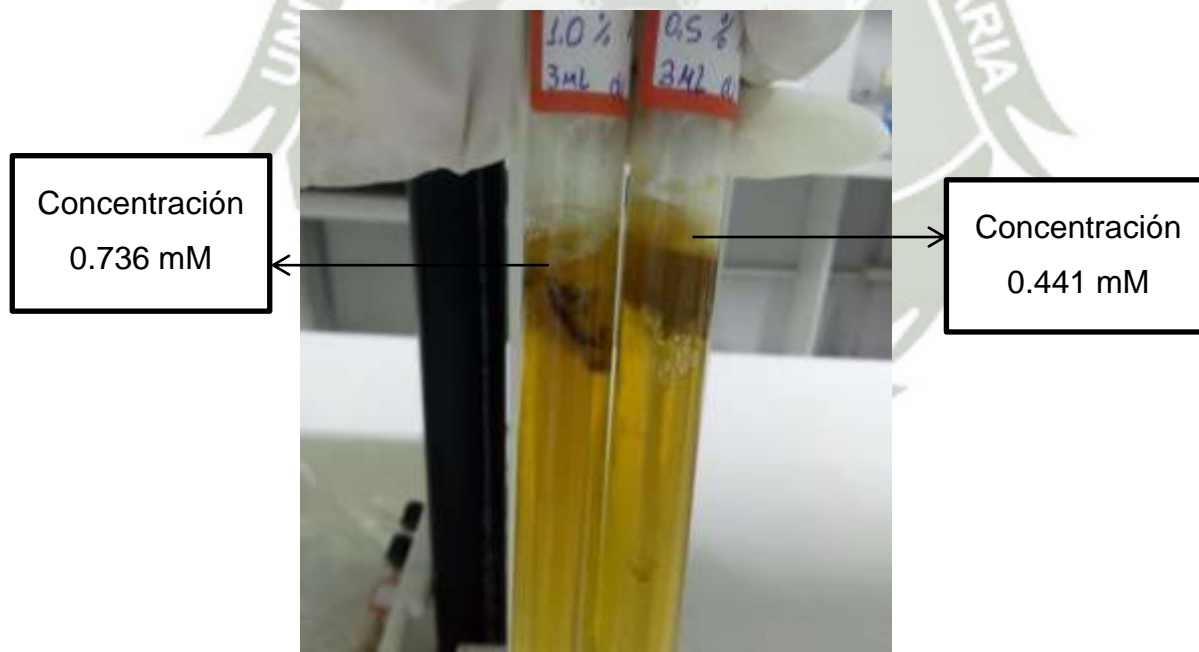


Figura 29. Membranas de celulosa bacteriana a concentraciones 0.441 mM y 0.736 mM.

Después de ser secadas en la estufa las membranas de celulosa bacteriana presentaron una reducción de tamaño como consecuencia de la deshidratación controlada que acaban de sufrir, al mismo tiempo la coloración rojiza se mantuvo sin presentar mayor cambio, dando como indicativo que la celulosa bacteriana es un buen soporte para las nanopartículas de oro.

3.9 Caracterización Estructural de la Celulosa Bacteriana

3.9.1. Infrarrojo.

Las membranas de celulosa obtenidas fueron analizadas por un espectrofotómetro FT-IR, el rango de trabajo fue de $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$. En la Fig. 30 se observa la presencia de los grupos funcionales característicos de la celulosa.

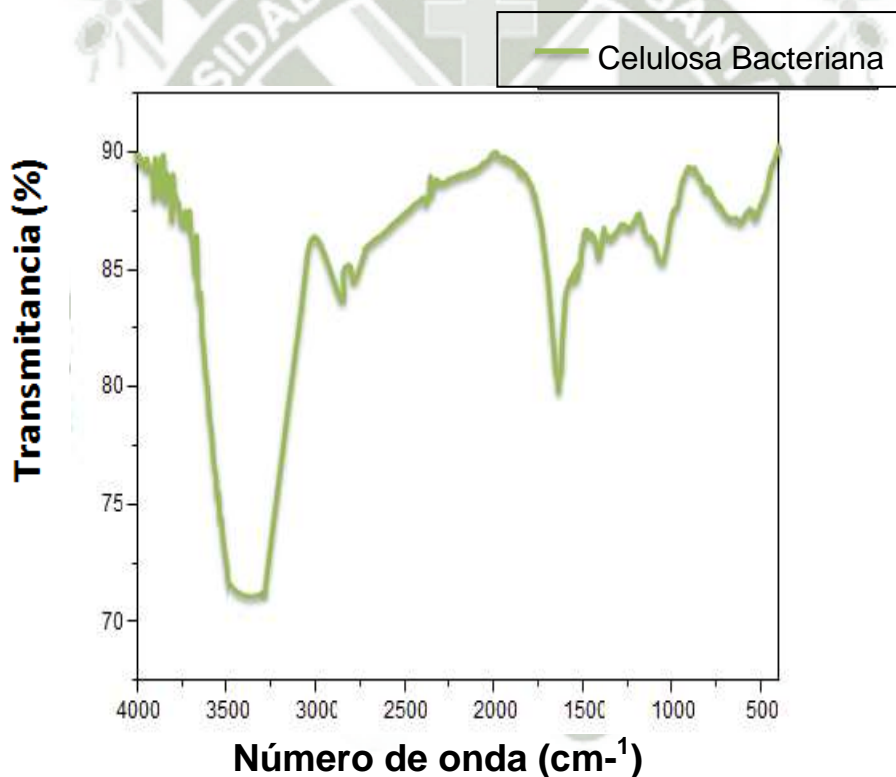


Figura 30. Espectro FT-IR de celulosa bacteriana.

Se reporta la presencia de espectros en 1000 cm^{-1} para deformaciones axiales de los enlaces C-C y 1100 cm^{-1} para C-O, la vibración de los grupos C-O-C se asocia a las banda entre 1500 y 1600 cm^{-1} , la banda a $1650-1700 \text{ cm}^{-1}$

pertenece al enlace carbonilo C=O, las bandas a 2890 cm^{-1} son atribuidas a los enlaces C-H, y la absorción alrededor de 3330 cm^{-1} se asocia al enlace OH, además la forma de las bandas de 4000 , 1430 , y 900 cm^{-1} se relaciona con el orden o desorden en la morfología de la celulosa bacteriana y está relacionada con la cantidad de celulosa cristalina. La absorción entre 897 y 1429 cm^{-1} pertenece al “tijereteo” del enlace CH_2 y confirman la presencia de la estructura de la celulosa tipo I. Los picos a 1372 cm^{-1} perteneciente a la deformación angular del enlace C-H.

3.9.2. Microscopía electrónica de barrido (MEB).

En la Fig. 31 se puede observar la membrana de celulosa bacteriana compacta con una superficie regular, también muestra la celulosa en varias capas muy finas lo que nos da una idea de la estabilidad de su estructura, también nos indican claramente que las muestras son de celulosa por la forma en la que se muestran las cadenas y las microfibrillas. Se pueden observar que existen espacios entre las fibras y cadenas de la celulosa bacteriana, lo cual le confiere la capacidad de absorción y permeabilidad de gases lo que la hace un material muy usado en medicina con funciones como regenerador de piel en quemaduras, adhesividad, relleno, formación de la película, como dispersante, estabilizador de micropartículas de liberación prolongada.

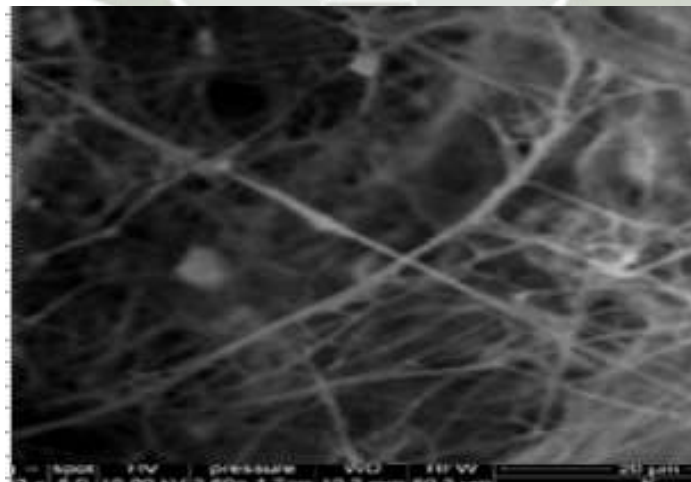


Figura 31. Imagen obtenida por microscopía electrónica de barrido (MEB) de celulosa.

3.10. Caracterización Estructural de las Nanopartículas de Plata

3.10.1. Evaluación de la presencia de las nanopartículas obtenidas por UV-visible.

Esta técnica permitió corroborar la presencia de nanopartículas de plata en las síntesis llevadas a cabo, a partir de estos resultados se realizaron los análisis instrumentales posteriores. En la Tabla 13 se muestran los resultados del análisis por espectrometría UV-Visible de las 4 muestras sintetizadas (20 mM, 40 mM, 60 mM, 100 mM), se incluyen los valores de la longitud de onda máxima y su absorbancia, obteniéndose como promedio de absorción máxima 392.5 nm con una desviación estándar de 2.6. Los valores de absorbancia máxima obtenidos para cada síntesis se encuentran dentro del rango 350 – 450 nm, que nos indican la presencia de las nanopartículas de plata, lo cual es reportado según Kadir.⁵⁵

A continuación, en la Fig. 32 se muestra el espectro UV-Vis de las nanopartículas de plata sintetizadas. Al comparar los espectros, se diferencia claramente la forma de los picos de absorción para cada tipo de concentración, en el caso de las concentraciones 20 mM y 40 mM, los picos se muestran simétricos y estrechos, sugiriendo que la distribución de tamaño de nanopartículas es uniforme, es decir, son monodispersas. En el caso de las concentraciones 60 mM y 100 mM, se observa que los picos son más anchos, lo que indica que existe amplia distribución en el tamaño de nanopartículas, siendo polidispersas. Además, estos datos también permiten determinar el tamaño de partícula basado en el valor del pico de absorción máxima, según la Tabla 14 reportada por Pradeed.

Como resumen de los resultados del análisis de las nanopartículas de plata por espectroscopia UV-Vis, encontramos que el pico de absorción máxima promedio es 392 nm, lo que corresponde a nanopartículas cuyo tamaño está en el rango de 10 a 14 nm, en todos los casos de diferentes concentraciones que se evaluaron. El tamaño real de las nanopartículas se comprobó con microscopía electrónica de barrido, sin embargo este análisis espectroscópico es una prueba preliminar para conocer la distribución y tamaño de las AgNPs sintetizadas.

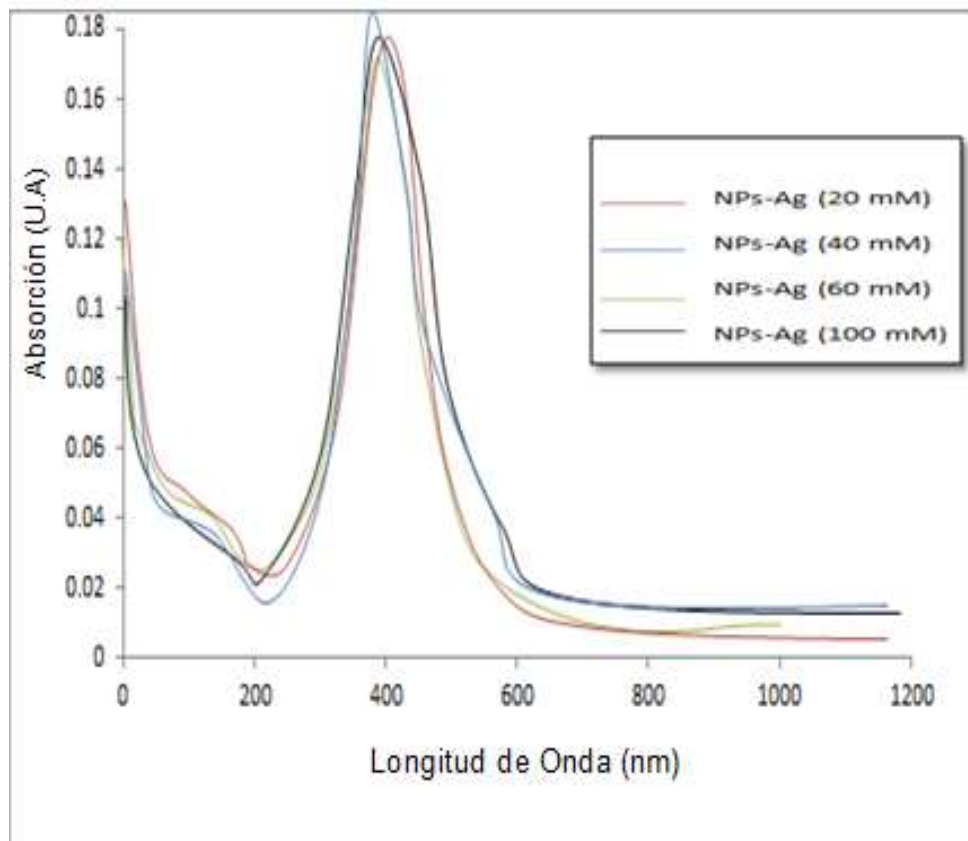


Figura 32. Espectro UV-Vis nanopartículas de plata sintetizadas.

Tabla 13. Espectros UV-Vis obtenidos en la síntesis de nanopartículas de plata realizadas.

Síntesis (mM)	Pico de Absorción Máximo (nm)	Absorbancia (U.A)
20 mM	397.0	0.178
40 mM	390.0	0.18
60 mM	389.0	0.17
100 mM	394.0	0.177

Tabla 14. Posición de los picos de absorción de nanopartículas de plata de diferente tamaño en el espectro UV-visible.

Tamaño de Partículas (nm)	Posición del Pico (nm)
10-14	400
35-50	430
60-80	438

3.10.2. Evaluación de la presencia de las nanopartículas obtenidas por infrarrojo.

El análisis por espectroscopia FT-IR se llevó a cabo para identificar las moléculas responsables de la reducción y estabilización de las nanopartículas de plata sintetizadas en la celulosa bacteriana.

A continuación en las Figs. 33 y 34 se muestran los espectros FT-IR de cada concentración de las nanopartículas de plata sintetizadas. En los espectros se observa la banda correspondiente al estiramiento del enlace entre O–H alrededor de 3385.40 cm^{-1} , este pico se relaciona con la reacción de los grupos OH del Borohidruro de sodio y los iones de plata. Las bandas ubicadas entre 2957.94 y 2850.55 cm^{-1} se forman debido al estiramiento del enlace en CH_2 , la banda ubicada en 1646.92 cm^{-1} corresponde a la presencia del NO_3^- proveniente de la sal precursora. Se evidencia las bandas a los 1397.81 y 1019.48 cm^{-1} que pertenecen a las oscilaciones del grupo C–OH. Las bandas correspondientes al estiramiento del enlace C–C se encuentran ubicadas entre 952.37 y 906.63 cm^{-1} .

Los grupos funcionales detallados producen la reducción de la sal precursora empleada, además del papel como agente estabilizante de la celulosa.

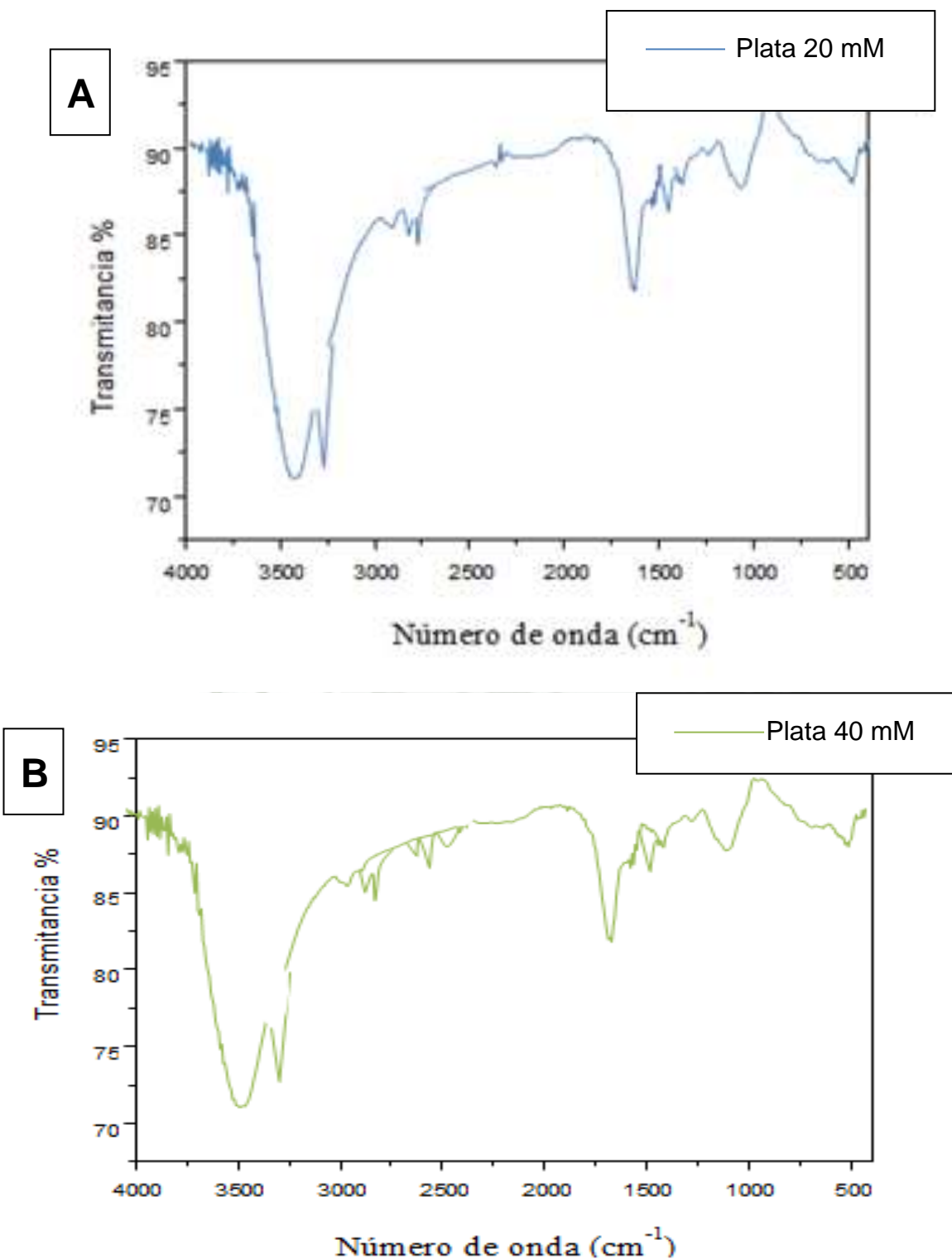


Figura 33. Espectro FT-IR de las nanopartículas de plata. A. Concentración de 20 mM. B. Concentración de 40 mM.

