



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“DETERMINACIÓN *in vitro* DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DEL
ÓXIDO DE GRAFENO, COPOS DE POCAS CAPAS DE GRAFENO Y
NANOHÍBRIDO DE GRAFENO CON PLATA”**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado por optar al grado académico de:

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTORA: PAMELA MONSERRATH MORALES LAYEDRA

DIRECTOR: Dr. FABIÁN ERNESTO ARIAS ARIAS. PhD.

Riobamba – Ecuador

2021

© 2021, Morales Layedra Pamela Monserrath

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Yo, Pamela Monserrath Morales Layedra, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y los resultados de este son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autora asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, de 2021




A handwritten signature in black ink, enclosed within a hand-drawn oval. The signature reads "Pamela Morales" in a cursive script.

Pamela Monserrath Morales Layedra

060408933 – 4

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de titulación: Tipo: experimental “**DETERMINACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DEL ÓXIDO DE GRAFENO, COPOS DE POCAS CAPAS DE GRAFENO Y NANOHÍBRIDO DE GRAFENO CON PLATA**”, realizado por la señorita: **PAMELA MONSERRATH MORALES LAYEDRA**, ha sido minuciosamente revisado por los miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
BQF. Norma Cecilia Toaquiza Aguagallo PRESIDENTE DEL TRIBUNAL	 Firmado electrónicamente por: NORMA CECILIA TOAQUIZA AGUAGALLO	2021-07-21
Dr. Fabián Ernesto Arias Arias. PhD. DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	 Firmado electrónicamente por: FABIAN ERNESTO	2021-07-21
Dra. Janneth María Gallegos Nuñez. PhD MIEMBRO DEL TRIBUNAL	JANNETH MARIA Gallegos Nuñez GALLEGOS NUNEZ  Firmado digitalmente por JANNETH MARIA GALLEGOS NUNEZ	2021-07-21

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo a las futuras generaciones que como yo estén ávidas del saber, la ciencia y la investigación

Pame.

AGRADECIMIENTO

Mi agradecimiento a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo cuna del saber, a los docentes de la Facultad de Ciencias, de manera especial a los de la Escuela de Bioquímica y Farmacia por haber contribuido con mi educación y con su ejemplo haber forjado en mí valores importantes de mi personalidad.

Al Dr. Fabián Arias PhD. por su valioso asesoramiento durante todo el proceso de la realización de éste proyecto.

A los técnicos de todos y cada uno de los laboratorios que fueron un pilar fundamental durante el desarrollo del trabajo experimental y de manera especial a la Dra. Patricia Layedra por su apoyo incondicional.

A mis padres, mi hermana, mis tíos y mis abuelitos que con su amor supieron guiar mi camino tanto en lo personal como en lo académico y han sido mi soporte durante toda la vida.

A mi novio y a mis amigos, por su cariño, respaldo y solidaridad.

Pame.

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS	xiv
RESUMEN.....	xv
INTRODUCCIÓN	1

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	3
------------------------------------	---

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....	4
1.1. <i>Antecedentes</i>	4
1.2. <i>El Grafeno</i>	5
1.2.1. <i>Desarrollo Histórico del Grafeno</i>	5
1.2.2. <i>Estructura del Grafeno</i>	7
1.2.3. <i>Métodos de Obtención del Grafeno</i>	7
1.2.4. <i>Propiedades del Grafeno</i>	8
1.2.5. <i>Aplicaciones del Grafeno</i>	10
1.2.5.1. <i>Aplicaciones Biomédicas del Grafeno</i>	10
1.3. <i>Alternativas Farmacoterapéuticas Utilizando el Grafeno</i>	11
1.3.1. <i>Toxicidad del grafeno</i>	12
1.4. <i>Nanopartículas derivadas del Grafeno</i>	12
1.4.1. <i>Óxido de Grafeno</i>	12
1.4.1.1. <i>Síntesis del Óxido de Grafeno</i>	13
1.4.1.2. <i>Propiedades del Óxido de Grafeno</i>	13
1.4.2. <i>Nanohíbrido de Óxido de Grafeno con Nanopartículas de Plata</i>	14
1.4.2.1. <i>Síntesis del Nanohíbrido de Óxido de Grafeno con Plata</i>	14
1.4.2.2. <i>Propiedades y Aplicaciones del Nanohíbrido de Óxido de Grafeno con Plata</i>	14
1.4.3. <i>Copos de Pocas Capas de Grafeno</i>	15
1.4.3.1. <i>Síntesis de Copos de Pocas Capas de Grafeno</i>	15
1.4.4. <i>Nanopartículas de Plata</i>	15

1.4.4.1.	<i>Síntesis de Nanopartículas de Plata</i>	15
1.4.4.2.	<i>Propiedades y Aplicaciones de Nanopartículas de Plata</i>	16
1.5.	<i>Actividad Antimicrobiana</i>	16
1.5.1.	<i>Actividad Antimicrobiana del Grafeno</i>	16
1.5.1.1.	<i>Mecanismo de Acción Del Grafeno</i>	16
1.5.2.	<i>Actividad Antimicrobiana de AgNP's</i>	17
1.5.2.1.	<i>Mecanismo de Acción de AgNP's</i>	17
1.6.	<i>Resistencia Bacteriana</i>	18
1.6.1.	<i>Tipos de resistencia bacteriana</i>	18
1.6.2.	<i>Mecanismos de resistencia bacteriana</i>	18
1.7.	<i>Bacterias</i>	19
1.7.1.	<i>Staphylococcus aureus</i>	19
1.7.1.1.	<i>Clasificación taxonómica del S. aureus</i>	19
1.7.1.2.	<i>Patogenicidad del S. aureus</i>	20
1.7.1.3.	<i>Resistencia bacteriana del S. aureus</i>	20
1.7.2.	<i>Escherichia coli</i>	21
1.7.2.1.	<i>Clasificación taxonómica de la E. coli</i>	21
1.7.2.2.	<i>Patogenicidad de la E. coli</i>	22
1.7.2.3.	<i>Resistencia bacteriana de la E. coli</i>	22
1.7.3.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
1.7.3.1.	<i>Clasificación taxonómica de la P. aeruginosa</i>	23
1.7.3.2.	<i>Patogenicidad de la P. aeruginosa</i>	23
1.7.4.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	24
1.7.4.1.	<i>Clasificación taxonómica de la K. pneumoniae</i>	25
1.7.4.2.	<i>Patogenicidad de la K. pneumoniae</i>	25
1.7.4.3.	<i>Resistencia bacteriana de la K. pneumoniae</i>	25

CAPÍTULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO	26
2.1.	<i>Lugar de la investigación</i>	26
2.2.	<i>Materiales, equipos y reactivos</i>	26
2.2.1.	<i>Nanopartículas</i>	26
2.2.2.	<i>Material microbiológico</i>	26

2.2.3.	<i>Materiales de laboratorio utilizados</i>	27
2.2.4.	<i>Equipos</i>	28
2.2.5.	<i>Reactivos</i>	29
2.3.	<i>Técnicas y métodos</i>	30
2.3.1.	<i>Síntesis de Nanopartículas</i>	30
2.3.1.1.	<i>Síntesis de Óxido de Grafeno</i>	30
2.3.1.2.	<i>Síntesis de Copos de Pocas Capas de Grafeno</i>	30
2.3.1.4.	<i>Síntesis de Nanopartículas de Plata</i>	31
2.3.2.	<i>Caracterización de las Nanopartículas</i>	32
2.3.2.1.	<i>Espectrofotometría UV – visible</i>	32
2.3.2.2.	<i>Caracterización de nanopartículas por FT – IR</i>	32
2.3.2.3.	<i>Caracterización de nanopartículas sintetizadas por SEM</i>	32
2.3.3.	<i>Evaluación de la actividad antimicrobiana de las nanopartículas sintetizadas</i>	32
2.3.3.1.	<i>Cepas empleadas y su activación</i>	33
2.3.3.2.	<i>Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) por dilución en caldo</i>	33
2.3.3.3.	<i>Evaluación de la actividad inhibitoria por ensayo de difusión en agar</i>	35

CAPÍTULO III

3.	MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	36
3.1.	<i>Síntesis de nanopartículas</i>	36
3.1.1.	<i>Síntesis de óxido de grafeno</i>	36
3.1.1.1.	<i>Espectro UV – vis de óxido de grafeno</i>	37
3.1.1.2.	<i>FT – IR de óxido de grafeno</i>	38
3.1.2.	<i>Síntesis de copos de pocas capas de grafeno</i>	39
3.1.2.1.	<i>Espectro UV – vis de CPCG</i>	39
3.1.3.	<i>Síntesis de CPCG con nonilfenol</i>	40
3.1.3.1.	<i>UV – Vis de CPCG con nonilfenol</i>	41
3.1.4.	<i>Síntesis de nanopartículas de plata</i>	41
3.1.4.1.	<i>UV – vis de AgNP's</i>	43
3.1.5.	<i>Síntesis de nanohíbrido de óxido de grafeno con plata</i>	43
3.1.6.	<i>Determinación de la estructura mediante Microscopio de Barrido Electrónico (SEM)</i>	44
3.1.6.1.	<i>Óxido de Grafeno</i>	44