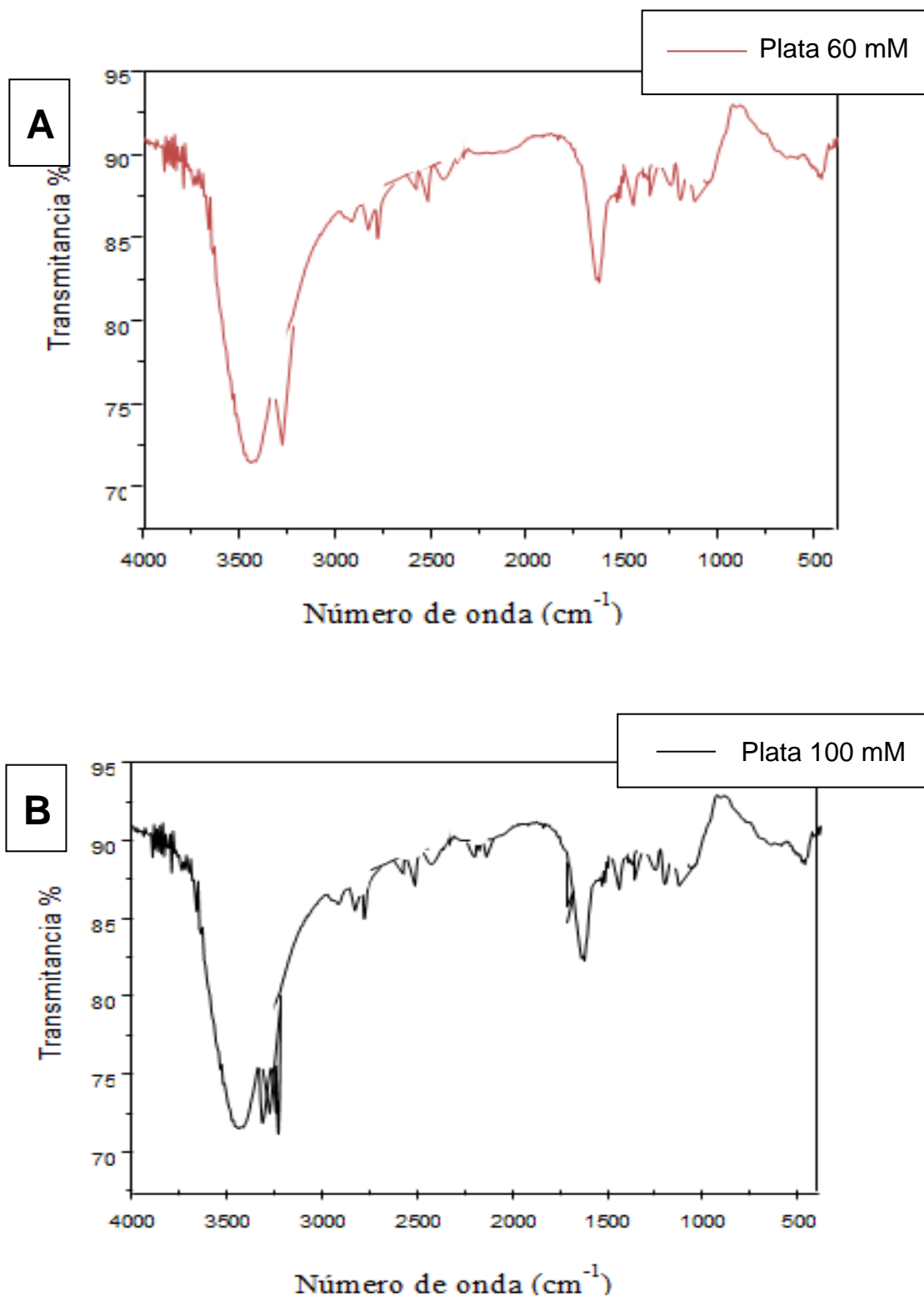


Figura 34. Espectro FT-IR de las nanopartículas de plata. A. Concentración de 60 mM. B. Concentración de 100 mM.

3.10.3. Evaluación de la presencia de las nanopartículas obtenidas por microscopía electrónica de barrido.

La microscopía electrónica de barrido nos permitió conocer la morfología y tamaño de las nanopartículas sintetizadas en sus diferentes concentraciones. Como se puede observar en las Figs. 35, 36 y 37 las nanopartículas presentaron forma pseudo esféricas con bordes irregulares, a medida que la concentración de la sal precursora de plata aumentaba se evidenció agregación, la agregación observada podría surgir por la presencia de contaminantes en la preparación de la muestra o como resultado de las condiciones de síntesis lo que indica que a mayor concentración el tamaño de las nanopartículas es mayor generando como consecuencia un aumento en su inestabilidad y mayor facilidad para la formación de agregados. Se observa también que a pesar de estas características la celulosa bacteriana es un soporte estabilizante efectivo ya que logró conservar sus propiedades iniciales, logró una buena distribución de las NPsAg en la superficie casi homogénea y una gran adhesión a las NPsAg siendo resistentes a tratamientos mecánicos. El tamaño de las NPsAg se encuentra en el rango de 9 a 15 nm, lo que coincide con los resultados de UV-Vis y los propuestos por otras investigaciones.

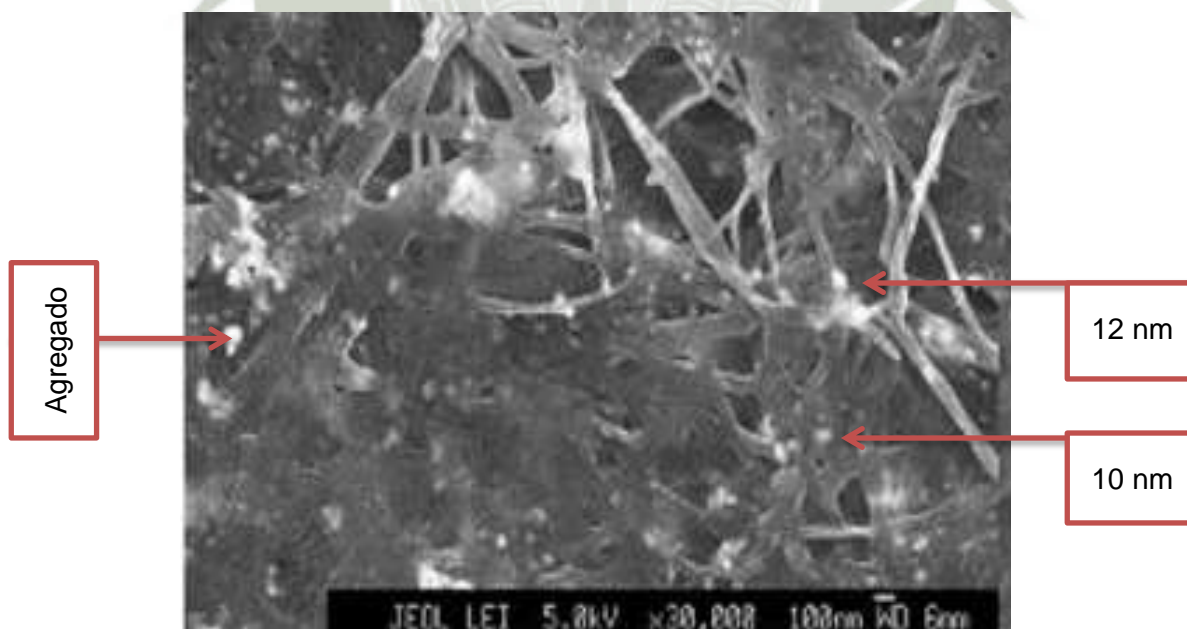
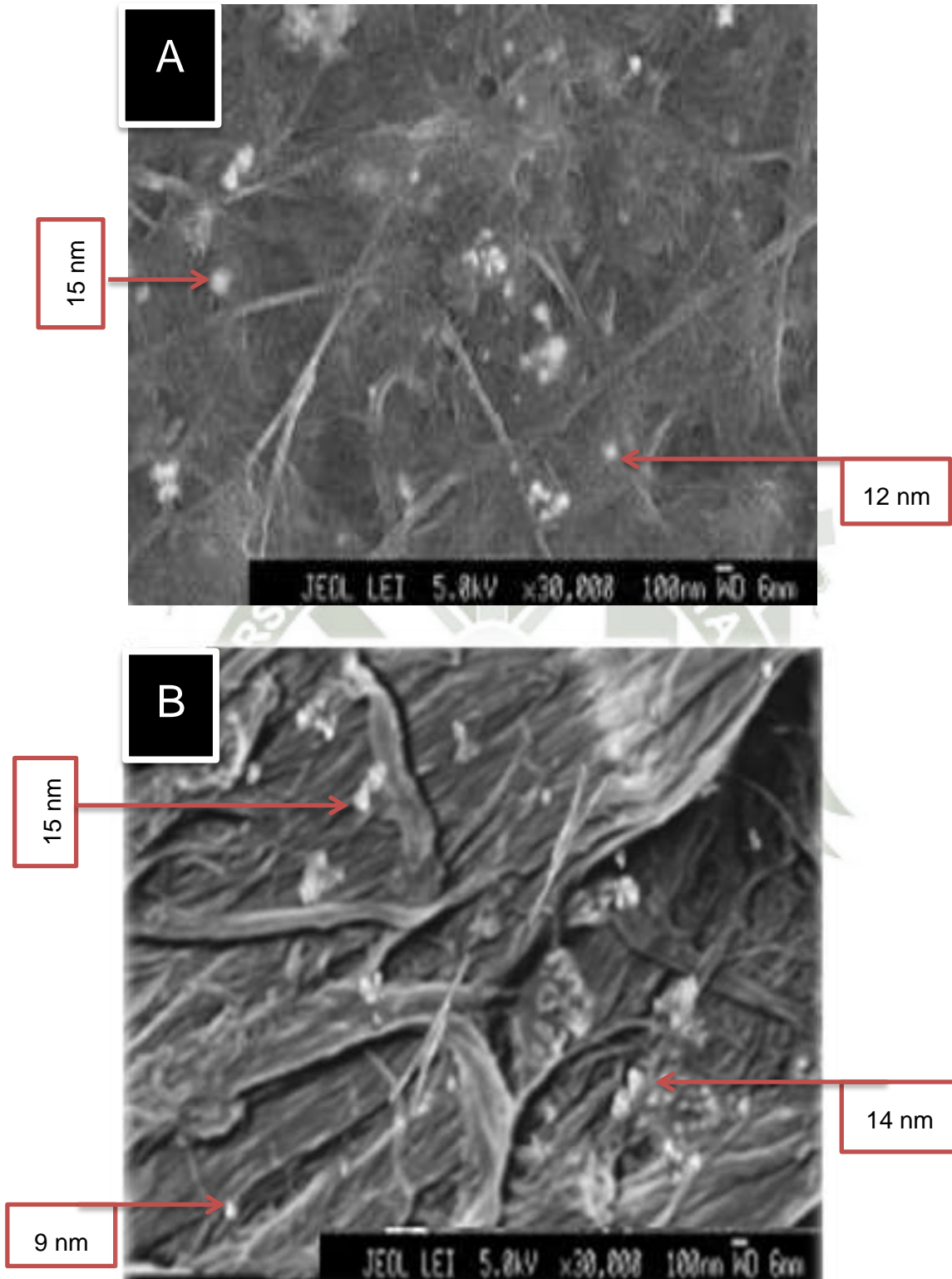


Figura 35. Imagen obtenida por microscopía electrónica de barrido a 20 mM.



**Figura 36. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido.
A. Concentración de 40 mM. B. Concentración de 60 mM.**

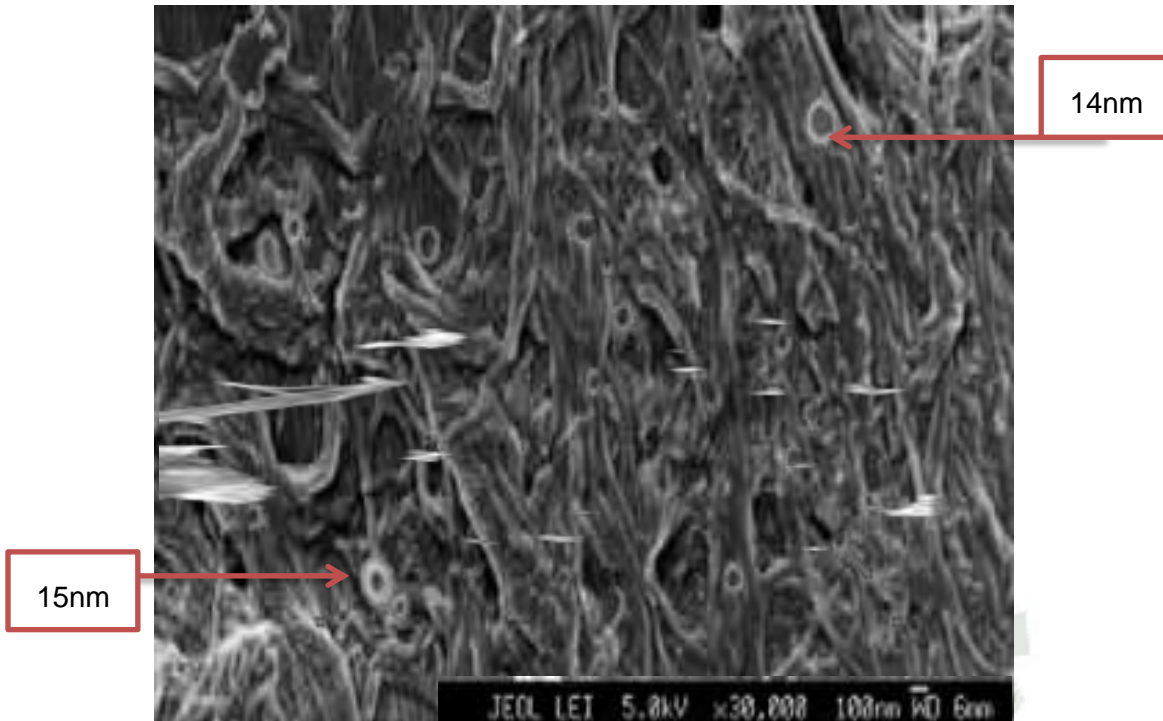


Figura 37. Imagen obtenida por microscopía electrónica de barrido a 100 mM.

Se puede observar la superficie de las capas de celulosa bacteriana, mostrando una estructura alterna entre regiones ordenadas y otras con menor orden o incluso amorfas, pero en todas las regiones se observa una estructura compacta, esto debido al pre tratamiento con Hidróxido de sodio al 0.5 N, lo cual suele compactar mucho más las capas; es en las regiones con mayor orden que la membrana suele ser más cristalina, así mismo se logra observar las microfibrillas que son las que proporcionan la resistencia a la membrana.