3.1.6.2.	<i>Copos de pocas capas de grafeno</i>	45
3.1.6.3.	<i>Nanopartículas de plata</i>	45
3.1.6.4.	<i>Nanohíbrido de óxido de grafeno con plata</i>	46
3.2.	<i>Evaluación de la actividad antimicrobiana de las nanopartículas sintetizadas</i>	46
3.2.1.	<i>Inóculos utilizados en los ensayos microbiológicos</i>	46
3.2.2.	<i>Determinación de la CIM</i>	47
3.2.2.1.	<i>CIM Óxido de Grafeno</i>	48
3.2.2.2.	<i>CIM Copos De Pocas Capas de Grafeno</i>	50
3.2.2.3.	<i>CIM Copos De Pocas Capas de Grafeno con nonilfenol</i>	53
3.2.2.4.	<i>CIM para nanohíbrido de óxido de grafeno con plata</i>	55
3.2.2.5.	<i>CBM para las nanopartículas sintetizadas</i>	58
3.3.	<i>Análisis Estadístico</i>	59
3.3.1.	<i>Óxido de Grafeno</i>	59
3.3.2.	<i>Copos de Pocas Capas de Grafeno</i>	61
3.3.3.	<i>Nanohíbrido de óxido de grafeno con plata</i>	61
CONCLUSIONES		64
RECOMENDACIONES		66
GLOSARIO		
BIBLIOGRAFÍA		
ANEXOS		

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1 Clasificación Taxonómica de <i>Staphylococcus aureus</i>	19
Tabla 2-1 Clasificación Taxonómica de <i>Escherichia coli</i>	21
Tabla 3-1 Clasificación Taxonómica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23
Tabla 4-1 Clasificación Taxonómica de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	25
Tabla 1-2 Descripción de los materiales de laboratorio utilizados.....	27
Tabla 2-2 Equipos utilizados en la investigación.....	28
Tabla 3-2 Descripción de los reactivos utilizados.....	29
Tabla 1-3 UFC tubo de control	47
Tabla 2-3 Resultados del CIM de óxido de grafeno en caldo LB	49
Tabla 3-3 Resultados del antibiograma en agar Müller Hinton	50
Tabla 4-3 Resultados del CIM de copos de pocas capas de grafeno en.....	51
Tabla 5-3 Resultados del CIM de DMF en caldo LB.....	51
Tabla 6-3 Resultados del antibiograma en agar Müller Hinton	52
Tabla 7-3 CIM para nonilfenol.....	53
Tabla 8-3 Resultados del CIM de copos de pocas capas de grafeno con nonilfenol en caldo LB ...	54
Tabla 9-3 Resultados del antibiograma en agar Müller Hinton	54
Tabla 10-3 Resultados del CIM de nanohíbrido de óxido de grafeno.....	56
Tabla 11-3 Resultados del antibiograma en agar Müller Hinton	57
Tabla 12-3 CBM en placa de agar TSA	58
Tabla 13-3 Análisis estadístico. CIM del óxido de grafeno, ANOVA.....	60
Tabla 14-3 Diferencias significativas entre las cepas bacterianas, Test Tukey.	60
Tabla 15-3 Análisis estadístico. CIM del nanohíbrido de óxido de grafeno con plata, ANOVA. ...	62
Tabla 16-3 Diferencias significativas entre las cepas bacterianas, Test Tukey.	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-2 Representación gráfica de las pruebas realizadas para la determinación de CIM y CBM de cada nanopartícula a diferentes concentraciones, para cada cepa bacteriana y su control.....	35
Figura 2-2 Esquema del tratamiento de difusión en agar para GO a las diferentes concentraciones a las que se encuentra la nanopartícula junto con el control negativo y el control positivo.	35
Figura 1-3 Solución de óxido de grafeno.....	36
Figura 2-3 Óxido de Grafeno en estado seco.....	36
Figura 3-3 Copos de grafeno de.....	39
Figura 4-3 Copos de Pocas Capas.....	40
Figura 5-3 Nanopartículas de plata.....	41
Figura 6-3 Solución de nanopartículas de plata.....	42
Figura 7-3 Nanohíbrido de óxido.....	43
Figura 8-3 Micrografía SEM (x190) del óxido de Grafeno.....	44
Figura 9-3 Micrografía SEM (x600) de <i>CPCG</i>	45
Figura 10-3 Micrografía SEM (x160) de <i>AgNPs</i>	45
Figura 11-3 Micrografía SEM (x150) de OG - Ag.....	46
Figura 12-3 CIM para DMF.....	52
Figura 15-3 CIM para nonilfenol.....	53

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3 Espectro de absorbancia UV - Vis de óxido	37
Gráfico 2-3 Espectro FT - IR de óxido de grafeno.....	38
Gráfico 3-3 Espectro de absorbancia UV - Vis de copos de pocas capas	39
Gráfico 4-3 Espectro de absorbancia UV - Vis de CPCG con nonilfenol.....	41
Gráfico 5-3 Espectro de absorbancia UV - Vis de nanopartículas de plata	43
Gráfico 6-3 CIM óxido de grafeno, Test de Tukey.....	61
Gráfico 7-3 CIM nanohíbrido de óxido de grafeno con plata, Test de Tukey.	63

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A. CIM DE ÓXIDO DE GRAFENO

ANEXO B. CIM DE COPOS DE POCAS CAPAS DE GRAFENO

ANEXO C. CIM DE OG - AG

ANEXO D. CIM PARA CPCG CON NONILFENOL

ANEXO E. ANOVA Y TEST DE TUKEY PARA ÓXIDO DE GRAFENO

ANEXO F. ANOVA Y TEST DE TUKEY PARA NANOHÍBRIDO DE ÓXIDO DE GRAFENO
CON PLATA.

RESUMEN

El presente trabajo de titulación tuvo como objetivo determinar la actividad bactericida de derivados del grafeno, el óxido de grafeno (GO), los copos de pocas capas de grafeno (CPCG) y el nanohíbrido de grafeno con plata (GO - Ag) utilizando un método *in vitro* frente a cepas bacterianas, comunes agentes de infecciones humanas, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*. Para realizar los ensayos microbiológicos se llevó a cabo la síntesis de las nanopartículas por medio de procesos químicos sencillos; la actividad bactericida fue determinada por medio de la valoración de la concentración bactericida mínima (CIM) de cada nanopartícula a diferentes concentraciones frente a cada bacteria a una concentración específica, esto fue realizado por medio de dilución en caldo con medio de cultivo, caldo LB, en donde se observó el crecimiento bacteriano o no, dependiendo de la presencia de turbidez, también se determinó la CIM por medio de una difusión en agar en medio de cultivo Müller Hinton, en la cual se midieron los halos de inhibición que presentaron las bacterias frente a cada nanopartícula, además se colocó uno de los antibióticos más utilizados frente a infecciones causadas por cada bacteria para realizar una comparación de su actividad, se determinó si entre cada tratamiento existen diferencias significativas por medio de un análisis ANOVA con test de Tukey. Se concluye que la nanopartícula con mayor efecto bactericida fue el GO debido a sus características físicas y químicas que presenta el nanomaterial sobretodo frente a las bacterias Gram negativas. Se recomienda realizar estudios a diferentes concentraciones tanto de nanopartículas como de las cepas bacterianas y correlacionar los resultados para verificar si los nanomateriales poseen mayor o menor actividad bactericida al momento de cambiar los parámetros utilizados en el estudio.

Palabras clave: <ÓXIDO DE GRAFENO>, <CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA>, <CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA>, <MICROBIOLOGÍA>



Fijado electrónicamente por:
RAFAEL INTY
SALTO

1557-DBRA-UTP-2021

ABSTRACT

To establish the bactericidal activity of graphene derivatives such as graphene oxide (GO), graphene few-layered flakes and the nanohybrid of graphene oxide with silver (GO-Ag), was the objective of this investigative work, by using a method in vitro against bacterial strains that are common agents of human infections, which were strains of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. In order to carry out all the microbiological tests, the synthesis of each of the nanoparticles was first carried out through simple chemical processes, the bactericidal activity was determined by evaluating the minimum bactericidal concentration (MIC) of each nanoparticle at different concentrations against each bacterial strain at a specific concentration, this was done by dilution in broth with culture medium, LB broth, where bacterial growth was observed or not, depending on the presence of turbidity, the MIC was also determined by means of an agar diffusion in Müller Hinton culture medium, in which the inhibition halos that the bacteria presented against each nanoparticle were measured, in addition, one of the most used antibiotics was placed against infections caused by each bacterium to perform a comparison of its activity, finally it was determined whether there are significant differences between each treatment, active through ANOVA analysis together with a Tukey test. It is concluded that the nanoparticle with the greatest bactericidal effect was the graphene oxide by its physical and chemical properties of the nanomaterial specially against to Gram bacteria that have a cell wall thinner and more accessible to the nanoparticle bacterial activity. It is recommended to carry out studies at different concentrations of both nanoparticles and bacterial strains and correlate the results to verify whether the nanomaterials have greater or lesser bactericidal activity when changing the parameters used in the present study.