3.11 Caracterización Estructural de las Nanopartículas de Oro

3.11.1. Evaluación de la presencia de las nanopartículas obtenidas por UV.

La espectroscopia en la región UV-Vis fue utilizada para el monitoreo de la formación de nanopartículas de oro en la celulosa bacteriana, analizando esto a través de bandas plasmónicas características. Además de eso, esta técnica es importante en el estudio de la estabilidad del nano compuesto. En la Tabla 15 se muestran los resultados del análisis por espectrometría UV-Visible de las 3

muestras sintetizadas, se incluyen los valores de la longitud de onda máxima y su absorbancia, obteniéndose como promedio de absorción máxima 528.5 nm con una desviación estándar de 3 nm.

A continuación, en la Fig. 38 se muestra el espectro UV-Vis obtenido de las nanopartículas de oro sintetizadas. Después de la síntesis las soluciones presentaron una coloración rojiza/rosa para soluciones con nanopartículas de oro y fueron obtenidos los siguientes espectros de absorción. Los espectros de absorción generados son debidos al fenómeno de confinamiento cuántico generado, causando el surgimiento de bandas plasmónicas de superficie resultando en una longitud de onda resonante único, que corresponde a la banda de absorción plasmónica mencionada, se puede verificar la formación de esta banda característica en todas las concentraciones que fueron medidas. El espectro de UV-Vis para todas las muestras mostro una banda de absorción promedio en 528.5 nm, las diferencias en los picos pueden estar relacionados por ejemplo a la diferencia del tamaño entre las tres concentraciones de las soluciones preparadas. Los valores de absorbancia máxima obtenidos para cada síntesis se encuentran en el rango de 527-530 nm lo que nos indican la presencia de las nanopartículas de oro de alrededor de 10 nm de diámetro, lo cual deberá ser corroborado mediante microscopía electrónica de barrido.

Tabla 15. Espectros UV-Vis obtenidos en la síntesis de nanopartículas de oro realizadas.

Síntesis (mM)	Pico de absorción máximo (nm)	Absorbancia (U.A)
0.441	530.0	0.45
0.736	525.0	0.43
1.472	530.0	0.48

Al comparar los espectros, se diferencia claramente la forma de los picos de absorción para cada tipo de concentración, en el caso de la concentración 0.441 mM y 0.736 mM, los picos se muestran estrechos y menor absorbancia, sugiriendo que la distribución de tamaño de nanopartículas es uniforme. En el caso de la mayor concentración 1.472 mM, se observa que el pico es más ancho y uniforme, lo que indica que existe amplia distribución en el tamaño de nanopartículas siendo polidispersas.

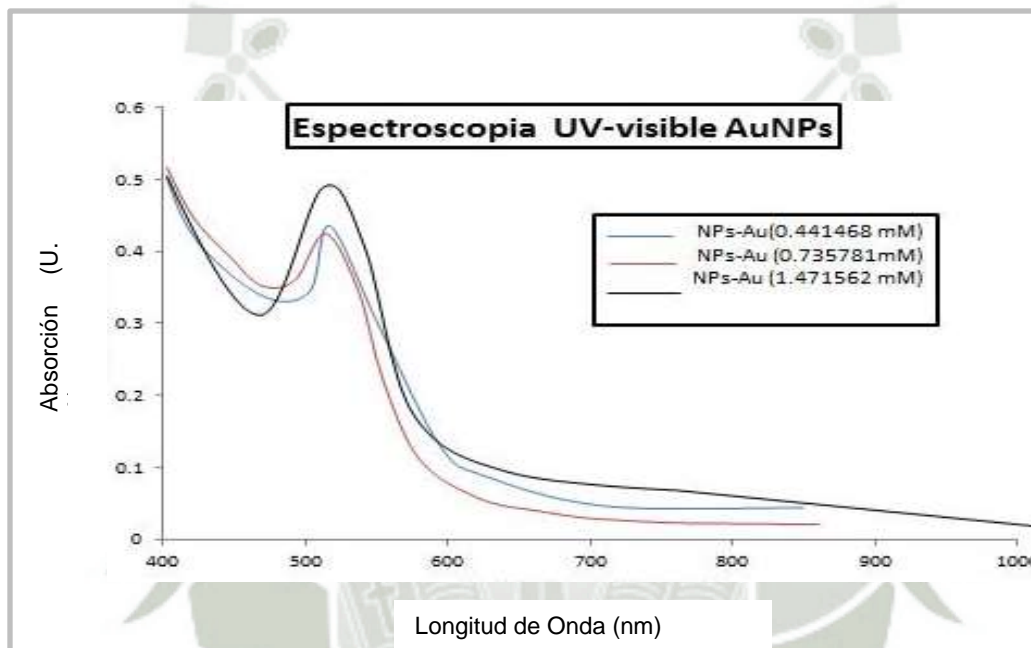


Figura 38. Espectro UV-Vis nanopartículas de oro sintetizadas.

3.11.2. Evaluación de la presencia de las nanopartículas obtenidas por Infrarrojo.

El análisis por espectroscopia FT-IR se llevó a cabo para mostrar e identificar las ligaciones químicas entre las moléculas responsables de la reducción y estabilización de las nanopartículas de oro sintetizadas en la celulosa bacteriana. A continuación en las Figs. 39 y 40 se muestran los espectros FT-IR de cada concentración de las nanopartículas de oro sintetizadas. Las muestras presentan una banda intensa de absorción en de 3385.40 cm^{-1} correspondiente al enlace O-H, relacionado con los iones de oro y celulosa bacteriana, también presenta un pico de absorción en 1697 cm^{-1} , la cual es atribuida a un modo de vibración simétrica del

grupo C=O presente en tioles. Las soluciones también presentaron banda de baja intensidad de absorción en 1603 y 1509 cm^{-1} correspondiendo a los modos de vibración tipo tijeras y el balance del NH_3^+ , La disminución de estas bandas posiblemente sea debido a una interacción del NH_3 con la celulosa bacteriana.

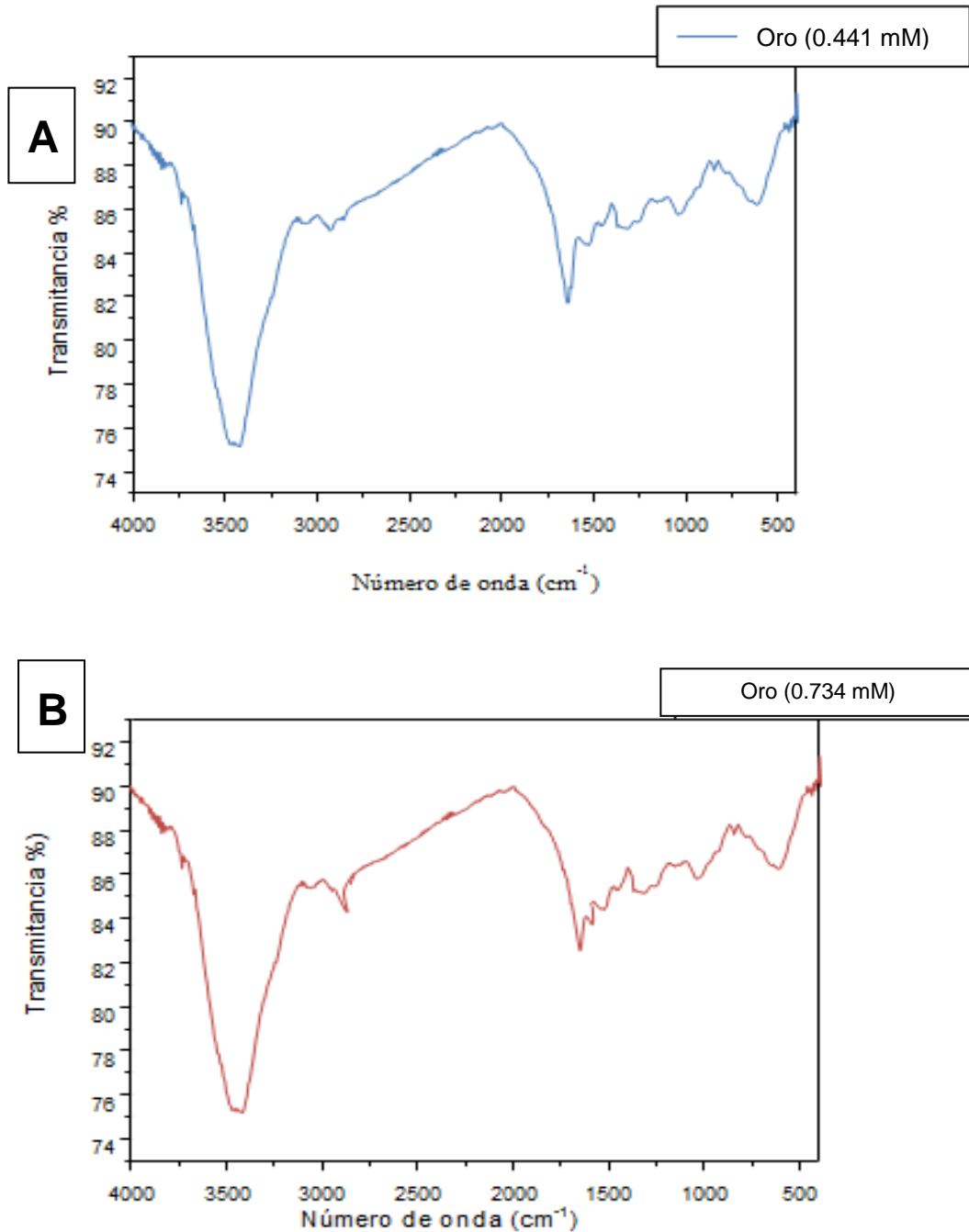


Figura 39. Espectro FT-IR de las nanopartículas de oro. A. Concentración de 0.441 mM. B. Concentración de 0.734 mM.

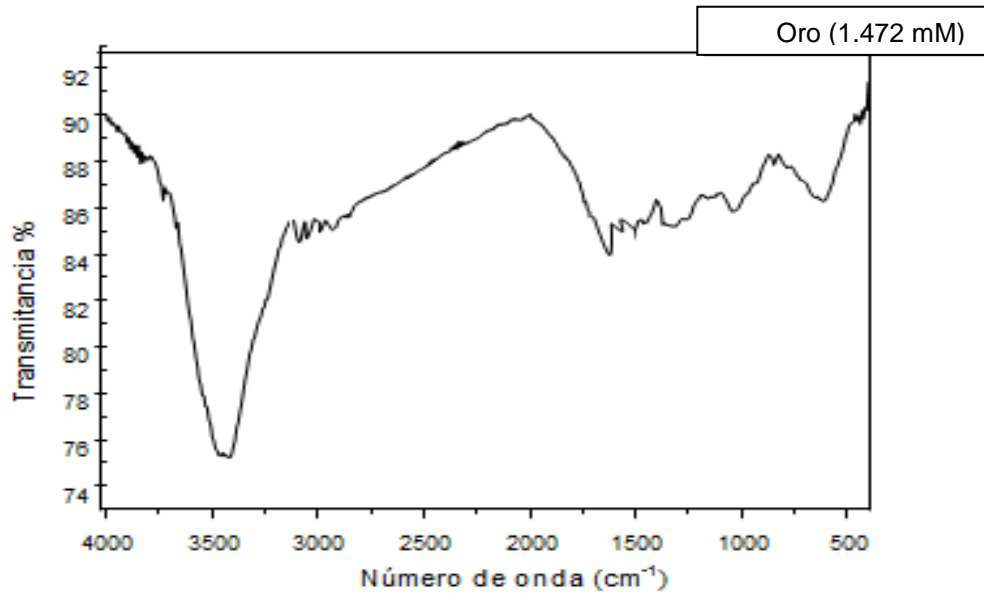


Figura 40. Espectro FT-IR de las nanopartículas de oro a concentración 1.472 mM.

En las soluciones se puede notar un alargamiento de la vibración simétrica en los grupos de los grupos N-H del NH_3^+ , en $2900\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$, a través de estos espectros imaginamos que las nanopartículas están unidas a los tioles por el azufre, así también la banda en 1404 cm^{-1} puede ser referente al modo de vibración simétrica del ión carboxilato (C=O), en cuanto a la banda en 1184 cm^{-1} corresponde a un modo de vibración C-N presente en las nanopartículas formadas por la ligación entre el tiol y la celulosa bacteriana.

3.11.3. Evaluación de la presencia de las nanopartículas obtenidas por microscopía electrónica de barrido.

La microscopía electrónica de barrido nos permitió visualizar la distribución y el tamaño de las nanopartículas así como su morfología de las nanopartículas sintetizadas en sus 3 diferentes concentraciones. Las imágenes de la microscopía electrónica de barrido de la suspensión de nanopartículas de oro se muestran en las Figs. 41 y 42, donde podemos confirmar la formación de las nanopartículas. Las micrografías muestran una población de partículas de un diámetro promedio de 8-12 nm lo que coincide con los resultados UV-Vis. Las partículas muestran

una muy buena dispersión, lo que nos sugiere que el Borohidruro de sodio además de actuar como agente reductor, también está actuando como un agente protector de las nanopartículas evitando la coalescencia de las mismas. Así mismo se pudo observar que la forma de las nanopartículas tiende a ser esférica. Las nanopartículas de oro en sus 3 concentraciones no presentaron muchas variaciones ni irregularidades, esto hace referencia que el aumento de concentración no fue considerable para evidenciar estos cambios o diferencias, se observa también que las características de la celulosa bacteriana se mantienen, se comprobó que es un soporte estabilizante efectivo ya que no modificó las propiedades de las nanopartículas, así mismo se logró una buena distribución de las nanopartículas de oro en la superficie con una gran adhesión de las mismas, siendo resistentes a tratamientos. Las imágenes de las membranas muestran membranas compactas, mostrando la celulosa en capas muy finas y homogéneas lo que nos da una idea de lo estable de la estructura, todas las membranas de las figuras muestran estructuras similares entre sí, los resultados nos indican claramente que las muestras son de celulosa por la forma en la que se muestran las cadenas y microfibrillas.

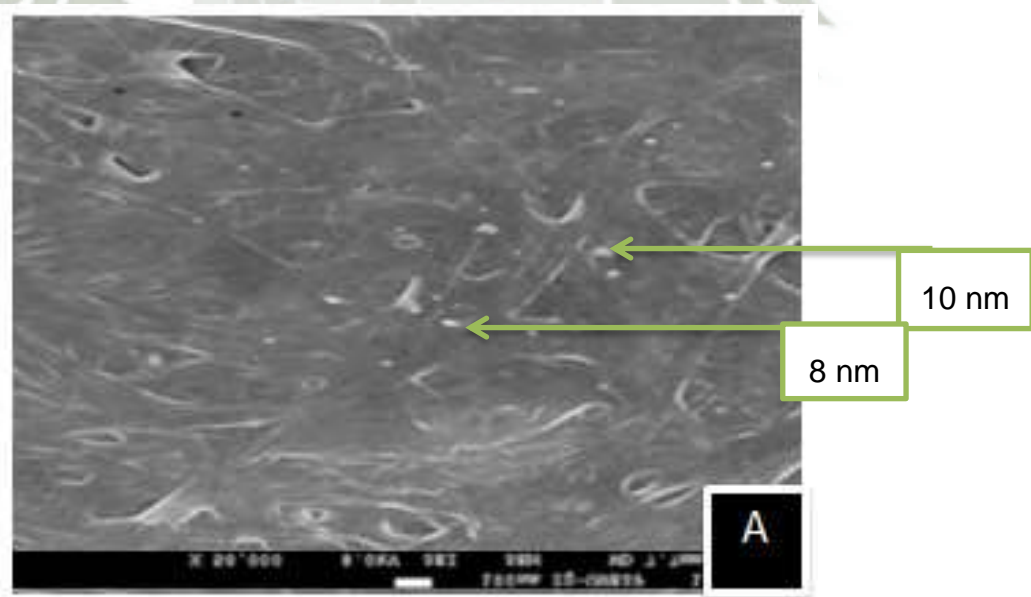


Figura 41. Imagen obtenida por microscopía electrónica de barrido de nanopartículas de oro a concentración 0.442 mM.

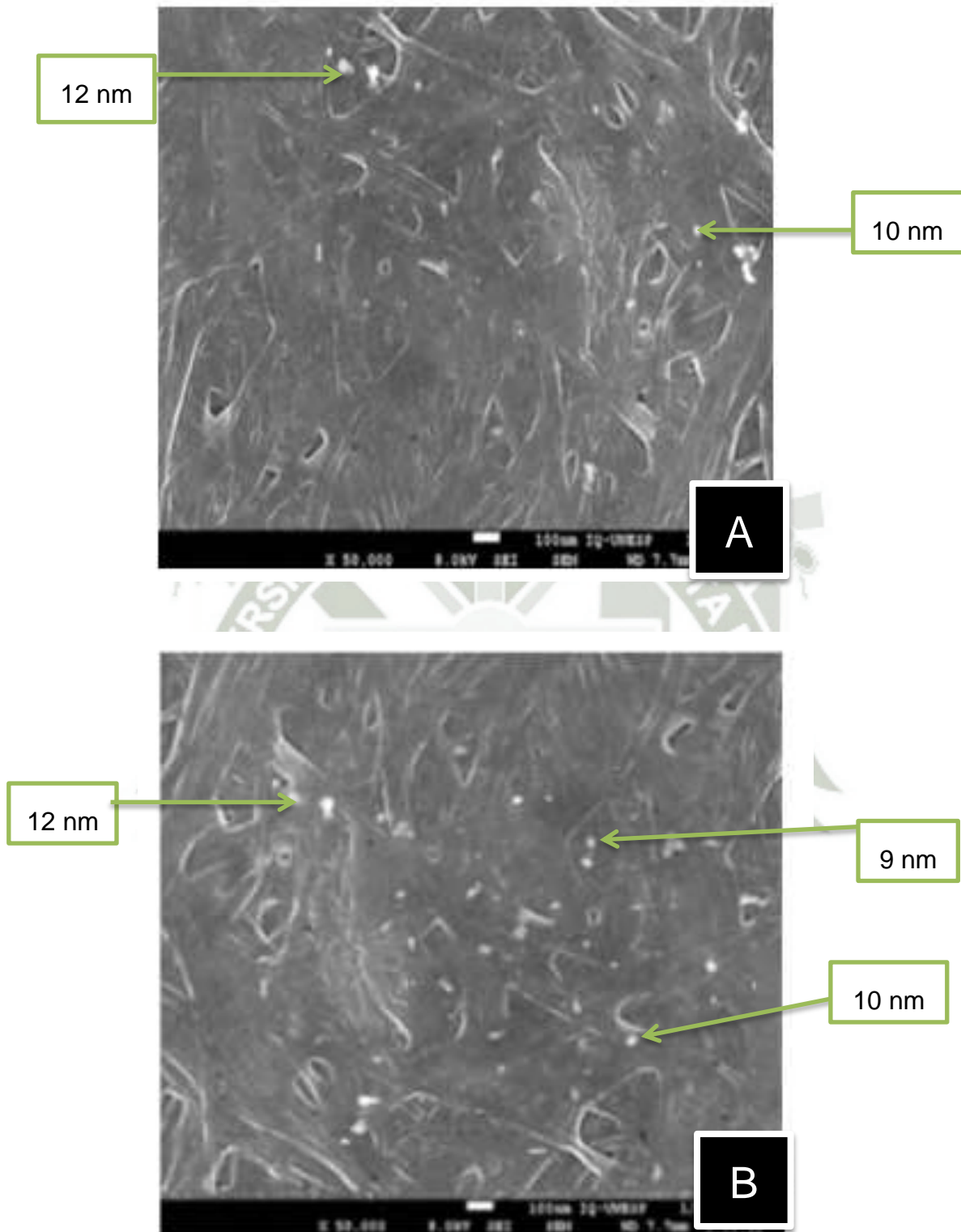


Figura 42. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido de nanopartículas de oro. A. Nanopartículas de oro a concentración 0.736 mM. B. Nanopartículas de oro a concentración 1.471 mM.

3.12 Evaluación de la Actividad Antimicrobiana

3.12.1. Test concentración mínima inhibitoria.

Los cultivos bacterianos (*Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*) que fueron cultivados en placas Petri conteniendo agar Mueller Hinton en condiciones de cultivo a 37 °C por 24 horas fueron retirados para su posterior análisis. Posteriormente, las colonias aisladas fueron suspendidas en solución salina 0.90%(m/v), alcanzando una densidad óptica (DO) entre 0.15 y 0.18 que corresponde a 1.5×10^8 microorganismos/mL en la escala de Mac Farland 0.5. Las muestras de AgNPs-CB y AuNPs-CB fueron dispersadas en 9.9 mL de agua destilada (0.1%(m/v)) alcanzando un volumen final de 10 mL y mantenidas en ultrasonido de baño por 20 minutos para garantizar su completa dispersión.

La concentración inicial de las AgNPs-CB fue 100 mM y de AuNPs-CB fue 1.472 mM. Una alícuota de 100 µl de la suspensión bacteriana fue inoculada con 1000 µl del caldo Mueller Hinton en cada pozo y seguidamente se realizó una homogenización, se añadió una alícuota de 100 µl de las suspensiones iniciales de AgNPs-CB y AuNPs-CB en la primera fila. A partir de la primera fila que fue iniciada la dilución seriada hasta el final de la placa, para esto se utilizó una pipeta multicanal. El control negativo fue preparado en la primera columna, con la sola presencia del caldo Mueller Hinton, con la finalidad de garantizar que el caldo se encuentre totalmente inocuo. El control positivo fue preparado en la segunda y tercera columna, con la presencia de caldo Mueller Hinton y la respectiva carga bacteriana (*Pseudomona aeruginosa* o *Staphylococcus aureus*), esto con la finalidad de comprobar que dichas bacterias presentan un crecimiento normal en este medio de cultivo. Todo el procedimiento se realizó por triplicado. Terminado el procedimiento las placas fueron incubadas a 37 °C por 24 horas para su posterior análisis. A continuación en la Tabla 16 podemos observar los resultados obtenidos para la bacteria Gram positiva y en la Tabla 17 los resultados obtenidos para la bacteria Gram negativa. De manera general podemos decir que la bacteria *Staphylococcus aureus* demostró inhibición del crecimiento bacteriano a la concentración de 10 mM de la muestra inicial de 160 mM de plata, lo que equivale a

un CMI de 40 $\mu\text{g/mL}$, para la muestra inicial de concentración 120 mM las AgNPs las bacterias mostraron una inhibición en la concentración de 15 mM, que equivale a un CMI de 60 $\mu\text{g/mL}$, por lo tanto tomamos 40 $\mu\text{g/mL}$ como CMI final para las AgNPs en la bacteria *Staphylococcus aureus*. Para las Nanopartículas de oro en la muestra inicial de 1.48 mM se mostró una inhibición en el crecimiento bacteriano a una concentración de 0.74 mM, lo que equivale a un CMI igual a 2.96 $\mu\text{g/mL}$. Para el caso de la concentración de 0.88 mM la inhibición bacteriana se mostró a una concentración de 0.44 mM, lo que equivale a un CMI de 1.76 $\mu\text{g/mL}$ por lo tanto tomaremos como CMI final la concentración de 1.76 $\mu\text{g/mL}$. Estos resultados obtenidos para nanopartículas de plata y oro se muestran a continuación en las Figs. 43 y 44.

Tabla 16. Resultados de la concentración mínima inhibitoria de nanopartículas de plata y oro en la bacteria *Staphylococcus aureus*.

	Ag				Au				
	(mM)	($\mu\text{g/mL}$)	(mM)	($\mu\text{g/mL}$)	(mM)	($\mu\text{g/mL}$)	(mM)	($\mu\text{g/mL}$)	
A	120	480	160	640	A	1.48	5.92	0.88	3.52
B	60	240	80	320	B	0.74	2.96	0.44	1.76
C	30	120	40	160	C	0.37	1.48	0.22	0.88
D	15	60	20	80	D	0.18	0.74	0.11	0.44
E	7.5	30	10	40	E	0.09	0.37	0.055	0.22
F	3.75	15	5	20	F	0.045	0.19	0.027	0.11
G	1.9	7.5	2.5	10	G	0.02	0.09	0.013	0.06
H	0.934	3.7	1.25	5	H	0.01	0.05	0.007	0.03

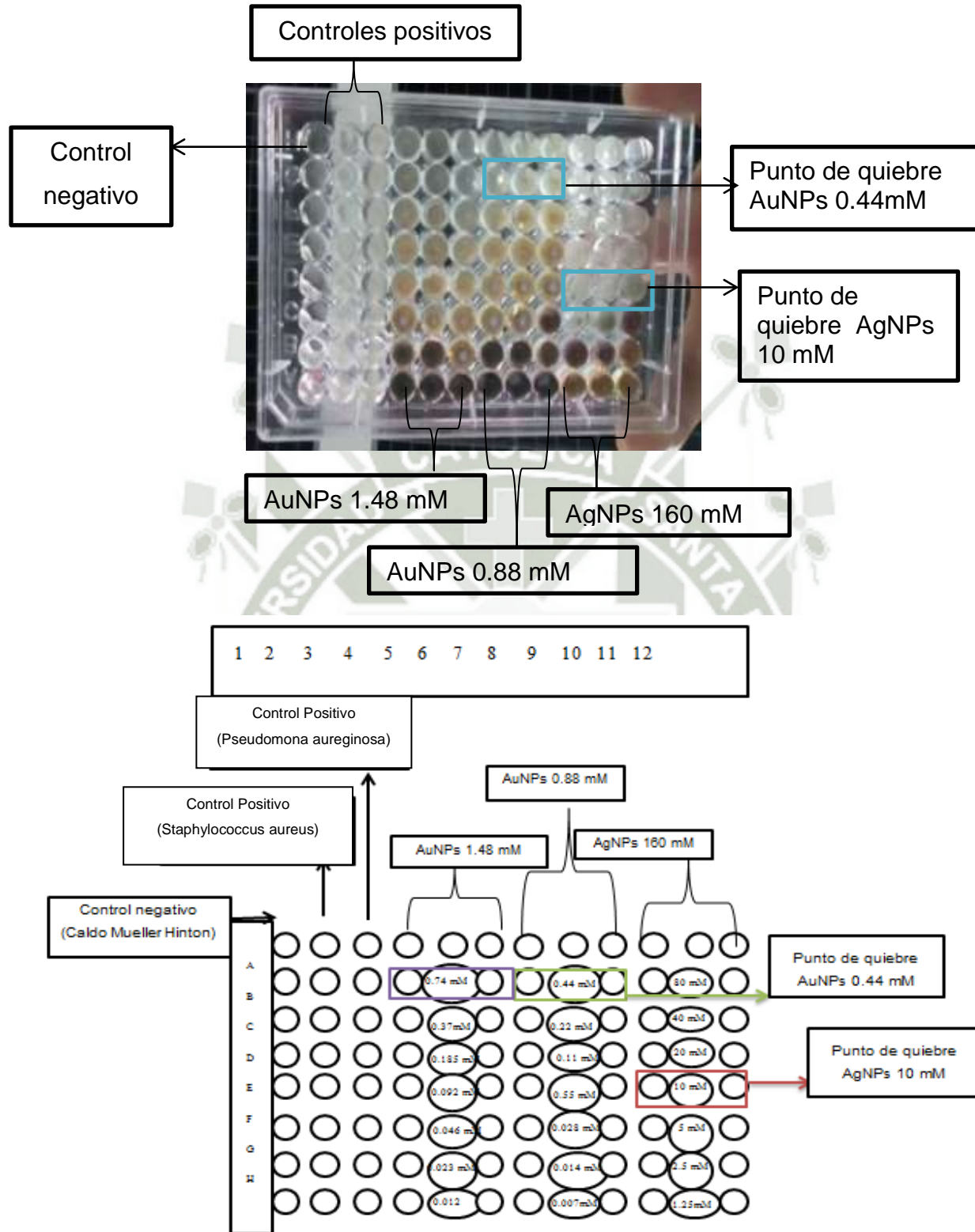


Figura 43. Imagen de la placa de pozos cultivada para la determinación de la concentración mínima inhibitoria de nanopartículas de plata y oro para *Staphylococcus aureus*.

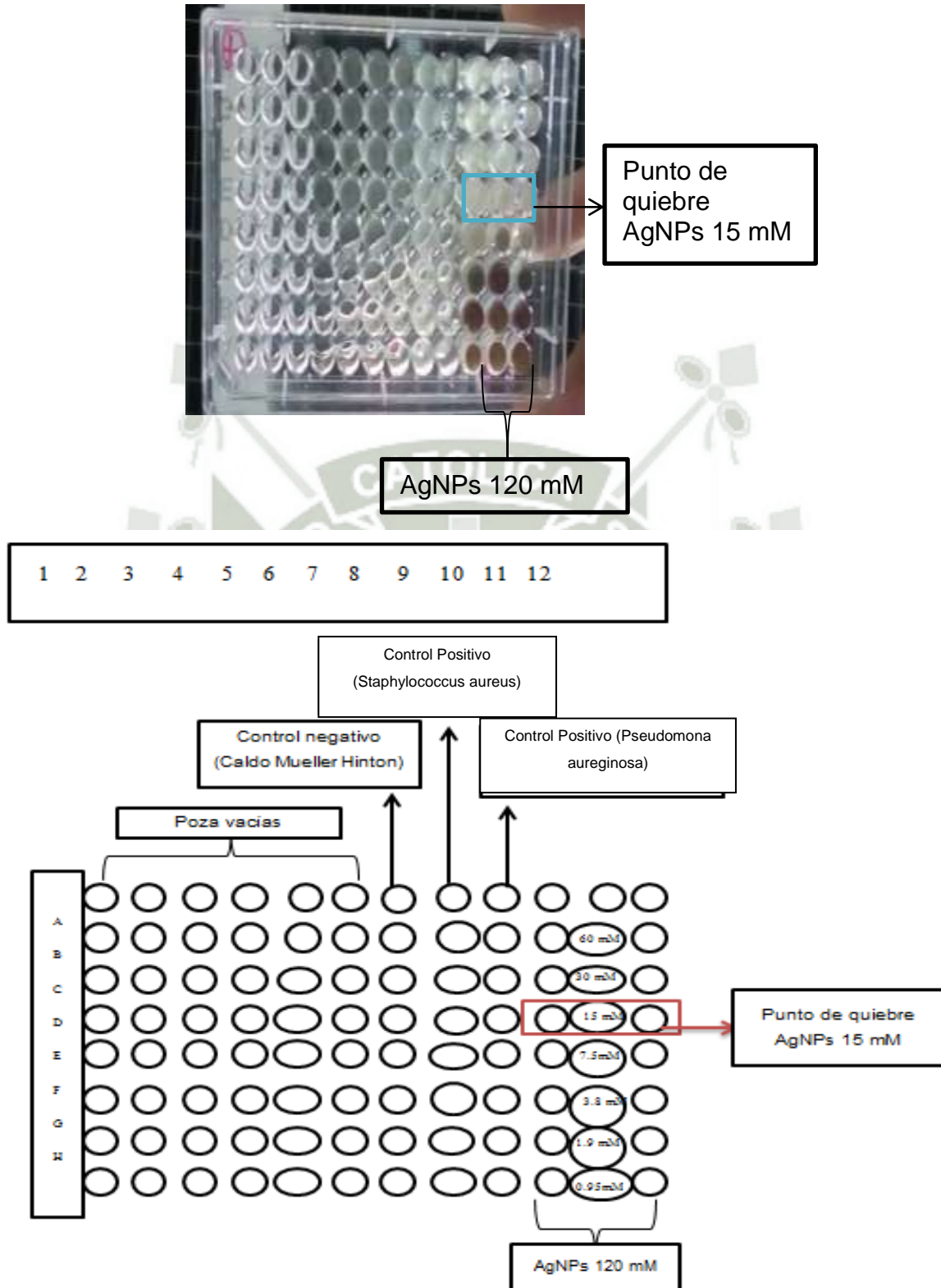


Figura 44. Imagen de la placa de pozos cultivada para la determinación de la concentración mínima inhibitoria de nanopartículas de plata y oro para *Staphylococcus aureus*.

En el caso de la bacteria testada como *Pseudomona aureginosa*, se demostró inhibición del crecimiento bacteriano a una concentración de 20 mM de la muestra inicial de 160 mM de plata, lo que equivale a un CMI de 80 $\mu\text{g/mL}$, para la muestra inicial de concentración 120 mM las AgNPs mostraron una inhibición en la concentración 15 mM, que equivale a un CMI de 60 $\mu\text{g/mL}$, por lo tanto tomamos 60 $\mu\text{g/mL}$ como CMI final para las AuNPs en la bacteria *Pseudomona aureginosa*.

En el caso de las nanopartículas de oro en la muestra inicial de 1.48 mM se mostró una inhibición del crecimiento bacteriano a una concentración de 0.74 mM, de igual forma que en el caso de las nanopartículas de plata, lo que equivale a CMI final 2.96 $\mu\text{g/mL}$. En el caso de la muestra inicial de 0.88 mM, se obtuvo una inhibición de crecimiento bacteriano a una concentración de 0.44 mM, lo que equivale a un CMI de 1.76 $\mu\text{g/mL}$. Como podemos observar en la Figs. 45 y 46 en el caso de *Pseudomona aureginosa*, las concentraciones mínimas inhibitorias son 60 $\mu\text{g/mL}$ y 1.76 $\mu\text{g/mL}$ para AgNPs y AuNPs respectivamente.

Tabla 17. Resultados de la concentración mínima inhibitoria de nanopartículas de plata y oro en la bacteria *Pseudomona aureginosa*.