Keywords: <GRAPHENE OXIDE>, <CONCENTRATION MINIMUM BACTERICIDE>, <MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION>, <MICROBIOLOGY>.

INTRODUCCIÓN

A partir de la primera década del siglo XXI, los avances en la nanotecnología aplicada específicamente en el área de medicina, conocida en la actualidad como nanomedicina, se han enfocado principalmente en el desarrollo de nanopartículas, nanoestructuras y nanodispositivos útiles para la rápida detección y tratamiento de enfermedades neoplásicas, cardiovasculares, autoinmunes e infecciosas bacterianas. Esto se da debido a que los nanocompuestos y nanomateriales poseen una mayor área de superficie y características físico – químicas únicas en lo que se refieren a parámetros de conductividad, propiedades mecánicas, magnéticas, ópticas y catalíticas (Gómez, 2017).

En el área de la nanotecnología farmacéutica se ha venido estudiando la actividad bactericida que poseen diferentes tipos de nanopartículas frente a diversas bacterias patógenas responsables de ciertas infecciones en humanos, es así, que a partir del descubrimiento del grafeno en el 2004 por los investigadores Geim y Novoselov (Gago, 2016), se han realizado estudios para dar a conocer sus extraordinarias propiedades frente diferentes tipos de microorganismos, por lo que se ha considerado a éste y a sus derivados, tales como el grafeno oxidado y el óxido de grafeno reducido, como una importante fuente para ser utilizado como principio activo en medicamentos o como transporte de otros principios activos utilizados para patologías bacterianas (Mokkapati, 2018).

El grafeno es considerado una nanopartícula, que se obtiene a partir de la separación de la única lámina de átomos de carbono que posee el grafito, dentro de la nanomedicina es muy utilizado ya que posee la capacidad de interactuar con los tejidos y células vivas. Esta propiedad también las posee otras nanopartículas de importancia como son el cobre, la plata, el cadmio, el zinc, entre otras; sin embargo, se le ha dado mayor importancia al grafeno ya que tiene una alta compatibilidad con la administración de fármacos, terapias neoplásicas y con biosensores gracias a su gran superficie, estabilidad química y biocompatibilidad (Real, 2014).

Los antibióticos son un elemento clave para combatir infecciones tanto comunitarias como nosocomiales, por lo que su introducción en la práctica clínica durante los años cuarenta en el siglo XX, fue de gran importancia ya que aumentaron significativamente la esperanza de vida de la población, disminuyendo así la tasa de morbimortalidad alrededor del mundo, sin embargo se ha visto una amenaza creciente frente al deterioro de su eficacia: la resistencia bacteriana a los antibióticos, las primeras bacterias que presentaron esta resistencia fueron las Gram negativas (*E. coli*, *Klebsiella sp*, *Pseudomonas aeruginosa*) y posteriormente las bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*,

Enterococcus faecalis), dicha resistencia es el mecanismo por el cual el microorganismo genera la capacidad de sobrevivir frente a las diferentes formas en las que actúan los medicamentos sobre estos; esto se debe gracias a muchas causas, pero las principales se han producido debido al mal uso que se les ha dado a los antibióticos o al abuso de los mismos (Alós, 2015; Maguiña, 2016).

La aplicación de terapias farmacológicas que incluyan fármacos provenientes del grafeno sería de vital importancia dentro de la medicina ya que se ha demostrado que su actividad es eficaz frente a bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas a pesar de que tienen un mecanismo de resistencia totalmente diferente (Bouchareb et al, 2020). Debido a lo planteado la presente investigación servirá como una alternativa a ser considerada ante esta problemática mundial. La posible actividad bactericida del grafeno y sus derivados será evaluada en diferentes cepas bacterianas causantes de patologías comunes a nivel ambulatorio.

Esta investigación tiene como objetivo el estudio del grafeno y sus derivados en la identificación de su capacidad antimicrobiana. Este proyecto experimental está relacionado con el grupo de investigación *Physic Research Group* (PRG) de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, el cual colaborará con la estudiante en la síntesis de las nanopartículas. La capacidad antimicrobiana será analizada mediante una metodología *in vitro*, por medio de la siembra de cepas bacterianas en medios de cultivos adecuados para su crecimiento, un método sencillo y accesible, que ya ha sido utilizado en varios estudios para la valoración de la posible o no actividad bactericida del grafeno identificando la resistencia o susceptibilidad que estas pueden llegar a tener frente a los diferentes nanomateriales (Mokkupati, 2018).

Este estudio tiene una viabilidad económica factible ya que al estar ligado al grupo de investigación PRG que cuenta con los recursos económicos, humanos y tecnológicos que facilitan el desarrollo de este y otros gastos serán cubiertos por parte del estudiante.

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo general

- Determinar la actividad bactericida del óxido de grafeno, copos de pocas capas de grafeno y nanohíbrido de grafeno con plata por métodos *in vitro*, durante el período Octubre 2020 – Enero 2021

Objetivos específicos

- Identificar el tipo de grafeno que presenta una mayor actividad bactericida frente a las cepas seleccionadas.
- Comparar la capacidad inhibitoria mínima del tipo de grafeno con mayor actividad bactericida con el fármaco de uso común para las cepas seleccionadas.
- Relacionar la capacidad mínima bactericida de los fármacos de uso más común con el derivado de grafeno con mayor actividad antimicrobiana.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1. Antecedentes

A través de los años varios científicos han realizado diversos estudios acerca de las propiedades antimicrobianas frente a bacterias patógenas responsables de infecciones humanas, que posee el grafeno y a su vez sus derivados más utilizados, como el óxido de grafeno, el óxido de grafeno reducido y también la actividad que podría poseer la nanohibridación del grafeno con otros metales como la plata o el cromo por medio de estudios cromatográficos y microbiológicos (Mokkapati, 2018).

En un estudio realizado en Suecia acerca de la respuesta antibacteriana del GO y el óxido de grafeno reducido (rGO) integrado en placas de agar, determinaron que el nivel de la actividad antibacteriana depende de muchos factores como el tipo de sustrato, número de capas, la forma del grafeno, el tipo de solvente y sobre todo la clase de bacteria a estudiar. Las cepas bacterias utilizadas en este estudio fueron *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa*, con éstas determinaron que el rGO presentaba una fuerte actividad frente a ambas cepas y que el GO resultó inofensivo para los dos tipos de bacterias, por lo que llegaron a la conclusión de que la respuesta bacteriana dependía netamente de la forma de grafeno utilizado (Mokkapati, 2018).

Según Bouchareb en su estudio acerca de funcionalización no covalente del óxido de grafeno utilizando el autoensamblaje de plata-trifenilfosfina para formulaciones bactericidas en donde determinó si el GO y la formación de un GO - Ag podría tener actividad antimicrobiana frente a doce diferentes especies de bacterias Gram positivas y Gram negativas, llegó a la conclusión que la actividad antimicrobiana del GO – Ag frente a los dos tipos de cepas bacterianas es prometedora, pero no expone resultados concretos y afirma que estas propiedades seguirán siendo estudiadas en investigaciones futuras (Bouchareb, 2020).

En otro estudio realizado por el departamento de Ciencia y Tecnología de la Universidad del País Vasco, buscaron determinar la actividad antimicrobiana de nanohíbridos antimicrobianos para que puedan ser una alternativa fármaco terapéutica gracias a sus propiedades sinérgicas, para este estudio se utilizó GO decorado con nanopartículas de plata (AgNP's). En la investigación ponen en manifiesto que las propiedades antimicrobianas de los nanohíbridos contra las bacterias Gram

negativas *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* Gram positivo y la levadura *Candida* dependen de la concentración y el tiempo de incubación, además proponen que *C. albicans* y *S. aureus* mostraron la mayor susceptibilidad frente a GO-Ag (Cobos et al, 2020).

Según lo investigado en nuestro país no existe ningún estudio similar al presente o al menos no se encuentra publicado en una base de datos confiable.

1.2. El Grafeno

Es una forma alotrópica del carbono que presenta una estructura molecular en forma de un cristal bidimensional organizado en una red hexagonal, con el espesor de un átomo. Está conformado por átomos de carbono y enlaces covalentes generados a partir de la superposición de híbridos sp^2 de los carbonos enlazados. Este material se caracteriza por ser ligero, flexible, buen conductor térmico y eléctrico, con una gran dureza y transparente (Paz, 2018).