	Ag				Au				
	(mM)	($\mu\text{g/mL}$)	(mM)	($\mu\text{g/mL}$)	(mM)	($\mu\text{g/mL}$)	(mM)	($\mu\text{g/mL}$)	
A	120	480	160	640	A	1.48	5.92	0.88	3.52
B	60	240	80	320	B	0.74	2.96	0.44	1.76
C	30	120	40	160	C	0.37	1.48	0.22	0.88
D	15	60	20	80	D	0.18	0.74	0.11	0.44
E	7.5	30	10	40	E	0.09	0.37	0.055	0.22
F	3.75	15	5	20	F	0.045	0.19	0.027	0.11
G	1.9	7.5	2.5	10	G	0.022	0.09	0.013	0.06
H	0.9375	3.7	1.25	5	H	0.011	0.05	0.007	0.03

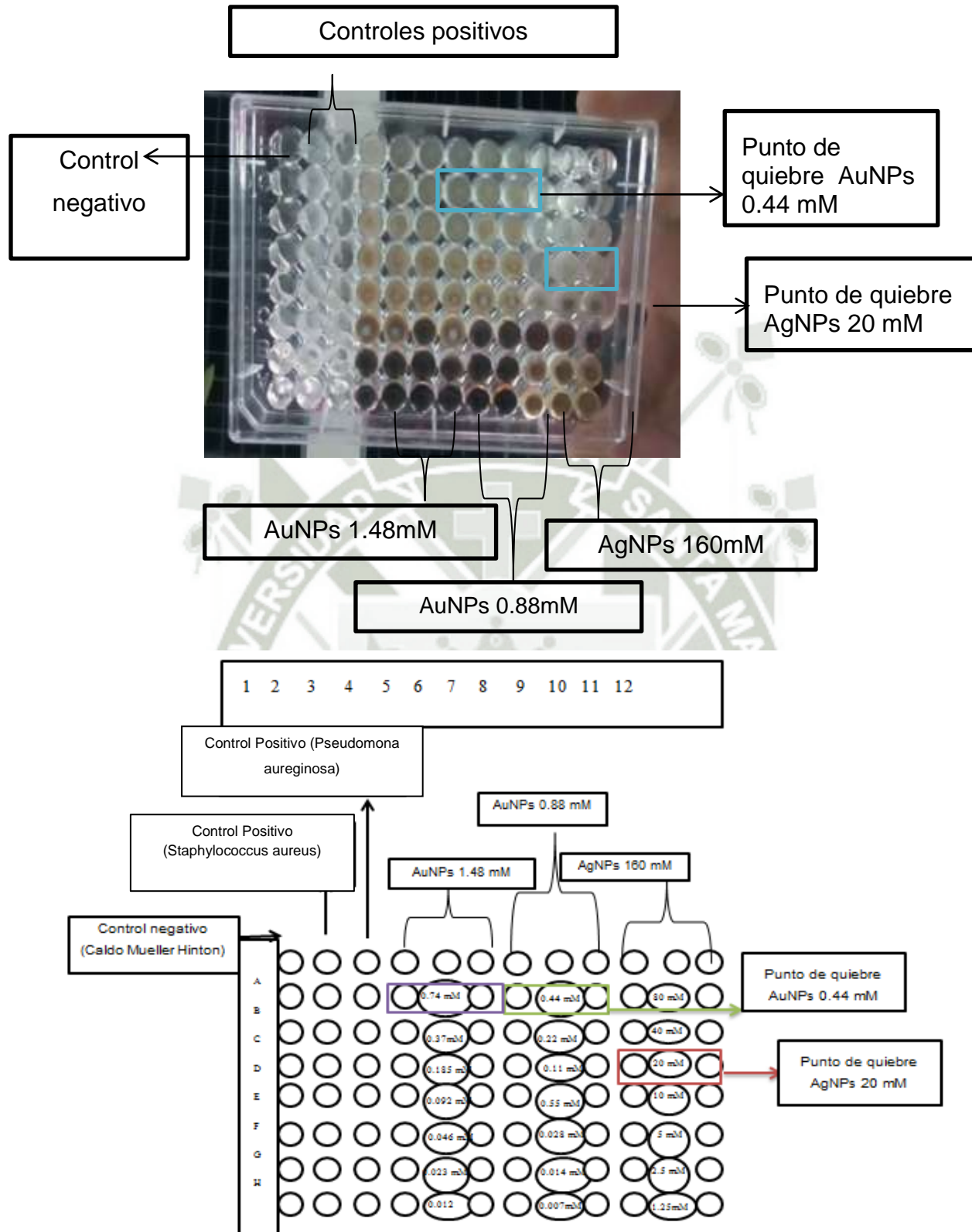


Figura 45. Imagen de la placa de pozos cultivada para la determinación de la concentración mínima inhibitoria de nanopartículas de plata y oro para *Pseudomona aureginosa*.

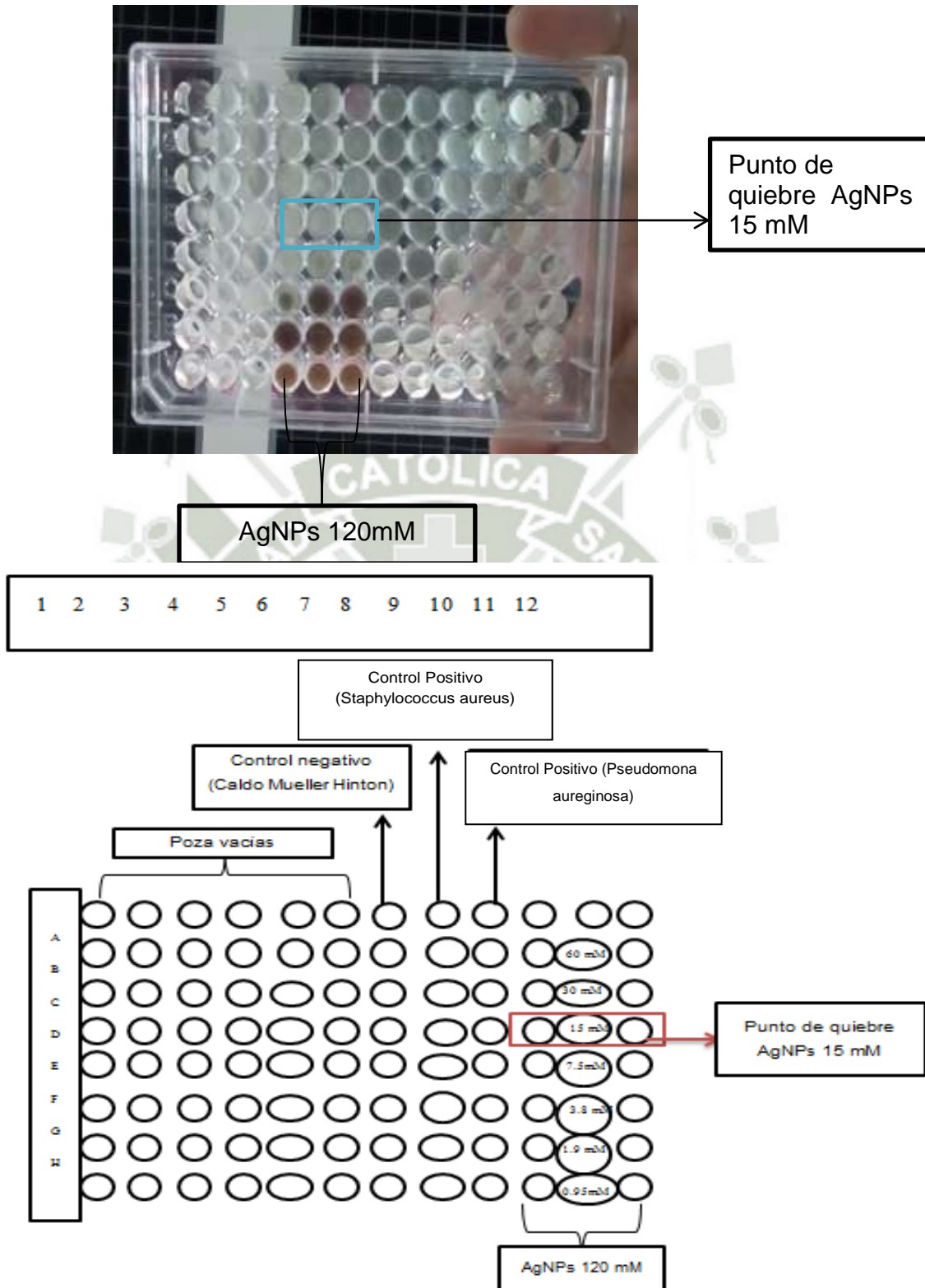


Figura 46. Imagen de la placa de pozos cultivada para la determinación de la concentración mínima inhibitoria de nanopartículas de plata y oro para *Pseudomona aureginosa*.

En adición a la actividad antimicrobiana se sabe que reducir el tamaño de la partícula es una eficiente herramienta para aumentar su biocompatibilidad, los mecanismos de acción y toxicidad también son de mucha importancia y varios estudios están en camino para mejorar y aclarar estos aspectos.

El efecto inhibitorio de la plata y el oro es probablemente la suma de mecanismos de acción distintos. Se cree que los iones Ag^+ interactúan con grupos sulfúricos en las membranas de los microorganismos, causando desregulación de su permeabilidad y la muerte de la célula microbiana. Fue observado que niveles micro molares de los iones de plata y iones oro actúan en la cadena respiratoria al desacoplar el transporte de electrones de la fosforilación oxidativa, así inhibe las enzimas de la cadena respiratoria o interfiere en la permeabilidad de la membrana. Los iones Ag^+ también pueden interferir con el DNA impidiendo la reproducción celular ^[65]. La explicación más difundida sobre la actividad bactericida de las NPsAg sostiene que estas se anclan a la pared celular de las bacterias para luego penetrarlas y causar cambios estructurales en la membrana celular, tales como cambios en la permeabilidad de la misma, mediante la defosforilación de sustratos peptídicos claves en residuos de tirosina, lo cual deviene en la muerte ^[39] del microorganismo^[66-6].

Capítulo IV: Conclusiones y Recomendaciones

4.1 Conclusiones.

PRIMERA: Se aisló y caracterizó bioquímicamente y molecularmente las cepas nativas de la fuente bacteriana "Kombucha" identificando como el microorganismo productor al *Gluconacetobacter xylinum*.

SEGUNDA: Se determinó que la mejor condición de cultivo es en medio RAE por un período de incubación de 10 días a una temperatura de 30 °C dando como resultado una producción de celulosa bacteriana de 9.7 g/L, en comparación con la producción en medio YPM que fue 6.4 g/L y en medio agar nutritivo 8.1 g/L.

TERCERA: Se sintetizó las nanopartículas de plata y oro por reducción química usando Nitrato de plata y Cloruro de oro como precursores y Borohidruro de sodio como reductor orgánico. Se comprobó y caracterizó la presencia de las nanopartículas mediante las pruebas de Espectroscopia UV-Visible, Espectroscopia FT-IR y Microscopía Electrónica de Barrido.

CUARTA: Se determinó que las nanopartículas de plata y oro impregnadas en celulosa bacteriana poseen capacidad antimicrobiana, dando como resultado 40 µg/mL como concentración mínima inhibitoria para las nanopartículas de plata testadas en *Staphylococcus aureus* y 60 µg/mL en *Pseudomona aeruginosa*. Para las nanopartículas de oro la concentración mínima inhibitoria fue de 1.76 µg/mL para ambas bacterias.

4.2 Recomendaciones.

1. Probar nuevos medios de cultivo y condiciones de cultivo para aumentar la producción de celulosa bacteriana.
2. En futuras investigaciones complementar el estudio utilizando diferentes soportes orgánicos o inorgánicos para las nanopartículas de plata y oro y su posterior evaluación con el microscopio electrónico de barrido adquirido por la Universidad Católica de Santa María.
3. Evaluar la actividad antimicrobiana de las nanopartículas "in vivo".



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. TEOH A, HEARD G. Ecología de la levadura de la fermentación de Kombucha. [Online]; 2004 [cited 1995 Setiembre 01. Available from: <https://translate.google.com.pe/translate?hl=es419&sl=en&u=https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15282124&prev=search>.
2. JARRELL J, CAL T, BENNETT W. The kombucha consortia of yeast and bacteria s.l.: Mycologist; 2000.
3. SETO ea. Effective cellulose production by 81 a cculture of gluconacetobacter xylinus and lactobacillus. Malli: Applied Microbiology biotechnology; 2006.
4. DUTTA D, GACHHUI R. Gluconacetobacter kombuchae sp., Fijador de nitrógeno y productor de celulosa. nov., aislado del té de Kombucha. India: Universidad de Jadavpur, Kolkata; 2007.
5. NOBLES D, BROWN J. Expresión transgénica de los genes de la celulosa sintasa de la cepa ATCC 53582 de Gluconacetobacter hansenii en la cepa de cianobacterium Synechococcus leopoliensis UTCC 100 s.l.: Cellulose; 2008.
6. INDER M, SAXENA R, MALCOLM J. Biosíntesis de Celulosa: Vistas Actuales y Conceptos en Evolución. [Online]; 2005 [cited 2005 MAYO 13. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4246814/>.
7. CHÁVEZ J, SURI Y, CONTRERAS M, ESCAMILLA E. Celulosa bacteriana en gluconacetobacter xylium biosíntesis y aplicaciones. Tip Revista Especializada en Ciencias Químico- Biológicas ed. México: Universidad Nacional autónoma de México; 2004.
8. O´SULLIVAN A. Celulosa: la estructura se deshace lentamente. [Online].; 1997. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:101843170557>.

9. CARRILLO F. Caracterización estructural de fibras lyocell y su comportamiento frente a procesos de degradación Catalunya: Universidad Politécnica de Catalunya; 2002.
10. DUFRESNE A, SABU T, POTHAN L. Nanocompuestos de Biopolímero: Procesamiento, Propiedades y Aplicaciones. Wiley ed. s.l.; 2013.
11. JONAS R, FARAH F. Producción y Aplicación de Celulosa Microbiana. Degradación y estabilidad del polímero. [Online]; 1998 [cited 2016 mayo 20. Available from: [http://www.scirp.org/\(S\(lz5mqp453edsnp55rrgjct55\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1761407](http://www.scirp.org/(S(lz5mqp453edsnp55rrgjct55))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1761407).
12. CANON E, ANDERSON M. Biogénesis de la celulosa bacteriana. [Online].; 1991.
13. ROSS Tea. El sitio de expresión VSG de tripanosoma codifica adenilato ciclasa y un gen regulador putativo rico en leucina. [Online]; 1991. Available from: <https://www.yeastgenome.org/reference/S000062623>.
14. RING F. Study of polymerization kinetics of bacterial cellulose through gel permation chromatography. Plenum ed. Brown RM, editor. New York: Cellulose and other natural polymer systems; 1982.
15. RAINER J, FARAH L. Production and application of microbial cellulose. [Online]; 1998. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141391097001973>.
16. YAMANAKA S, ISHIHARA M, SUGIYANA J. Structural modification of bacterial cellulose s.l.: Cellulose; 2000.
17. WILLAMS S, CANNON R. Nanocellulose: From Nature to High Performance Tailored Materials. [Online]; 1989. Available from: <https://books.google.com.pe/books?isbn=3110254603>.

18. MARX M, PION B. Kinetic investigations of biosynthesis of cellulose by actobacter xylinum BBA, editor. s.l.: Biochimica et Biophysica Acta; 1974.
19. BIELECK G. Causes and prevention of anastomotic leak after colorectal survey s.l.: Klinicka Odonkologie Zvlastni; 1999.
20. RECOUVREUX D. Producao de celulose bacteriana: Identificacao do operon bcs e producao de biofilme celulosico por chromobacterium violaceum Brazil: Universidade Federal do Paraná; 2004.
21. HESTRIN S, SCHRAMM M. Síntesis de celulosa por Acetobacter xylinum: Preparación de células liofilizadas capaces de polimerizar glucosa a celulosa. The Biochemical Society ed. EE.UU.: Bliochem J. 1954; 1954.
22. YANG J. Estructura cristalina del dominio catalítico de la proteína-tirosina fosfatasa SHP-1. JBC Papers in Press ed. Chem B, editor. EE.UU. Universidad de Stanford; 1998.
23. CHEN H. Biotechnology of lignocellulose Beijing: Springer; 2014.
24. CHAWLA R, BAJAJ B, SURVASE SA, SINGHAL R. Microbial cellulosa fermentative production and applications Mumbai: Universidad de Mumbai; 2009.
25. FORBES B, et. al. Diagnostic Microbiology. 11th ed. Louis S, editor. Missouri: Mosby; 2002.
26. PARK YS, YANG Y, HWANG Y, KIM Y. Cellulose production by acetobacter xylinum BRC5 under agited condition. Bioengineering JoFa, editor. China: Ferment bioneng; 1998.
27. WILLEY JM, SHERWOOD CJ. Prescott, Harley y Klein's Microbiology Hill M; 2008.

28. ROBINSON TP, OCIO MJ, KALOTI A, MACKEY BM, The effect of growth environment on the lag phase of listeria monocytogenes Microbiology, Institute of Food Research, Reading, Berks, s.l.; 1998.
29. CLAVELL L, PEDRIQUE M. Manual de Métodos Generales. 2nd ed. Farmacia Fd, editor. Venezuela: Universidad Central de Venezuela; 1992.
30. TOTORA GJ, FUNKE BR, CASE CL. Introducción a la microbiología Médica: Panamericana; 2007.
31. MENDOZA G, RODRÍGUEZ JL. La nanociencia y la nanotecnología: una revolución en curso. [Online]. San Luis de Potosí; 2007. Available from: www.redalyc.org/pdf/115/11502906.pdf.
32. The Royal Society, & The Royal Academy of Engineering Nanoscience and nanotechnologies. [Online]; 2004. Available from: https://royalsociety.org/~media/Royal_Society_Content/policy/publications/2004/9693.pdf.
33. MENDOZA G, RODRÍGUEZ JL. Nanociencia la tecnología domina el mundo. Publicacion de Universidad de Xochicalco. 2017 agosto 17; I (09): p. 163.
34. SERENA P, CORREIA A. Nanotecnología: el motor de la proxima revolución tecnológica Tecnología Adcy, editor. España; 2003.
35. RAO SR, RAJU M, PANDA A. Reemplazo de maíz amarillo con mijo perla (Pennisetum typhoides), mijo de cola de rabo (Setaria italica) o mijo (Eleusine coracana) en dietas de pollo de engorde que contienen enzimas suplementarias Sci. A., editor. Asia- Australia; 2004.
36. SCHMID M. First language attrition: The methodology revised. International Bilingualism Jo, editor. S.L.; 2004.
37. BOLDYREV S. Espectro de Turbulencia Magnetohidrodinámica Chicago Ud, editor. Chicago; 2006.

38. IMAMURA J, WOLFF M, DURISEN R. A numerical study of the stability of radiative shocks AA (Virginia UCVAUBIAUBI, editor. Indiana; 1984.
39. DE JONG K. Synthesis of Solid Catalysts KGaA WVVG&C, editor. s.l.; 2009.
40. TURKEVICH J, STEVENSON P, HILLIER J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. Discuss, editor. Faraday Soc; 1951.
41. TURKEVICH J, KIM G. Palladium: preparation and catalytic properties of particles of uniform size Salud BNdMdIEUINd, editor. s.n.: Ciencia. ; 1970.
42. SERGEEV S. Emission Line -- Continuum Correlations. 207th ed. ASP AVfXRtRW, editor. San Francisco: Conference Series; 2006.
43. ZHU Yea. WDR26: a novel Gbeta-like protein, suppresses MAPK signaling pathway Stanford U, editor. Stanford; 2004.
44. PATEL, K, et.al. Synthesis of nanosized silver colloids Journal of Chemical Sciences, The Journal of Physical Chemistry; 2005.
45. MUZAFAROV, M; et.al. Polymer Science Science Engineering, 2nd, Index; 2000.
46. KIM, Y; Metodologías para la síntesis de nanopartículas; 2004.
47. ZHENG J, et. al.; Individual water-soluble dendrimer-encapsulated silver Society. J.; 2002.
48. XIE, RC; SHANG JK; Morphological control in solvothermal synthesis of titanium Scienc; 2007.
49. BOND, DT, THOMPSON, DT; Catalysis by gold. 1st ed. Imperial; 2006.
50. ZANELLA, R; RODRÍGUEZ, YA; MORENO, A. Alternative methods for the preparation of gold nanoparticles supported on TiO₂; Chemistry; 2002.

51. DYSON, PJ; MINGOS, MP. ; Modern Supramolecular Gold Chemistry: Gold-Metal Interaction and Technology. John Wiley & Sons, Chichester ed. Schmidbaur; 1999.
52. FERNÁNDEZ A., In situ EXAFS study of the photocatalytic reduction and deposition of gold Chemistry; 1995.
53. Li, SW, BELCHER, AM, Photocatalytic deposition of gold nanoparticles: Chemical Physics Letters; 2004.
54. PANYMAN JLV. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery: Adv Drug Delivery; 2003.
55. SONAVANE, MK, vitro permeation of gold nanoparticles through rat skin and rat intestine: effect of particle size. Facultad de Ciencias Farmacéuticas UdCdT2, editor. Yamasaki; 2008.
56. CHITHRANI, CW, et. al, Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. Instituto de Biomateriales y Ingeniería Biomédica UdT, editor. Canadá; 2006.
57. MUIR J KJ. Plasticity of GABAA receptor diffusion dynamics at the axon initial segment Neurosci. FC, editor. s.l.; 2010.
58. ASHARANI P, PRAKASH M, SURESH V. Actividad antiproliferativa de las nanopartículas de plata Biology BC, editor.; 2009.
59. GÁLVEZ V. TC. Toxicología de las nanopartículas. Seguridad y salud en el trabajo.; 2010.
60. AUFAN M. Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective Nanotechnol N. 2009.
61. HIGBY, GJ, Gold in medicine: A review of its use in the west before 1900: Gold Bull; 1982.

62. RIBEIRO C, et. al. Substitution of corn grain by pearl millet in the diet of Holstein-Friesian dairy cow. Zootec RB; 2004.
63. SANTOS J, BATISTA A, RODRÍGUEZ A, XAVIER L, LIMA S. antimicrobial activity of fermented with kombucha colonies sl.: Jornal of microbial & biochemical Technology; 2009.
64. PALSTY, SJ. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium Microbiol AE; 2007.
65. Damm C, Münstedt H. Kinetic Aspects of the Silver Ion Release from Antimicrobial Polyamide/Silver Nanocomposites. Appl. Phys. A. 2008;91:479–486.
66. Tran, Q. H.; Le, A. T. Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology, 2013, 4, 3, 033001(1)-033001(20).
67. Prabhu, S.; Poulouse, E. K. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. International Nano Letters, 2012, 2, 1, 1-10
68. Lara, H. H.; Garza-Treviño, E. N.; Ixtepan-Turrent, L.; Singh, D. K. Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds. J. Nanobiotechnology, 2011, 9, 1, 30(1)-30(8)

ANEXO 1

Composición de Medios de Cultivo

Medio RAE

Fundamento

- La glucosa, es utilizada como fuente de carbono y energía para los microorganismos.
- Las peptonas y el extracto de levadura se utilizan preferentemente como fuente de nitrógeno, fósforo y azufre orgánicos. Algunos de sus componentes se pueden utilizar como factores orgánicos de crecimiento o como fuente de carbono y energía.
- Las sal fosfato de sodio confiere acción buffer al medio de cultivo.
- Se utilizó agar-agar como agente gelificante para dar solidez a los medios de cultivo.

Composición:

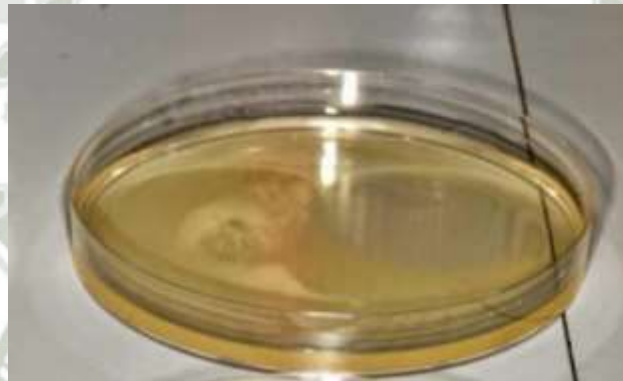
Glucosa	40.0 g
Extracto de levadura	10.0 g
Peptona	10.0 g
Fosfato de sodio di básico	3.4 g
Ácido cítrico	1.4 g
Agar	20.0 g
	<hr/>
	84.8 g/L

Preparación:

Pesar los gramos indicados de los componentes del medio y colocarlos en un Erlenmeyer, en una probeta medir el volumen deseado de 1000 mL de agua destilada. A continuación, añadir el agua destilada al Erlenmeyer y disolver.

Tapar con papel aluminio para llevarlo a esterilización por autoclave a 120 °C, 1.5 atm por 15 minutos.

Retirar el Erlenmeyer conteniendo el medio de cultivo esterilizado y con cuidado distribuir a las placas Petri, dejar enfriar a temperatura ambiente para su solidificación.



Medio YPM

Fundamento

- En este medio de cultivo el manitol se utilizó como fuente de carbono y energía para los microorganismos.
- Las peptonas y el extracto de levadura se utilizan preferentemente como fuente de nitrógeno, fósforo y azufre orgánicos. Algunos de sus componentes se pueden utilizar como factores orgánicos de crecimiento o como fuente de carbono y energía.
- Se utilizó agar-agar como agente gelificante para dar solidez a los medios de cultivo.

Composición:

Extracto de levadura	5 g
Peptona	3 g
Manitol	25 g
Agar	20 g
	<hr/>
	53 g/L

Preparación:

Pesar los gramos indicados de los componentes del medio y colocarlos en un Erlenmeyer, en una probeta medir el volumen deseado de 1000 mL de agua destilada. A continuación, añadir el agua destilada al Erlenmeyer y disolver, tapar con papel aluminio para llevarlo a esterilización por autoclave a 120°C, 1.5 atm por 15 minutos.

Retirar el Erlenmeyer conteniendo el medio cultivo esterilizado y con cuidado distribuir a las placas Petri, dejar enfriar a temperatura ambiente para su solidificación.

Medio Agar Nutritivo

Fundamento

- Es un medio de cultivo no selectivo, donde el extracto de carne constituye la fuente de carbono y nitrógeno, aportando nutrientes necesarios para el crecimiento bacteriano.
- Se utiliza para aislamiento y recuento de microorganismos con escasos requerimientos nutricionales.

Composición:

Peptona	5 g
Extracto de carne	3 g
Agar	20 g
	<hr/>
	28 g/L

Preparación:

Suspender 28 g por litro de agua destilada del medio ya preparado y colocarlos en un Erlenmeyer, en una probeta medir el volumen deseado de 1000 mL de agua destilada. A continuación, añadir el agua destilada al Erlenmeyer y disolver. Tapar con papel aluminio para llevarlo a esterilización por autoclave a 120°C, 1.5 atm por 15 minutos.

Retirar el Erlenmeyer conteniendo el medio cultivo esterilizado y con cuidado distribuir a las placas Petri, dejar enfriar a temperatura ambiente para su solidificación.

Medio SIM

Fundamento

Es un medio semisólido destinado a verificar la movilidad, producción de indol y de ácido sulfhídrico en un mismo tubo. El triptófano es un aminoácido constituyente de muchas peptonas, y particularmente de la tripteína, que puede ser oxidado por algunas bacterias para formar indol. En el proceso interviene un conjunto de enzimas llamadas triptofanasa. El indol producido se combina con el aldehído del reactivo de Kovac's o de Erlich, para originar un compuesto de color rojo.

Las cepas móviles pueden apreciarse en este medio, por la turbidez que producen alrededor de la punción de siembra, mientras que aquellas cepas productoras de ácido sulfhídrico se distinguen por la formación de un precipitado negro de sulfuro de hierro a partir del tiosulfato siempre que el medio se mantenga a un pH mayor a 7.2.

Composición:

Tripteína	20.0 g
Peptona	6.1 g
Sulfato de hierro y amonio	0.2 g
Tiosulfato de sodio	0.2 g
Agar	3.5 g
	<hr/>
	30.0 g/L

Preparación:

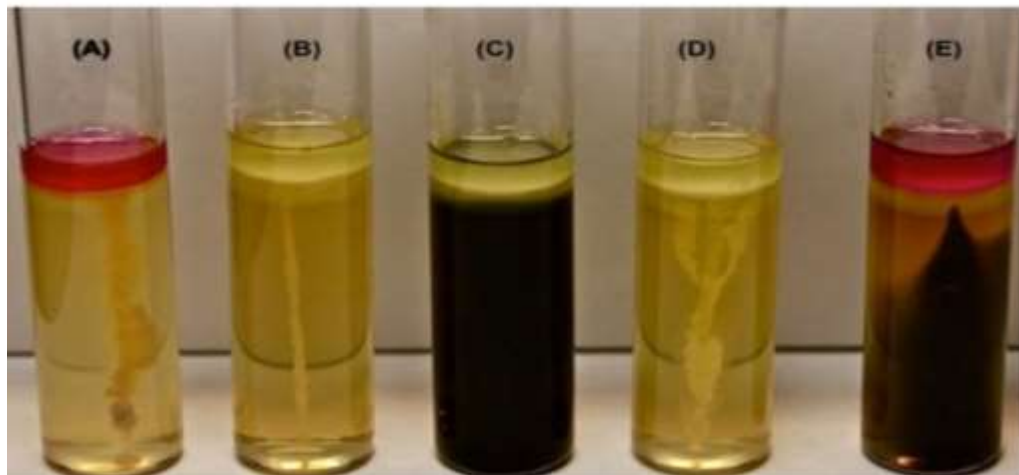
Suspender 30 g por litro de agua destilada del medio de cultivo ya preparado, dejar reposar por 5 minutos en el Erlenmeyer y calentar con agitación frecuente hasta llegar al hervor por un minuto para su total disolución. A continuación, distribuir en tubos de ensayo para llevarlos a esterilización por

autoclave a 120°C, 1.5 atm por 15 minutos. Enfriar y dejar solidificar en posición vertical.

Para la siembra hacerlo por punción profunda, usando aguja de inoculación recta. Inocular el centro del tubo y la punción debe abarcar hasta los 2 tercios de profundidad del medio de cultivo desde la superficie. Dejar en incubación a 37 °C por 24 horas.

Interpretación de Resultados

- a. Microorganismo móvil, Ácido sulfhídrico (-), Indol (+)
- b. Microorganismo no móvil, Ácido sulfhídrico (-), Indol (-)
- c. Microorganismo móvil, Ácido sulfhídrico (+), Indol (-)
- d. Microorganismo móvil, Ácido sulfhídrico (-), Indol (-)
- e. Microorganismo móvil, Ácido sulfhídrico (+), Indol (+)



**Fuente: "Guías para el laboratorio de bacteriología", de Vanegas, M. (2015). Colombia.*

Medio Mueller Hinton

Fundamento

Medio de cultivo no selectivo, que promueve el desarrollo microbiano, es recomendado para utilización rutinaria en realización de antibiogramas en medio sólido y pruebas de concentración mínima inhibitoria en caldos, debido a que representa buena reproductividad lote a lote en las pruebas de sensibilidad, su contenido en inhibidores de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclina es bajo, la mayoría de patógenos microbianos crece satisfactoriamente.

Composición

Infusión de carne	3.0 g
Peptona acida de caseína	17.5 g
Almidón	1.5 g
	<hr/>
	22.0 g/L

Preparación:

Pesar 22 g por litro de agua destilada del medio de cultivo preparado. Dejar en reposo por unos 10 minutos y calentar con agitación frecuente hasta alcanzar el hervor por un minuto.

A continuación, trasladar la mezcla en el Erlenmeyer para llevarlo a esterilización por autoclave a condiciones 120 °C y 1.5 atm por 15 minutos. Dejar enfriar y distribuir a las pozas de cultivo de la Microplaca.

Medio Hugh-Leifson

Fundamento

El metabolismo de un glúcido puede seguir una vía oxidativa o fermentativa. En vía oxidativa el aceptor final de electrones debe ser el oxígeno y por consiguiente el proceso aeróbico y produce acidez, mientras que en la vía fermentativa el aceptor final de electrones es un compuesto orgánico y el proceso es anaeróbico, originando mucha acidez en poco tiempo. La fermentación u oxidación del glúcido se puede ver en dos tubos con medio de cultivo glucosado, uno abierto (aerobio) y otro sellado (anaerobio).

Utilizamos para esta prueba el medio semisólido Hugh-Leifson al que se le añade glucosa para observar si el metabolito de este azúcar es llevado a cabo por vía oxidativa o fermentativa.

Composición:

Tripteína	2.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Fosfato dipotásico	0.3 g
Agar	2.5 g
Azul de Bromotiol	0.03 g
	<hr/>
	9.83 g/L

Preparación:

Pesar y suspender 9.8 g por litro de agua destilada del medio de cultivo preparado. Calentar con agitación frecuente hasta llegar al hervor por un minuto para su total disolución. A continuación, llevar el medio de cultivo a esterilización por autoclave a 120°C, 1.5 atm por 15 minutos.

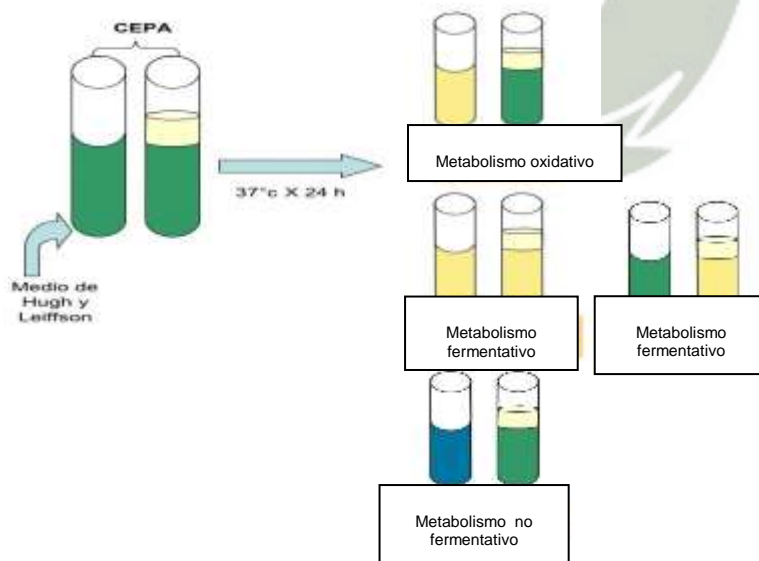
Dejar enfriar y añadir 100 mL de la solución de hidrato de carbono (Glucosa) al 10%, previamente esterilizado por filtración. Distribuir a los tubos de ensayo

Siembra:

Para la siembra por cada hidrato de carbono y cada microorganismo utilizar dos tubos OF, uno para cultivo aeróbico y el otro cultivo anaeróbico (el cual será sellado con parafina líquida). Sembrar con aguja de inoculación hasta 0.6 mm desde la superficie. Al tubo de cultivo anaeróbico añadir 2 mL de parafina líquida estéril para excluir el oxígeno. Dejar en incubación a 37 °C por 24-48 horas.