1.2.1. Desarrollo histórico del Grafeno

Su historia comienza con el grafito en el año 1859 cuando el químico británico Benjamín Brodie, expuso al grafito a fuertes ácidos como el nítrico y el sulfúrico y después de varios experimentos señaló que el peso atómico del grafito es de 33 g/mol, por lo que el investigador creyó haber descubierto un nanomaterial llamado “graphon”, pero en realidad lo que había obtenido fue una suspensión de minúsculos cristales de óxido de grafeno (Amor, 2017).

Antes de la década de los años 30 se creía que el grafeno no podía existir ya que los físicos Lev Landáu y Rudolf Peierls mencionaron que no era posible obtener un material bidimensional por el hecho de ser termodinámicamente inestable, además apuntaban a que las fluctuaciones térmicas en las redes cristalinas bidimensionales se desplazarían a los átomos por los que estaban compuestos, es decir, la lámina se llegaría a desintegrar al ser expuesto a un ligero cambio de temperatura; después de varias investigaciones, se afirma que la existencia del grafeno es posible gracias a la presencia de pequeñas ondulaciones que este posee en su superficie, convirtiéndolo en un material termodinámicamente estable (Amor, 2017).

En los años 40, el investigador Wallace P. R. realizó varios estudios en los cuales habla acerca del grafeno como tal, ya que se centra en una sola capa de grafito, además da a conocer que esa capa no posee electrones dentro de la banda de conducción a temperaturas bajas, pero que a temperaturas más

altas y con mayor energía es posible que se pueda dar un paso de electrones de la banda de valencia a la banda de conducción de manera más sencilla, produciendo así un material con una buena transmisión de electricidad (Jiménez, 2017).

A mediados de los años 70 A. J. van Bommel junto con su equipo, produjeron grafeno por medio de un proceso netamente térmico, en el que se sometió carburo de silicio (SiC) a 800° C; durante el proceso observaron la formación de capas gráficas y que las diferentes caras del material se grafitizaron de diferente manera, el grafito formándose en la cara terminada en silicio era epitaxial, por lo que a éstas películas las denominaron grafito bidimensional, grafito monocapa o grafito epitaxial (Jiménez, 2017).

En los años 90 se comenzaron a realizar varios experimentos para poder obtener películas de grafito más delgadas por medio de exfoliación mecánica, pero no se concluyó nada más delgado de cincuenta capas hasta el año 2004; durante éste tiempo se suscitaron varias investigaciones acerca de las capas de grafito, entre las cuales, las que más se destacan fueron las de Yoshiko Oshashi, quien realizó estudios de tipo eléctricos sobre las películas delgadas de grafito; Rod Rouff utilizó un microscopio electrónico de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) para capturar fotografías de delgadas plaquetas de grafito; Thomas Ebbesen llegó a obtener 60 capas del material (Amor, 2017).

En el 2004, Andre Geim y Konstantin Novoselov, lograron aislar una sola capa de grafito, conocida como grafeno, para poder experimentar con ella. Empezaron a hacer investigaciones sobre unas pocas capas de grafeno, de unos 3 nm aproximadamente y además sobre una única capa de carbono, su primer estudio fue acerca del efecto de campo eléctrico en el grafeno, otro de sus estudios fue acerca del efecto Hall cuántico (QHE) que se presenta de manera poco usual en el grafeno a temperatura ambiente, es decir a 300 K, además con esto se afirmó que el grafeno tiene una conductividad nula, entre otros (Jiménez, 2017).

A 16 años de ser descubierto este material se ha centrado la atención previo a varios reportes de su comportamiento superconductor que depende del apilado de sus capas, sin embargo no solo se le ha puesto atención en esta propiedad, sino también se ha aprovechado sus demás propiedades para un amplio campo de aplicaciones como: material opto - electrónicos, biosensores dispositivos para tratamientos de desechos, electrodos para catálisis, entre otros (Urcuyo, 2021).

A pesar de haberse realizados varios estudios de las propiedades y aplicaciones del grafeno, se menciona que este material aún sigue presentando ciertos problemas de reproducibilidad a gran escala, dicha problemática es un tema muy estudiado en la actualidad ya que los procesos que se utilicen para su síntesis deben mantener las propiedades electrónicas, químicas, físicas y mecánicas del grafeno (Urcuyo, 2021).

1.2.2. Estructura del Grafeno

La estructura de este nanomaterial es bidimensional y sus átomos se encuentran unidos de manera muy fuerte sobre una superficie uniforme y plana con ondulaciones ligeras con un espesor del tamaño de un átomo. Su configuración atómica hexagonal se asemeja a la forma de un panal de abejas y gracias a esta el grafeno posee propiedades químicas, electrónicas y mecánicas excepcionales. A esta nanopartícula se la podría considerar como un bloque constructor para todos los materiales gráfiticos, como por ejemplo si se la enrollara cilíndricamente se obtienen nanotubos o si se lo superpone se obtiene grafito (Saldivar, 2014).

1.2.3. Métodos de obtención del Grafeno

Los investigadores enfrentan el gran problema de producir el nanomaterial a gran escala ya que todos los métodos que se utilizan para su obtención se limitan solo a entornos de laboratorio, pero se espera que con el tiempo y con demás investigaciones se logre producir el grafeno a escala industrial para que pueda ser aprovechado de mejor manera, en la actualidad se puede obtener el grafeno a través de los siguientes métodos:

- Exfoliación Micromecánica: Es una técnica sencilla pero rudimentaria en el proceso de identificación de láminas de grafeno que sean viables, para este proceso es necesario contar con una superficie limpia de grafito constituido por varias láminas de grafeno débilmente unidas. Para obtener grafeno por este método se debe someter al grafito a un raspado fino para luego extraer hojuelas considerablemente finas al ser deslaminadas repetidamente con cinta adhesiva, para su identificación se utiliza microscopía óptica, la mayoría de estas hojuelas obtenidas son tridimensionales, aunque se consideran también entre ellas una de forma bidimensional (Pachamango, 2018).
- Exfoliación Química: Este método está basado en la intercalación de moléculas entre las láminas de grafito, para que se pueda obtener el grafeno por este método es necesario preparar una

solución de grafito en un surfactante y posterior a esto se somete a sonicación. Las láminas que se obtienen por medio de éste método son de gran calidad pero su área superficial es muy pequeña, además por este método se evitan procesos de oxidación y reducción (Paz, 2018).

- Obtención epitaxial en carburo de silicio: Ésta técnica consiste en calentar el carburo de silicio a temperaturas mayores a 1100°C para que el grafeno pueda ser reducido. Por este proceso se obtiene grafeno epitaxial. Varias propiedades importantes del grafeno pueden ser identificadas por éste método (Pachamango, 2018).
- Reducción del óxido de grafito: Este método es considerado históricamente el primer método de síntesis de grafeno, P. Boehm en sus investigaciones en 1962 manifestó la presencia de escamas monocapas de óxido de grafeno reducido. Para la obtención de grafeno por este método se produce una oxidación y posterior una exfoliación del grafito en fase líquida (Paz, 2018).
- Deposición química de vapor (CVD): Para obtener grafeno por este método se coloca en el interior de una cámara el sustrato metálico que generalmente son níquel o rutenio, junto con metano, la cámara se calienta a 1000°C aproximadamente de manera que así se romperán los enlaces y se producirá el depósito de los átomos de carbono en la superficie del metal y posterior crecimiento de la lámina de grafeno (Paz, 2018).
- Obtención con metal-carbono derretido: El fundamento de esta técnica es la disolución de átomos de carbono en el interior de un metal de transición fundido a una determinada temperatura para posteriormente permitir que el carbono que se disuelve se precipite a bajas temperaturas como grafeno de una sola capa (Pachamango, 2018).
- Obtención a partir de nanotubos: Los nanotubos de carbono se proceden a cortar por acción del permanganato de potasio y ácido sulfúrico para obtener cintas de grafeno, por otro método las nanocintas de grafeno se obtienen mediante un proceso de grabado en plasma de nanotubos incrustados parcialmente en una película de polímero (Pachamango, 2018).
- Obtención por grafito por ultrasonido: Esta técnica consiste en la dispersión de grafito en un medio líquido adecuado en el que luego se agitan las partículas por medio de ondas sonoras ultrasónicas, el grafito que no fue exfoliado fue separado del grafeno por un proceso de centrifugación (Pachamango, 2018).

1.2.4. Propiedades del Grafeno

El grafeno posee características muy particulares, empezando por su extremada delgadez y su alta flexibilidad, además de ser uno de los materiales más duros y resistentes. Es un material trascendente ya que cuenta con propiedades ópticas, antimicrobianas, electrónicas, térmicas y mecánicas, lo que

lo convierte en un nanomaterial muy útil para ser implementado dentro de muchos campos de la ciencia (Graphenano, 2017).