Interpretación de Resultados del metabolismo de los Microorganismos:

- A) Metabolismo Oxidativo del hidrato de carbono en estudio: Producen una reacción ácida en el tubo aeróbico y una reacción alcalina en el tubo anaeróbico.
- B) Metabolismo Fermentativo del hidrato de carbono en estudio: Producen una reacción ácida en el tubo con parafina y una reacción alcalina en el tubo con oxígeno o una reacción ácida en ambos tipos de tubos.
- C) Metabolismo no Fermentativo: Produce una reacción alcalina en el tubo expuesto al O₂ y en el que contiene parafina.



*Fuente: "Bioquímica de los microorganismos", de Ramón, A. (1997). España.

ANEXO 2

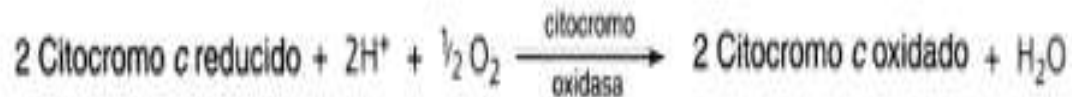
Pruebas Bioquímicas

Prueba de oxidasa

La prueba de oxidasa es utilizada para la detección de la enzima citocromo-c-oxidasa, presente en los géneros *Pseudomona*, *Neisseria*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromona*, entre otros.

Fundamento

Las tiras reactivas contienen oxalato de dimetil-para-fenilendiamina, el cual es el sustrato de la enzima oxidasa. Los microorganismos que producen la enzima oxidasa se evidencian porque en presencia de oxígeno atmosférico y citocromo c, se oxida el sustrato presente en los discos a un compuesto de coloración rojo-fucsia.



Metodología:

Siembra

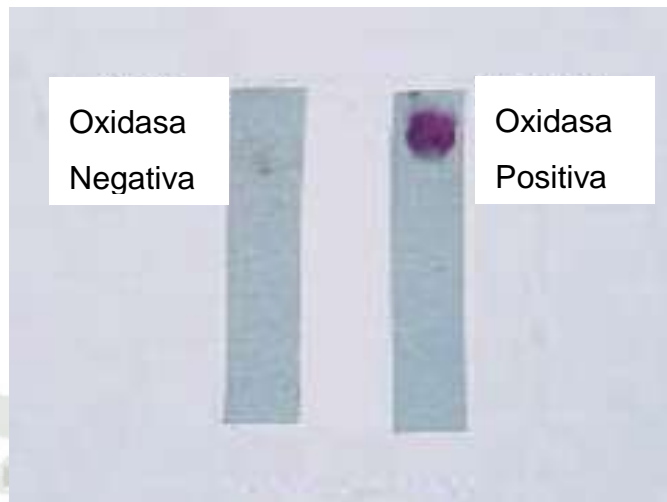
- Humedecer las tiras reactivas con una gota de agua y luego colocar sobre él la colonia de bacteria en estudio.

Generalmente dentro del minuto y a temperatura ambiente se detectan los resultados positivos. Pasado los 2 minutos debe considerarse una reacción negativa a pesar que se observe una coloración.

Interpretación de Resultados

Positivo: Presencia de color rojo-fucsia en el disco y/o solución.

Negativo: El disco permanece sin cambio de color.



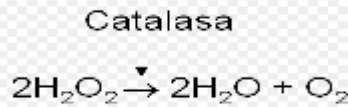
**Fuente: "Pruebas Bioquímicas para para la identificación de bacterias de Importancia Clínica", de Williams, W. (2000).USA.*

Prueba de Catalasa

La prueba de catalasa pone de manifiesto la presencia de la enzima catalasa en una bacteria. Esta enzima es capaz de descomponer el peróxido de hidrógeno (agua oxigenada) en agua y oxígeno, evidenciándose la consiguiente aparición de burbujas.

Fundamento

La catalasa es una enzima que poseen la mayoría de las bacterias aerobias. Descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. El desprendimiento de burbujas procedentes del oxígeno indica que la prueba es positiva.



Metodología

Colocar en un portaobjetos de microscopio una gota de agua oxigenada al 3%. Con la ayuda de un asa bacteriológica retirar una cantidad de la colonia a evaluar. Agitar la colonia de bacterias en el peróxido de hidrógeno y evaluar la reacción.

Resultados

- ✓ Catalasa positivo: Se produce la aparición de burbujas que corresponde a la liberación de oxígeno, lo que indica que la bacteria tiene la enzima catalasa.
- ✓ Catalasa negativo: No se producen burbujas por tanto la bacteria no posee dicha enzima



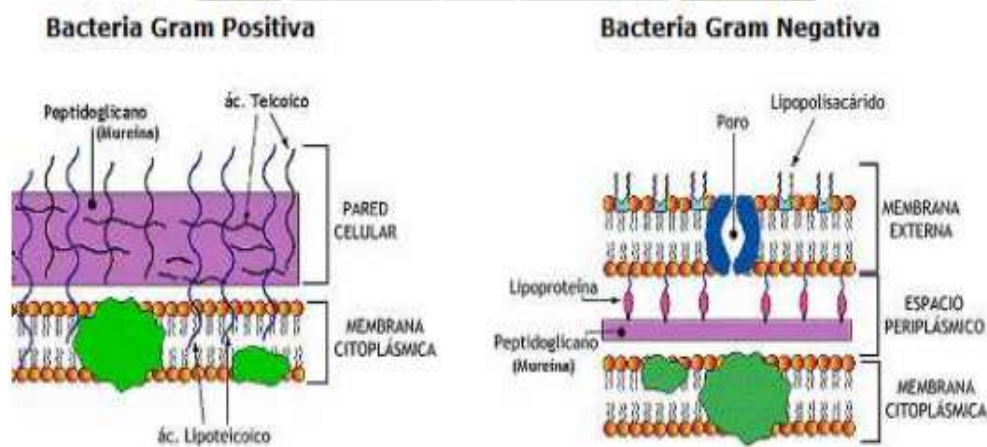
*Fuente: "Pruebas Bioquímicas para la identificación de bacterias de Importancia Clínica", de Williams, W. (2000).USA.

Coloración de Gram

Fundamento

Las bacterias Gram-Positivas y Gram-Negativas se tiñen de forma distinta debido a las diferencias constitutivas en la estructura de sus paredes celulares. La pared de la célula bacteriana sirve para dar su tamaño y forma al organismo así como para prevenir la lisis osmótica. El material de la pared celular bacteriana que confiere rigidez es el peptidoglicano.

La pared de la célula Gram-Positiva es gruesa y consiste en varias capas interconectadas de peptidoglicano así como algo de ácido teicoico, generalmente 80%-90% de la pared de la célula Gram-positiva es peptidoglicano. La pared de la célula Gram-Negativa, por otro lado, contiene una capa mucho más delgada de peptidoglicano y se encuentra rodeada por una membrana exterior compuesta de fosfolípidos, lipopolisacáridos, y lipoproteínas. Sólo 10% - 20% de la pared de la célula Gram-Negativa es peptidoglicano, lo que facilita que el decolorante permeabilice la membrana permitiendo que el primer colorante (cristal violeta), sea eliminado con el lavado y pueda retener el segundo colorante de contraste (safranina).



*Fuente: "Bacteriología General", de Rodríguez, E; et al. (2005). Puerto Rico.

Kit de Gram

Cristal violeta: Es la mezcla de 0.5 g de cristal violeta (violeta de genciana), disueltos en 100 mL de agua destilada.

Lugol: Consiste en mezclar 20 gramos de yodo diatómico y 40 gramos de yoduro potásico, disueltos en un litro de agua destilada.

Alcohol acetona: Se prepara mezclando una solución en partes iguales de etanol absoluto al 70% y acetona.

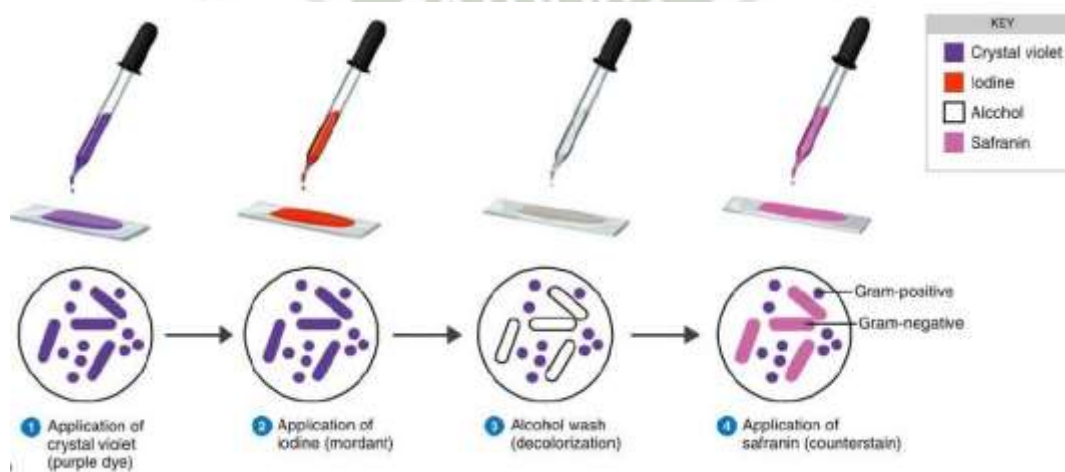
Safranina: Es la mezcla de 0.25 g de safranina disueltos en 100 mL de agua destilada.

Preparación:

Tomar la muestra de las bacterias de la placa de Petri con ayuda de un asa de kolle y transferir una pequeña muestra al portaobjetos. A continuación, fijamos la muestra por calor, el calor fijará las bacterias al portaobjetos de forma que no se enjuaguen tan fácilmente durante la tinción, para ello pasamos rápidamente el portaobjetos dos o tres veces por la llama de un mechero Bunsen.

1. Empapar la muestra con cristal violeta. Con ayuda de un gotero empapamos la muestra de la bacteria con varias gotas de tinte cristal violeta y esperamos 60 segundos.
2. Enjuaga suavemente el cristal violeta, inclinando el portaobjetos rociamos un pequeño chorro de agua destilada o de grifo sobre la parte superior del portaobjetos. El agua debería escurrirse sobre la superficie de la mancha pero no estar apuntada directamente a ella.
3. Añadimos Lugol y esperamos 60 segundos y enjuagamos. Usando una pipeta cubrimos la mancha con lugol y dejamos reposar por 60 segundos, luego enjuagamos cuidadosamente con agua destilada.

4. Adición de decolorante. Para este paso usamos una mezcla de alcohol acetona y la agregamos sobre la muestra por un período de tiempo de 30 segundos. Finalmente enjuagamos el exceso de decolorante usando la técnica mencionada anteriormente con agua destilada.
5. Empapar la muestra con safranina. Dejamos el colorante en la muestra por 30 segundos, luego enjuagamos con agua destilada.
6. Secar el portaobjetos. Dejamos que el portaobjetos se seque con el aire y la tinción de Gram está terminada y lista para ser analizada en el microscopio.
7. Observar a 100X con aceite de inmersión.



*Fuente: "Bacteriología General", de Rodríguez, E; et al. (2005). Puerto Rico.

ANEXO 3

Preparación de Hidróxido de Sodio

Para preparar una solución de Hidróxido de sodio a una concentración 0.5 N en un litro realizamos los siguientes cálculos:

Calculamos la masa de un equivalente de NaOH

$$1 \text{ equivalente de NaOH} = \frac{40 \text{ g}}{1} = 40 \text{ g}$$

1. Planteamos la ecuación

$$1 \text{ L} \times \frac{0.5 \text{ equivalente}}{1 \text{ L}} \times \frac{40 \text{ gramos NaOH}}{1 \text{ equivalente}}$$

$$\frac{1 \text{ L} \times 0.5 \text{ equivalente} \times 40 \text{ gramos NaOH}}{1 \text{ L} \times 1 \text{ equivalente}}$$

$$x = 20 \text{ gramos de NaOH}$$

Resultado

Necesitamos pesar 20 g de NaOH y diluir en un litro de agua destilada, tener cuidado al preparar la solución porque es exotérmica.

ANEXO 4**Preparación de las Diferentes Concentraciones de Nitrato de Plata**

Para comenzar preparamos una solución madre de Nitrato de Plata con las siguientes características:

- ✓ Solución de 500 mL de Nitrato de Plata a concentración 1M
Peso Molecular=169.87 g

$$(1 \text{ M}) \times (0.5 \text{ L}) = \frac{x}{169.87 \text{ g}}$$

$$x = 84.935 \text{ g}$$

- ✓ Este dato nos indica la cantidad de gramos a pesar de Nitrato de plata para diluir en un 500 mL y obtener una concentración de 1 M

Con la solución madre lista preparamos las siguientes diluciones para obtener 100 mL de las concentraciones deseadas (20, 400, 60,100 mM)

- ✓ Aplicamos la siguiente Fórmula (Convertimos a moles y litro)

$$(C_1) \times (V_1) = (C_2) \times (V_2)$$

- Para la concentración de 20 mM

$$(1 \text{ M}) \times (x) = (0.02 \text{ M}) \times (0.1 \text{ L})$$

$$(x) = \frac{0.02 \text{ M} \times 0.1 \text{ L}}{1 \text{ M}}$$

$$(x) = 0.002 \text{ L}$$

$$(x) = 2 \text{ mL}$$

Debemos retirar 2 mL de la solución madre y diluir en 98 mL de agua destilada.

- Para la concentración de 40 mM

$$(1 \text{ M}) \times (x) = (0.04 \text{ M}) \times (0.1 \text{ L})$$

$$(x) = \frac{0.04 \text{ M} \times 0.1 \text{ L}}{1 \text{ M}}$$

$$(X) = 0.004 \text{ L}$$

$$(X) = 4 \text{ mL}$$

Debemos retirar 4 mL de la solución madre y diluir en 96 mL de agua destilada.

- Para la concentración de 60 mM

$$(1 \text{ M}) \times (x) = (0.06 \text{ M}) \times (0.1 \text{ L})$$

$$(x) = \frac{0.06 \text{ M} \times 0.1 \text{ L}}{1 \text{ M}}$$

$$(X) = 0.006 \text{ L}$$

$$(X) = 6 \text{ mL}$$

Debemos retirar 6 mL de la solución madre y diluir en 94 mL de agua destilada.

- Para la concentración de 100 mM

$$(1 \text{ M}) \times (x) = (0.1 \text{ M}) \times (0.1 \text{ L})$$

$$(x) = \frac{0.1 \text{ M} \times 0.1 \text{ L}}{1 \text{ M}}$$

$$(X) = 0.01 \text{ L}$$

$$(X) = 10 \text{ mL}$$

Debemos retirar 10 mL de la solución madre y diluir en 90 mL de agua destilada.

ANEXO 5

Preparación de Concentraciones de Cloruro de Oro

Para la preparación de las diferentes concentraciones de Cloruro de oro (0.441 mM, 0.736 mM, 1.472 mM) ya se contaba con una solución madre en el laboratorio la cual tenía las siguientes características:

- ✓ Solución de 200 mL de Cloruro de Oro a concentración 0.147152 M

A continuación, a partir de dicha solución madre comenzamos con las diluciones para alcanzar las diferentes concentraciones a un volumen de 10 mL (10000 μ L), las cuales fueron establecidas por diferentes experimentos previos de toxicidad y aglomeración de las nanopartículas,

- ✓ Aplicamos la siguiente Fórmula (Convertimos a moles y litro)

$$(C_1) \times (V_1) = (C_2) \times (V_2)$$

- Para la concentración de 0.441 mM

$$(0.147152 \text{ M}) \times (x) = (0.000441 \text{ M}) \times (0.01 \text{ L})$$

$$(x) = \frac{0.000441 \text{ M} \times 0.01 \text{ L}}{0.147152 \text{ M}}$$

$$(X) = 0.030 \text{ mL}$$

$$(X) = 30 \mu\text{L}$$

Debemos retirar 30 μ L de la solución madre y diluir en 9970 μ L de agua destilada.