A continuación, se detallan las más importantes:

- Es bidimensional, ya que está compuesto por finísimas capas de un átomo de espesor, por lo que solo se pueden apreciar sus dos dimensiones.
- Es transparente en estado puro debido a su poco espesor. Una monolámina de este material es capaz de absorber apenas un -2.3 % de luz blanca incidente que llega a su superficie, la absorción de la luz incrementa de acuerdo con el número de capas que presente el grafeno.
- Es flexible, maleable y elástico, la constante eléctrica del grafeno presenta un nivel muy alto, tanto que una lámina puede ser capaz de estirarse un 10 % de su tamaño normal de manera reversible y a su vez doblarse un 20 % sin sufrir ninguna variación, además es capaz de enrollarse y así formar nanotubos o adoptar cualquier forma que se le quiera dar.
- Es un material ultraligero, un metro cuadrado de lámina del material pesa 0.77 mg, además posee una gran superficie específica de 2600 m²/g lo que le hace capaz de autoenfriarse y seguir igual de ligero y flexible.
- Es un material duro y resistente, es altamente rígido por lo que soporta grandes fuerzas sin sufrir deformaciones. Posee una resistencia mecánica de 42 N/m.
- Es un potente conductor eléctrico y térmico, su conductividad eléctrica de 5000 W/mK es mayor que la de otros elementos como el cobre, la plata o el diamante, al igual que su conductividad eléctrica que es de 0.96-108 ($\Omega \cdot m^{-1}$).
- Es denso e impermeable, es un material bastante denso, tanto que no permite el paso de las moléculas de helio, sin embargo, se ha observado que sí deja pasar el agua, pero su velocidad de evaporación es muy alta.
- Es bactericida, siendo capaz de inhibir el crecimiento de bacterias y además de otros microorganismos como hongos y virus, sin afectar el ADN humano, y por ser carbono en estudios se ha demostrado que permite el crecimiento celular, por lo que puede ser utilizado como un sustrato interesante en medicina regenerativa o dentro de la industria alimentaria (Graphenano, 2017).

1.2.5. Aplicaciones del Grafeno

Gracias a las numerosas propiedades que posee el grafeno, este puede ser aplicado en numerosos campos, por lo que varias empresas y laboratorios trabajan continuamente para su desarrollo y poder ser utilizado de manera innovadora.

- En la electrónica: En el sector industrial de la electrónica es el consumidor mayoritario de grafeno manufacturado gracias a su gran potencial eléctrico; dentro de este sector algunas de las aplicaciones se encuentran pantallas transparentes, detector de huellas dactilares, antenas NFC entre otras (Paz, 2018).
- En la industria automovilística y aeroespacial, se lo utiliza para crear materiales nuevos que podrían servir para carrocerías y recubrimientos, el grafeno ayuda a mejorar el rendimiento de los materiales ya existentes lo que permite ampliar los campos de aplicación; es útil para reforzar otros materiales como resinas o plásticos ya que les aporta mayor resistencia dando así elementos más ligeros y flexibles (Paz, 2018).
- En el sector energético, el grafeno es considerado un material con un gran potencial, principalmente por su estructura bidimensional, su pequeño espesor, su resistencia mecánica, su elevada conductividad térmica y eléctrica, su gran área específica, su transparencia óptica y su flexibilidad inherente; generalmente se lo mezcla con polímeros con los que forman compuestos para mejorar las propiedades y rendimiento de los materiales ya existentes (Paz, 2018).

1.2.5.1. Aplicaciones biomédicas del Grafeno

Debido a las extraordinarias propiedades con las que cuenta el grafeno, es utilizado en la nano y bio medicina dentro de muchas aplicaciones como, por ejemplo:

- El transistor de efecto de campo (FET) del grafeno ha sido aplicado para la creación de biosensores que sean capaces de detectar biomoléculas importantes como proteínas, factores de crecimiento y ácidos nucleicos. El óxido de grafeno también ha sido utilizado como biosensor de transferencia de energía de resonancia (FRET) ya que tiene una fuerte interacción con el ADN monocatenario, permitiendo así la detección de moléculas de ADN monocatenario, proteínas, ATP, hormonas, micro ARN, además se ha podido identificar también ADN bicatenario (Rodríguez, 2016).

- Este material puede ser un sustituto en las matrices orgánicas de la espectroscopia de masas, esto se da gracias a las propiedades de transferencia de electrónica y disipación de calor que posee el grafeno (Rodríguez, 2016).
- Se ha demostrado que el grafeno tiene la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano en placas de GO y rGO, observando que el efecto de rGO es mayor que GO ya que tiene una mayor capacidad de transferencia de carga. También se ha visto que el grafeno tiene una alta biocompatibilidad entre tejidos tisulares y nanomateriales que tienen como origen el carbono, por lo cual puede ser empleado dentro de la reparación tisular (Rodríguez, 2016).
- Además se ha visto su utilización como portador de genes al unir complejos de polietilenimina con plásmidos de ADN que tienen una alta toxicidad junto con GO, ya que la polietilenimina actúa como modificador de superficie de GO, uniéndose por medio de enlaces covalentes e interacciones electrostáticas, de tal manera que se logra transportar de manera eficiente plásmidos de ADN sin presencia de toxicidad, además se ha determinado que el GO puede ser utilizado como vehículo en la administración de fármacos con solubilidad dependiente de Ph (Rodríguez, 2016).
- Dentro del tratamiento del cáncer el grafeno ha tomado mucha importancia ya que se ha visto la funcionalización del GO con seis brazos de polietilenglicol, que ha sido utilizado en terapias fototérmicas en combinación de terapia química, debido a que el GO posee una alta absorción del espectro infrarrojo cercano que es el responsable de provocar una inducción del estrés oxidativo, una activación de la caspasa y una despolarización mitocondrial que conducen a una apoptosis (Rodríguez, 2016).

1.3. Alternativas farmacoterapéuticas utilizando el Grafeno

Hasta la actualidad se han identificado varios tipos de nanomateriales con propiedades antibacterianas incluyendo la plata (Ag), óxido de titanio (TiO₂), óxido de hierro (Fe₃O₄), óxido de zinc (ZnO) y GO el cual los nanocompuestos en los que se utiliza este material han llamado mucho la atención debido a que se ha visto un control considerable sobre patógenos resistentes (Yousefi, 2017).

- Los suministros de medicamentos basados en grafeno se han planteado desde el 2008 gracias a que su estructura posee una sola capa, el GO tiene un área de superficie muy alta, por lo tanto, tiene una alta eficiencia para transportar medicamentos. El uso de nanotubos de carbono como portadores de una variedad de fármacos para quimioterapia incluyendo doxorrubicina (DOX), camptotecina (CPT), SN38 (análogo de CPT), ácido elágico, b-lapachone y 1,3-bi (2-cloetil) –

1-nitrosourea (BCNU) fue un gran éxito combinado con GO con varias funcionalizaciones de superficie para el tratamiento de cáncer (Yousefi, 2017).

- El desarrollo de materiales a nanoescala ha mejorado desde la síntesis de una sola pieza a grupos de múltiples componentes donde dos o más nanomateriales pre - sintetizados se mezclan para una multifuncionalidad, conocidos como nanohíbridos (NH), compuestos por nanopartículas híbridas (HNP) que mezclan varios materiales en un solo nanosistema, lo que proporciona un nuevo y poderoso enfoque para el diseño de materiales que sirvan para la aplicación en la biomedicina como en el tratamiento y detección del cáncer (Yousefi, 2017).

1.3.1. Toxicidad del grafeno

La exposición humana a los nanomateriales se puede producir por medio de múltiples rutas, como ingestión, implantación, inhalación, absorción cutánea e inyección, siendo la vía principal de exposición al grafeno, la vía inhalatoria (Alves, 2018).

- Estudios evalúan la alta exposición ocupacional de trabajadores de la industria del grafeno, donde sugieren que podrían existir partículas aerotransportadas a las cuales están expuestos, en estudios *in vivo* con células pulmonares humanas evidenciaron potenciales efectos citotóxicos e inducción de apoptosis y autofagia. En el estudio *in vitro* con distintas líneas celulares animales, se propone la potencial acumulación de partículas de grafeno en células pulmonares después de un tiempo considerable de exposición, provocando reacciones inflamatorias subcrónicas o agudas (Mao, 2015).
- En otros estudios en los que al someter GO por vía oral a animales de experimentación, un grupo no presentaba ninguna alteración de creatinina sérica y nitrógeno ureico (BUN) con disminución de peso y talla, otro grupo en cambio presentó aumento de BUN, creatinina sérica y transformaciones histomorfológicas representativas en los riñones (Patlolla, 2016).

1.4. Nanopartículas derivadas del Grafeno

1.4.1. Óxido de Grafeno

Es también conocido como óxido de grafito o ácido grafitico, es el producto de la oxidación del grafito y tal como su antecesor está formado por capas de grafeno. Posee una estructura semiplana bidimensional de hojas de grafeno con distintos grupos funcionales oxigenados que se encuentran

enlazados por medio de enlaces de tipo covalentes mediante los átomos de oxígeno a la estructura de carbono debajo y sobre el plano basal y la superficie de las hojas, con un espesor aproximado de 1 nm y dimensiones laterales que van desde nanómetros hasta algunas micras (Guerrero, 2015).

1.4.1.1. Síntesis del Óxido de Grafeno

La primera elaboración de GO se dio en 1855 a manos de Benjamín Brode, que mezclando clorato de potasio (KClO_3) con una suspensión de grafito con ácido nítrico (HNO_3) observó cristales de grafito modificado, oxígeno, hidrógeno, compuestos de carbono, además determinó que el compuesto era dispersable en agua. En la década de los años 50, Hummers, desarrolló un proceso alternativo para generar óxido de grafeno, para esto mezcló nitrato de sodio (NaNO_3), permanganato de potasio (KMnO_4) y ácido sulfúrico (H_2SO_4) para oxidar el grafito, en este método se determinó que el exceso de iones de permanganato y sulfato pueden llegar a ser contaminantes por lo que su remoción se realiza al final de la síntesis con una solución de peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y una serie de lavados con una mezcla de ácido clorhídrico (HCl) y agua (Guerrero, 2015).

Posterior a los estudios mencionados otros científicos desarrollaron más métodos alternativos de la obtención de este material, pero no se llegó a tener un solo método en específico ya que, la composición molecular final del GO depende especialmente de la fuente de grafito y al protocolo que se utilice para lograr su oxidación (Guerrero, 2015).

1.4.1.2. Propiedades del Óxido de Grafeno

En el ámbito científico el GO obtenido por medios químicos se ha vuelto muy popular por ser considerado el precursor que podría llevar a la producción de grafeno a gran escala, además que se tiene un interés por el GO ya que puede ser utilizado como plataforma para la producción de materiales como grafeno funcionalizado y decorado con nanopartículas (Guerrero, 2015).

Varios estudios reportan:

- Amplificación de quimio – luminiscencia electrogenerada en grafeno decorado con puntos cuánticos de CdTe utilizado como sensor selectivo de antioxidantes,

- Incorporación del grafeno como compósito junto con nanopartículas de platino ayuda con la cinética de transferencia de electrones y con la reactividad electroquímica,
- Hojas de grafeno como membrana de baterías de ion litio mejora la capacidad de almacenamiento en sus celdas,
- Las propiedades semiconductoras del grafeno con ligeras modificaciones en los bordes son útiles para ser utilizados como nanotransmisor,
- Las terminaciones de las hojas de GO tienen influencia en las densidades de estado de energía,
- La conductividad eléctrica del GO reducido es más alta que la del GO gracias a la restauración de enlaces π conjugados (Guerrero, 2015).

1.4.2. Nanohíbrido de Óxido de Grafeno con Nanopartículas de Plata

El GO es un material apropiado para dispersar y estabilizar la plata ya que se combina con una gran superficie específica con abundantes grupos funcionales oxigenados, además produce dispersiones estables en agua ya que son portadoras de oxígeno. Los grupos funcionales actúa como sitios de anclaje para la unión de las nanopartículas metálicas y las láminas de GO actúan como soporte para el crecimiento y estabilización de nanopartículas de plata (AgNP's) (Cobos, 2020).

1.4.2.1. Síntesis del Nanohíbrido de Óxido de Grafeno con Plata

Para obtener el GO - Ag se necesita primero sintetizar el GO para que se lo pueda dispersar en trifenilfosfina (PPh₃) seguido de sonicación por una hora aproximadamente, después la mezcla se calienta por reflujo con agitación vigorosa durante 24 horas a 200° C, además se realiza una solución de nitrato de plata (AgNO₃) y PPh₃, la cual se agregó a la mezcla anterior con continua agitación en un sistema de reflujo hasta obtener un color negro-verde que indica la formación de partículas de Ag. El producto final se centrifuga y se lava diez veces con etanol, finalmente el GO-Ag se secó a vacío por 24 horas a 80° C (Bouchareb. et al, 2020).

1.4.2.2. Propiedades y aplicaciones del Nanohíbrido de Óxido de Grafeno con Plata

Se ha demostrado que estas nanoestructuras, GO y AgNP's trabajan sinérgicamente para mejorar sus propiedades, tales como mayor actividad antimicrobiana, catalítica y conductividad eléctrica. Las propiedades sinérgicas de este material híbrido han demostrado ser útiles en una variedad de

aplicaciones como en la electrónica, la catálisis, en biosensores electroquímicos, en administración de fármacos y agentes microbianos (Cobos, 2020).

Tanto el GO como las AgNP se han combinado con matrices poliméricas para desarrollar materiales utilizados como agentes antimicrobianos: los polímeros nanofibrosos que contienen agentes antimicrobianos se han fabricado por medio de electrohilado para su aplicación en diversos campos (Cobos, 2020).

1.4.3. Copos de Pocas Capas de Grafeno

1.4.3.1. Síntesis de Copos de Pocas Capas de Grafeno

El proceso de síntesis de los CPCG siguen rutas químicas, procesos en solución como la exfoliación en fase líquida, donde la distancia entre capas de grafito incrementa a la vez que se reduce su interacción para que se pueda dar la separación de la láminas de grafeno, este método permite el depósito de láminas sobre cualquier tipo de sustrato, los investigadores esperan con el tiempo perfeccionar el control de número de capas y la transferencia a otros sustratos para implementar la producción de este material a gran escala (Álvarez, 2017).

1.4.4. Nanopartículas de Plata

La capacidad microbicida de la plata es conocida desde hace mucho tiempo lo que lo hace un material muy atractivo para la creación de nanopartículas enfocados en el tratamiento de diversas enfermedades causadas por bacterias o virus, además se consideran sus propiedades ópticas y eléctricas para que puedan ser utilizados como biosensores, sistemas de detección molecular y medios de contraste para imágenes médicas, por tal motivo se han producido varias investigaciones acerca de los métodos para sintetizar nanopartículas de plata por varios métodos tanto orgánicos como químicos y físicos (Calle, 2014).

1.4.4.1. Síntesis de Nanopartículas de Plata

Las nanopartículas metálicas pueden ser sintetizadas por medio de una gran variedad de técnicas, sin embargo la reducción química ha sido de los métodos más utilizados, el cual se basa en la utilización del nitrato de plata (AgNO_3) como material de partida y borohidruro de sodio (NaBH_4) que actúa

como agente reductor, esta mezcla permite obtener dispersiones coloidales de plata transparente de color amarilla y estable. El exceso de NaBH_4 es necesario para que se pueda dar la reducción de los iones Ag^+ y así estabilizar las NPs de plata que se obtienen (Camacho, 2013).

Por medio de ésta técnica se obtienen partículas con diámetros de aproximadamente 12 nm y con una absorbancia aproximada de 400 nm. La absorción de NaBH_4 juega un papel importante como estabilizador durante la formación de las AgNP's suministrando una carga superficial al material. La cantidad del agente reductor debe ser suficiente para que las partículas se estabilicen cuando se dé la reacción, pero no en concentraciones muy altas para que no se dé un aumento de la fuerza iónica total de la solución y hacer que se produzca la agregación de las partículas (Camacho, 2013).

1.4.4.2. Propiedades y aplicaciones de Nanopartículas de Plata

Las AgNP's tienen una gran capacidad microbicida que ha sido evaluada en una amplia variedad de microorganismos, tanto virus como bacterias, ya que su aplicación tiene una baja posibilidad de que desarrolle algún tipo de resistencia por parte de los microorganismos en comparación a los antibióticos, por lo que se ha propuesto la implementación del uso de éstas nanopartículas en diferentes dispositivos del área médica como catéteres, cremas tópicas, vendas, válvulas, entre otros (Flores, 2014).

Una propiedad preocupante de estas partículas es la toxicidad que estas pueden tener, por sus propiedades microbicidas y su tamaño pueden ser capaces de generar daños en el medio ambiente gracias a su acumulación; en estudios realizados sobre células eucariotas como fibroblastos y células hepáticas humanas, se determinó que las AgNP's son tóxicas ya que producen daños en la respiración celular y ciclos de división celular (Flores, 2014).

1.5. Actividad Antimicrobiana

1.5.1. Actividad antimicrobiana del Grafeno

1.5.1.1. Mecanismo de acción Del Grafeno

Se han propuesto tres tipos de mecanismos de acción para la actividad antimicrobiana del grafeno:

- El estrés de membrana, las nanohojas del grafeno son por lo general las que provocan el daño físico de la membrana bacteriana. La estructura bidimensional de los enlaces covalentes sp^2 de las moléculas de grafeno desempeñan un importante papel en hacer que se produzca una interacción entre el grafeno y los lípidos de membrana. Una mayor concentración y un mayor tamaño lateral del grafeno deberían aumentar el nivel de destrucción de la membrana bacteriana (Hossain. et al, 2019).
- Estrés oxidativo, el grafeno es capaz de generar especies reactivas de oxígeno (ROS) que resultan perjudiciales para proteínas y lípidos de bacterias y una vez que han sufrido daño ya no pueden ser proliferados, este el principal mecanismo para detectar la toxicidad del grafeno (Hossain. et al, 2019).
- La transferencia de electrones de la superficie del grafeno a la membrana microbiana podría desempeñar un papel vital dentro de los agentes antimicrobianos pero no está totalmente claro ya que en un estudio al utilizar este método con cobre y oro como sustratos no fue compatible (Hossain. et al, 2019).