- Para la concentración de 0.736 mM

$$(0.147152 \text{ M}) \times (x) = (0.000736 \text{ M}) \times (0.01 \text{ L})$$

$$(x) = \frac{0.000736 \text{ M} \times 0.01 \text{ L}}{0.147152 \text{ M}}$$

$$(X) = 0.050 \text{ mL}$$

$$(X) = 50 \text{ } \mu\text{L}$$

Debemos retirar 50 μL de la solución madre y diluir en 9950 μL de agua destilada.

- Para la concentración de 1.472 mM

$$(0.147152 \text{ M}) \times (x) = (0.001472 \text{ M}) \times (0.01 \text{ L})$$

$$(x) = \frac{0.001472 \text{ M} \times 0.01 \text{ L}}{0.147152 \text{ M}}$$

$$(X) = 0.1000 \text{ mL}$$

$$(X) = 100 \text{ } \mu\text{L}$$

Debemos retirar 100 μL de la solución madre y diluir en 9900 μL de agua destilada.

ANEXO 6

Preparación de Borohidruro de Sodio

Para comenzar preparamos una solución madre de Borohidruro de Sodio con las siguientes características:

- ✓ Solución de 5 mL de Borohidruro de Sodio a concentración 10 mM
Peso Molecular=37.83 g

*Convertimos a moles y litros

$$(0.01 \text{ M}) \times (0.05 \text{ L}) = \frac{x}{37.83 \text{ g}}$$

$$x = 0.0189 \text{ g}$$

- ✓ Este dato nos indica la cantidad de gramos a pesar de Borohidruro de Sodio para diluir en un volumen de 5 mL y obtener una concentración de 10 mM

Con la solución madre lista preparamos la siguiente dilución para obtener 10 mL de la concentración deseada (2 mM)

- ✓ Aplicamos la siguiente Fórmula (Convertimos a moles y litro)

$$(C_1) \times (V_1) = (C_2) \times (V_2)$$

- Para la concentración de 2 mM

$$(0.01 \text{ M}) \times (x) = (0.002 \text{ M}) \times (0.01 \text{ L})$$

$$(x) = \frac{0.002 \text{ M} \times 0.01 \text{ L}}{0.01 \text{ M}}$$

$$(X) = 0.002 \text{ L}$$

$$(X) = 2 \text{ mL}$$

Debemos retirar 2 mL de la solución madre y diluir en 3 mL de agua destilada.

ANEXO 7

Cálculo de Concentración del inóculo

Se realizó con las lecturas de las absorbancias que fueron:

Cepa	Abs	Abs	Abs
<i>Gluconacetobacter</i>		Blanco	Neta
B1	0.109	0.004	0.105
B3	0.98		0.976

- Concentración del inóculo para B1

$$0.105 = (9.72 \times 10^{-10} \text{ cel}) \times 1 \text{ cm}$$

$$C = 1.08 \times 10^8 \text{ cel. cm}$$

- Concentración del inóculo para B3

$$0.976 = (9.65 \times 10^{-10} \text{ cel}) \times 1 \text{ cm}$$

$$C = 1.01 \times 10^8 \text{ cel. cm}$$

*Cálculo de Absortividad Molar

Para obtener la concentración a partir de la absorbancia es necesario conocer la absortividad molar del soluto. En este caso la aplicación para hallar la concentración del inóculo se realizó mediante el método espectrofotométrico, para lo cual se hizo una suspensión con la turbidez de la escala de Mc Farland 0.5, una vez obtenida la suspensión se leyó al espectrofotómetro.

Una vez obtenida la absorbancia, con el valor de la concentración de la escala de Mc Farland 0.5 y la Ley de Beer - Lambert se halló ϵ .

ϵ para cepa Gluconacetobacter B1

$$A = \epsilon \cdot b \cdot C$$

$$0.875 = \epsilon \cdot (9 \times 10^8 \frac{cel}{mL} \cdot 1 cm^3)$$

$$\epsilon = (9.72 \times 10^{-10} cel)$$

ϵ para cepa Gluconacetobacter B3

$$0.869 = \epsilon \cdot (9 \times 10^8 \frac{cel}{mL} \cdot 1 cm^3)$$

$$\epsilon = (9.65 \times 10^{-10} cel)$$

ANEXO 8

Preparación de Escala de Mac-Farland

La escala de Mc Farland es una curva estándar construida con una suspensión testigo de concentración celular conocida. Se basa en la mezcla de concentraciones crecientes de cloruro de bario con concentraciones decrecientes de ácido sulfúrico obteniéndose un precipitado de sulfato de bario en cantidades diferentes.

Materiales

- Balanza electrónica
- Embudo
- 11 Fiolas de 50 mL
- 12 Matraces aforados de 50 mL
- Varillas
- Vidrio de reloj

Reactivos

- Ácido sulfúrico
- Agua destilada
- Cloruro de bario

Procedimiento:

Para realizar los cálculos tenemos que tener en cuenta la siguiente tabla

Fiola	BaCL ₂ (mL)	H ₂ SO ₄ (mL)	N° de células /mL
0.5	0.05	9.95	1.5x10 ⁸
1	0.1	9.9	3.0x10 ⁸
2	0.2	9.8	6.0x10 ⁸
3	0.3	9.7	9.0x10 ⁸
4	0.4	9.6	1.2x10 ⁹
5	0.5	9.5	1.5x10 ⁹
6	0.6	9.4	1.8x10 ⁹
7	0.7	9.3	2.1x10 ⁹
8	0.8	9.2	2.4x10 ⁹
9	0.9	9.1	2.7x10 ⁹
10	1	9	3.0x10 ⁹

Con estos datos podemos deducir que necesitaremos preparar 5 soluciones madre y el resto serán obtenidas por dilución.

Fiola	Concentración	Dilución	Fiola	Concentración
10	3.0×10^9	1/10	1	3.0×10^8
		1/2	5	1.5×10^9
5	1.5×10^9	1/10	0.5	1.5×10^8
9	2.7×10^9	1/3	3	9.0×10^8
8	2.4×10^9	1/2	4	1.2×10^9
4	1.2×10^9	1/2	2	6.0×10^8
6	1.8×10^9			
7	2.1×10^9			

Los cálculos que se han realizado para llevar los volúmenes adecuados a cada solución madre son los siguientes:

- CLORURO DE BARIO 0.048 M, 50 mL

$$n = M \cdot V$$

$$n = 0.048 \cdot 0.05 = 0.0025 \text{ mol}$$

$$M_m = 208.26$$

$$m = n \cdot M_m$$

$$m = 0.0025 \cdot 208.6 = 0.5 \text{ g}$$

El cloruro de bario viene hidratado por lo tanto

$$X = 0.5 \cdot (224.28 / 206.26) = 0.54 \text{ g}$$

- ÁCIDO SULFÚRICO 0.18 M, 50 mL

$$p = 1.84 \text{ g/mL}$$

$$n = M \cdot V$$

$$n = 0.18 \cdot 0.05 = 0.009 \text{ mol}$$

$$M_m = 98$$

$$m = n \cdot M_m$$

$$m = 0.009 \cdot 98 = 8.82 \text{ g}$$

$$m(\text{total}) = 8.82 \cdot (100 / 98) = 9 \text{ g}$$

$$V = m / p = 4.9 \text{ mL}$$

Resultados e interpretación:

Los resultados son 11 fiaslas numeradas del 1 al 11 de menor a mayor concentración que se usarán para realizar el recuento de bacterias en caldo nutritivo.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----



*Fuente: "Patrón de Turbidez BBL preparado", de Dickinson, B; (2005).USA.

ANEXO 9

Tabla de concentración de Celulosa para las diferentes condiciones de cultivo

Variables		Concentración g/mL	
Temperatura	Tiempo incubación	B3	B1
25°C	7 días	0.0918	0.1105
25°C	10 días	0.1195	0.1466
25°C	14 días	0.1326	0.1686
28°C	7 días	0.1651	0.2112
28°C	10 días	0.1794	0.2248
28°C	14 días	0.1938	0.2528
30°C	7 días	0.2318	0.2822
30°C	10 días	0.2515	0.2700
30°C	14 días	0.2381	0.2569

ANEXO 10

Tabla de relación en la producción de ácido acético y pH

Días	B1	
	Ácido acético(g)	pH
1	-	7
2	2	6
3	2	6
4	3	5.4
5	3.5	5
6	3.9	3.8
7	4.1	3.8
8	4.3	3.6
9	4.8	3.6
10	5.9	3.5
11	5.8	3.5
12	5.5	3.8
13	4.9	4
14	4	4.3

ANEXO 11

Datos obtenidos por Densidad óptica

Tomados cada 12 horas por un período de tiempo total de 14 días a diferentes temperaturas.

- MUESTRA A 25 °C**

TIEMPO (H)	DENSIDAD ÓPTICA(560 nm)	TIEMPO (H)	DENSIDAD ÓPTICA(560 nm)
0	0	180	1.19
12	0.06	192	1.23
24	0.53	204	1.19
36	0.7	216	1.32
48	0.82	228	1.17
60	0.68	240	1.49
72	1.03	252	1.07
84	0.97	264	1.1
96	1.01	276	0.91
108	1	288	1.02
120	1.4	300	0.94
132	1.26	312	0.98
144	1.58	324	1.62
156	1.5	336	1.62
168	1.38		

• MUESTRA A 28 °C

TIEMPO (H)	DENSIDAD ÓPTICA(560 nm)	TIEMPO (H)	DENSIDAD ÓPTICA(560 nm)
0	0	180	1.59
12	0.33	192	1.62
24	0.62	204	1.35
36	0.79	216	1.16
48	0.86	228	1.1
60	0.78	240	1.74
72	0.91	252	1.19
84	1.13	264	0.86
96	1.45	276	0.94
108	1.36	288	0.76
120	1.44	300	0.81
132	1.57	312	0.65
144	1.6	324	0.62
156	1.59	336	1.59
168	1.66		

• MUESTRA A 30 °C

TIEMPO (H)	DENSIDAD ÓPTICA(560 nm)	TIEMPO (H)	DENSIDAD ÓPTICA(560 nm)
0	0	180	1.41
12	0.26	192	1.18
24	0.56	204	1.04
36	0.84	216	0.96
48	0.96	228	0.87
60	1.21	240	0.9
72	1.36	252	0.76
84	1.54	264	0.81
96	1.61	276	0.69
108	1.69	288	0.62
120	1.75	300	0.59
132	1.67	312	0.49
144	1.54	324	0.71
156	1.48	336	0.74
168	1.33		

ANEXOS 12

Curvas de crecimiento en las diferentes condiciones de cultivo

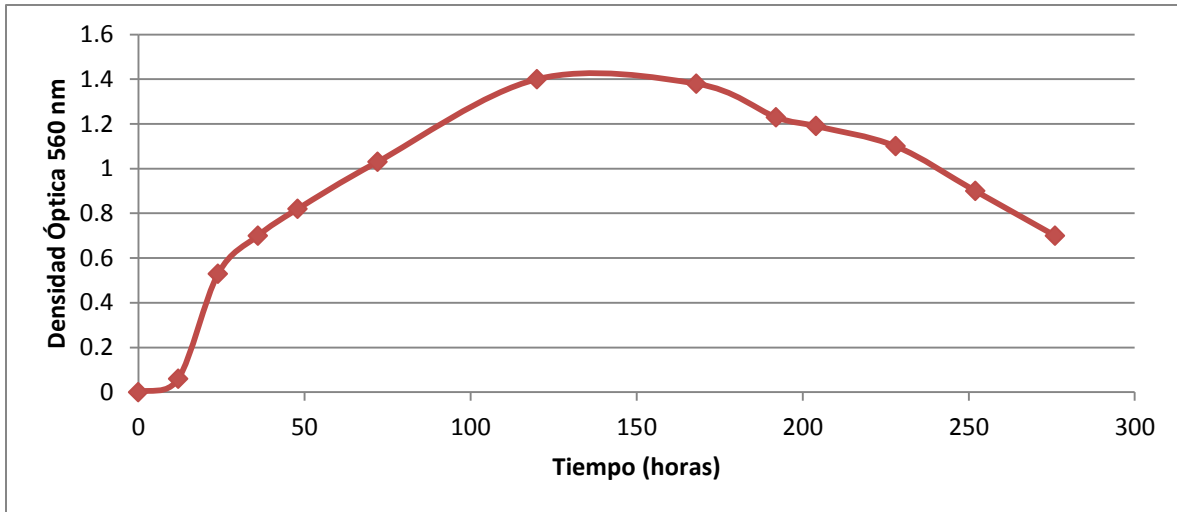


Figura 47. Curva de crecimiento de la cepa B1 a 25 °C por 14 días de incubación

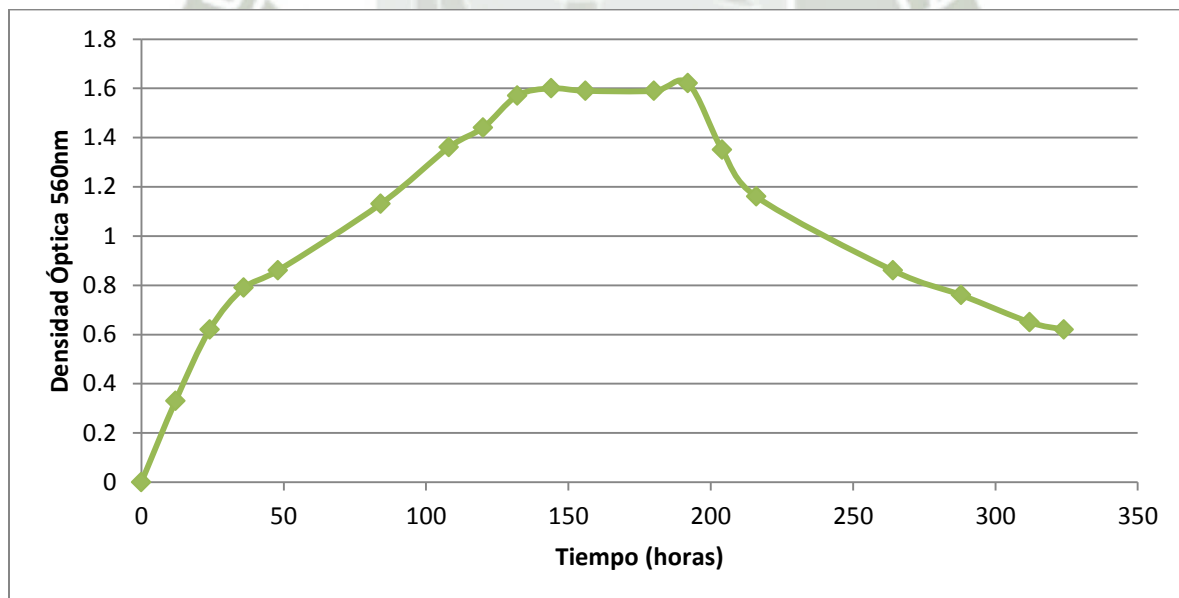


Figura 48. Curva de crecimiento de la cepa B1 a 28 °C por 14 días de incubación

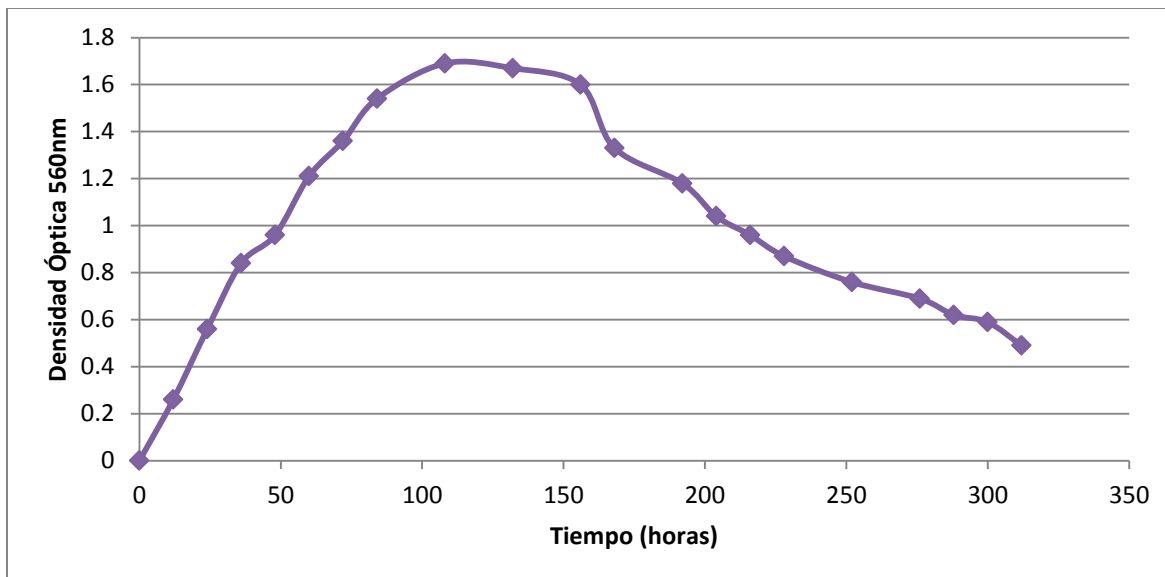


Figura 49. Curva de crecimiento de la cepa B1 a 30 °C por 14 días de incubación.