1.5.2. Actividad antimicrobiana de AgNP's

1.5.2.1. Mecanismo de acción de AgNP's

Varios estudios mencionan que las AgNP's son capaces de adherirse a la membrana celular de las bacterias, alterando la permeabilidad celular y funciones respiratorias de la célula, además es posible que las nanopartículas actúen en el interior del microorganismo. El efecto bactericida de las AgNP's puede ser un sinergismo entre las nanopartículas y un agente estabilizante (Lauril sulfato de sodio/Tween 80) de los siguientes mecanismos:

- Las nanopartículas y el agente estabilizante desestabilizan la membrana de la bacteria, por lo tanto alteran su permeabilidad produciendo un daño irreversible,
- Las nanopartículas ingresan y se internalizan en la bacteria por su diminuto tamaño,
- Las nanopartículas en su trayecto liberan iones de Ag que actúan como reservorio del agente antibacteriano alterando el líquido citoplasmático,
- Los iones Ag se unen a grupos sulfhidrilos de biomoléculas de la bacteria y a compuestos fosforosulfurados como el ADN provocando una inactivación del microorganismo; estos mecanismos se puedan dar de manera simultánea (Leyva, 2013).

1.6. Resistencia Bacteriana

Se define como la capacidad de una bacteria para sobrevivir en concentraciones de antibiótico que matan o inhiben a otras de la misma especie, el uso excesivo e inapropiado de antibióticos en humanos es bastante frecuente, por lo que se convierte en un factor que contribuye a este problema que con el tiempo su prevalencia no solo ha aumentado en bacterias causantes de infecciones sino también sobre las comensales (Alós, 2015).

1.6.1. Tipos de resistencia bacteriana

- Resistencia natural, es una representación constante de cepas bacterianas de una misma especie y es un mecanismo permanente, que se encuentra determinado genéticamente y sin correlación con la dosis de antibiótico que se administre (Pérez, 2013).
- Resistencia adquirida, este tipo de resistencia es propia de una especie bacteriana, que por naturaleza es sensible a un antibiótico por medio de una modificación genética ya sea por adquisición de genes de resistencia o por una mutación (Pérez, 2013).

1.6.2. Mecanismos de resistencia bacteriana

- Bombas de eflujo, transporta el antibiótico hacia el exterior de la célula sin realizarle modificaciones, pero sin acción antibacteriana, esto ocurre ya que la célula posee bombas de expulsión que dependen de energía, y pueden comportarse como sistemas de eliminación de uno o más antibióticos (Calderón, 2016).
- Modificación o inactivación del antibiótico por medio de enzimas hidrolíticas, es considerado el mecanismo más común por el que las bacterias crean resistencia y se basa en una producción excesiva de enzimas capaces de hidrolizar al antibiótico como son las betalactamasas (Calderón, 2016).
- Bloqueo de la penetración del antibiótico por medio de la modificación del sitio activo, esto se traduce en una pérdida de afinidad y por lo tanto le impide ejercer su acción (Calderón, 2016).
- Disminución o alteración de la permeabilidad de la membrana celular bacteriana, se producen cambios en el número de porinas y/o diámetro que permita bloquear el ingreso del antibiótico, de esta manera el fármaco no puede ingresar a la superficie bacteriana y así alcanzar el núcleo celular, el tipo más frecuente de resistencia propia de la bacteria (Calderón, 2016).

- Biopelículas, las bacterias que son capaces de formar biopelículas están protegidas de la luz ultravioleta, los mecanismos de defensa del organismo, la acción de los antibióticos, la deshidratación y demás amenazas ambientales (Calderón, 2016).

1.7. Bacterias

Las bacterias son microorganismos unicelulares procariotas que se reproducen por medio de fisión binaria, poseen los mecanismos capaces de producir energía y también el material genético ideales para su desarrollo y crecimiento; su tamaño oscila entre las 0,5 y 3 μm , siendo así visibles solamente por medio de un microscopio electrónico o un microscopio óptico por los cuales se observará su morfología la que está determinada por la rigidez de su pared celular, se diferencian de acuerdo con su forma en cocos, bacilos y espirilos (Pírez & Mota, 2006).

1.7.1. *Staphylococcus aureus*

Los estafilococos son un vasto grupo de bacterias Gram – positivas, cuyo diámetro varía entre 0.5 y 1.5 μm ; se han detectado 35 especies con 17 subespecies en el género *Staphylococcus*, este género tiene una capacidad de adaptación increíble lo que hace posible que afecte a todas las especies de mamíferos. *S. aureus* tiene un amplio grado de diseminación ya que se la puede encontrar en la flora comensal del cuerpo humano, especialmente en las fosas nasales, es además una bacteria oportunista capaz de colonizar objetos que están comúnmente en contacto con el ser humano, además de estar en los alimentos que se consumen ocasionalmente provocando graves daños en la salud del huésped (Zendejas, Ávalos, Soto, 2014).

1.7.1.1. Clasificación taxonómica del *S. aureus*

Tabla 1-1 Clasificación Taxonómica de *Staphylococcus aureus*

CATEGORÍA TAXONÓMICA	
Dominio	Bacteria
Reino	Prokaryotae
Phyllum	Firmicutes
Clase	Bacili
Orden	Bacillales
Familia	Micrococcaceae
Género	<i>Stephylococcus</i>

Especie	<i>aureus</i>
---------	---------------

Fuente: Gil, 2000

Realizado: Morales, Pamela, 2021

1.7.1.2. Patogenicidad del *S. aureus*

S. aureus se ha convertido en la principal causa de infecciones que atacan al torrente sanguíneo e intoxicaciones causadas por alimentos. Su patogenicidad se relaciona con los diversos componentes que posee su superficie bacteriana, por lo que la patogenia que provoca este microorganismo surge cuando se produce una mezcla de los factores de virulencia junto con la disminución de las defensas del huésped, además la patogenicidad aumenta ya que el patógeno con el tiempo ha ido desarrollando múltiples mecanismos de resistencia contra antibióticos, haciendo que cada vez su tratamiento y su curación sea más difícil (Zendejas, Ávalos, Soto, 2014).

Varios autores señalan que la patogenicidad de *S. aureus* se basa en 3 factores: 1) el factor que regula la adhesión de la bacteria a la célula del huésped; 2) el factor que promueve el daño y la diseminación tisular y 3) los factores que defienden a la bacteria del sistema inmune de huésped; cabe destacar que una de las toxinas que generalmente está implicada en los brotes de intoxicación alimentaria es la enterotoxina A, debido a que es muy potente y en concentraciones muy pequeñas como 100 ng es capaz de provocar síntomas de intoxicación ya que los monocitos y las plaquetas de los seres humanos presentan una gran susceptibilidad a dicha toxina; la toxina asociada al síndrome del choque tóxico (TSST - 1) es otra toxina que acarrea varias complicaciones médicas, incluso la muerte, este síndrome tiene la característica de producir una respuesta inflamatoria exagerada semejante a la que se produce en la sepsis bacteriana; la exotoxina proteína dermatropa también tiene efectos sobre el cuerpo humano ya que por medio de una lesión local se difunde en el torrente sanguíneo hasta llegar a la piel provocando una exfoliación que se extiende (Zendejas, Ávalos, Soto, 2014).

1.7.1.3. Resistencia bacteriana del *S. aureus*

- Resistencia a β – lactámicos: *S. aureus* es capaz de producir penicilinasas, parte de esta enzima se excreta al medio externo y la otra parte permanece adherida a la membrana celular, inactivando ciertos antibióticos β – lactámicos, así a través de la hidrólisis del anillo β – lactámico, estas atacan a ampicilinas, penicilina G, ureidopenicilinas y carboxipenicilinas; también tienen resistencia frente a oxacilina o meticilina, que se basa en la producción de una proteína fijadora de penicilina, PBP, conocida como PBP2a, que no está presente en las cepas

sensibles, se encarga de la síntesis de la pared cuando otras PBP se encuentran inactivas (Seija, 2006).

- Resistencia a macrólidos: Se da por una modificación del rARN blanco provocada por enzimas inducibles que son capaces de metilar un residuo específico del rARN, esto produce una disminución en la unión a eritromicina, a otros macrólidos y lincosaminas; también se produce por medio de una resistencia inducible a macrólidos, se refiere a un gen localizado en el plásmido que es capaz de codificar una bomba de eflujo ATP – dependiente (Seija, 2006).
- Resistencia a aminoglucósidos: Este tipo de mecanismo se puede dar gracias a tres tipos de eventos: el primero, una mutación cromosómica capaz de codificar una alteración del sitio de acción en el ribosoma, el segundo, se puede dar un transporte inefectivo y, el tercero, el mecanismo más común, la producción de enzimas modificadoras (Seija, 2006).
- Resistencia a quinolonas: Se debe a una baja actividad de la girasa, que es mediada por mutaciones puntuales que se localizan en el gen *gyrA* cromosómico, que es el gen estructural de la subunidad A de la ADN girasa (Seija, 2006).

1.7.2. *Escherichia coli*

Es un bacilo Gram negativo, anaerobio de tipo facultativo, este microorganismo es capaz de colonizar el intestino del ser humano después de su nacimiento y es considerado un microorganismo de la microbiota natural, pero existen cepas que pueden llegar a ser patógenas para el organismo causándole diferentes cuadros clínicos, entre ellos la diarrea (Rodríguez, 2002).

1.7.2.1. Clasificación taxonómica de la *E. coli*

Tabla 2-1 Clasificación Taxonómica de *Escherichia coli*

CATEGORÍA TAXONÓMICA	
Dominio	Bacteria
Reino	Prokaryotae
Phyllum	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Enterobacteriales
Familia	Enterobacteriaceae
Género	<i>Escherichia</i>
Especie	<i>coli</i>

Fuente: Canet, 2016

1.7.2.2. *Patogenicidad de la E. coli*

De su patogenicidad se encargan ciertos antígenos superficiales y toxinas propios del microorganismo, así las fimbrias actúan aportando la capacidad de adherirse, los antígenos K y O son capaces de antifagocitar e inhibir las sustancias bactericidas del suero siendo los responsables de la virulencia de las cepas bacterianas. Poseen una endotoxina unida al lipopolisacárido que es responsable de la acción pirógena y es probable que de las alteraciones vasculares que se dan en las infecciones: algunas cepas son capaces de producir exotoxinas causantes de la producción de diarrea cuya síntesis está codificada por la presencia de plásmidos, además pueden poseer genes asociados que tienen la capacidad de adherencia y otras propiedades como producción de hemolisinas, colicinas y resistencia a ciertos antibióticos (Canet, 2016).

1.7.2.3. *Resistencia bacteriana de la E. coli*

- Resistencia a β – lactámicos: El principal mecanismo de resistencia se debe a la presencia de las β – lactamasas que son capaces de hidrolizar el enlace amida del núcleo β – lactámico provocando una inactivación del antibiótico (Mosquito, 2011).
- Resistencia a Quinolonas: Uno de los mecanismos se da por mutaciones específicas que generan el cambio de aminoácidos en la enzima diana del antibiótico, existe cambio en el codón 83 y se codifica otro aminoácido de tal manera que se modifica la enzima diana logrando una alta resistencia frente a quinolonas. Otro tipo de mecanismo de resistencia está relacionado con la transferencia de genes por medio de plásmidos como por ejemplo los genes Qnr que son los que codifican al grupo de las proteínas Qnr que se unen a la ADN girasa y a la topoisomerasa IV disminuyendo la acción del fármaco (Mosquito, 2011).
- Resistencia al cloranfenicol: El mecanismo más frecuente es de la inactivación enzimática por acetilación por medio de los tipos de cloranfenicol acetiltransferasas existentes, además esta resistencia puede estar regulada por sistemas de exportadores específicos para cloranfenicol y florfenicol que se relacionan con genes como floR y cmlA (Mosquito, 2011).

1.7.3. *Pseudomonas aeruginosa*

Es un microorganismo patógeno oportunista y bastante persistente en el ecosistema que puede llegar a estar presente en el suelo y en el agua tolerando varios medios físicos y con un requerimiento

mínimo nutricional, tiene forma de bastón que mide 0,5 – 1 µm de diámetro aproximadamente. Es una bacteria no fermentadora lo que hace que no pueda fermentar lactosa y obtiene energía por medio de la oxidación de azúcares utilizando fuentes de carbono y nitrógeno; también es capaz de producir ciertas proteasas y elastasas que tienen la capacidad de degradar proteínas de tipo inmunoreguladoras (Paz, Mangwani, et al, 2019).

1.7.3.1. Clasificación taxonómica de la *P. aeruginosa*

Tabla 3-1 Clasificación Taxonómica de *Pseudomonas aeruginosa*

CATEGORÍA TAXONÓMICA	
Dominio	Bacteria
Reino	Prokaryotae
Phyllum	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Pseudomonadales
Familia	Pseudomonadaceae
Género	<i>Pseudomonas</i>
Especie	<i>aeruginosa</i>

Fuente: Paz, Mangwani, et al, 2019

Realizado: Morales, Pamela, 2021

1.7.3.2. Patogenicidad de la *P. aeruginosa*

A este microorganismo se lo considera la quinta causa más frecuente en las infecciones, generalmente ataca a pacientes inmunocomprometidos como por ejemplo en pacientes con fibrosis quística o pacientes quemados. *P. aeruginosa* posee una gran variedad de factores de patogenicidad por lo que tiene alta capacidad de causar un amplio margen de infecciones (Paz, Mangwani, et al, 2019).

El flagelo de *P. aeruginosa* posee una proteína flagelar *FliD*, que hace que la bacteria sea capaz de adherirse en la mucosa de las vías respiratorias, también poseen la proteína flagelar *FliC* que es el factor principal de desencadenar la secreción de péptidos antimicrobianos por parte del sistema inmune (NET's) y de liberar trampas extracelulares mediadas por neutrófilos. Ésta bacteria posee también un pili de tipo IV que la hace capaz de adherirse y tener un tipo de movilidad diferente conocido como “*swarming*”, este pili posee proteínas PilU, PilT, PilA, y PilB, además si se llega a unir con dos lectinas solubles, LecB y LecA son partícipes de la adhesión hacia las células del huésped, provocando daño y diseminación del patógeno (Paz, Mangwani, et al, 2019).

La bacteria tiene la capacidad de producir una cápsula extracelular compuesta de alginato que forma parte de una biopelícula fabricada por la bacteria actuando como mecanismo de evasión para los anticuerpos y la fagocitosis de las células inmunológicas. La bacteria secreta dos tipos de biopelículas, la plana se caracteriza por poseer una confluencia uniforme de bacterias en la superficie y la estructurada radica en agregados celulares sumidos en la matriz de la biopelícula que están separados por espacios o canales (Paz, Mangwani, et al, 2019).

1.7.3.3. Resistencia bacteriana de la P. aeruginosa

P. aeruginosa posee varios mecanismos de resistencia frente a antibióticos, incluyendo enzimas capaces de modificar β – lactamasas, aminoglucósidos, adquisición de plásmidos que codifican genes de resistencia, permeabilidad limitada y la posibilidad de crear una bomba dependiente de energía que es capaz de expulsar al antibiótico fuera de la bacteria. La bacteria posee bombas que participan de manera activa en la resistencia antimicrobiana frente a diversas familias de antimicrobianos: MexEF-OprN y MexCD-OprJ frente a fluoroquinolonas; MexAB-OprM, MexEF-OprN y MexCD-OprJ frente a β – lactámicos y MexXY/OprM frente a aminoglucósidos (Paz, Mangwani, et al, 2019).

Además se han identificados mutaciones genéticas en cromosomas que le otorgan resistencia frente a monobactámicos, cefalosporinas y penicilinas, los genes involucrados en dichas mutaciones son aquellos capaces de sintetizar péptidoglucano como ampD, ampR y dacB (Paz, Mangwani, et al, 2019).

1.7.4. Klebsiella pneumoniae.

El microorganismo perteneciente al género *Klebsiella* son bacilos Gram negativos inmóviles que son parte de la familia *Enterobacteriaceae*; este género está conformado por varias especies, la de mayor interés clínico y la más estudiada es *K. pneumoniae*. La capa más externa de éste tipo de bacterias está formada por una cápsula de polisacáridos que la diferencia de otros géneros de bacterias (López, 2009).

1.7.4.1. Clasificación taxonómica de la *K. pneumoniae*

Tabla 4-1 Clasificación Taxonómica de *Klebsiella pneumoniae*

CATEGORÍA TAXONÓMICA	
Dominio	Bacteria
Reino	Prokaryotae
Phyllum	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Enterobacterales
Familia	Enterobacteriaceae
Género	<i>Klebsiella</i>
Especie	<i>pneumoniae</i>

Fuente: López, 2009

Realizado: Morales, Pamela, 2021

1.7.4.2. Patogenicidad de la *K. pneumoniae*

Las bacterias de este género generalmente desarrollan una cápsula que actúa como factor principal en su virulencia y de acuerdo con los determinantes antigénicos se los puede clasificar en 77 serotipos diferentes, esta cápsula la protege de la fagocitosis causada por polimorfonucleares y por factores bactericidas séricos de forma que inhibe la activación del complemento en especial del C3b (López, 2009).

La etapa inicial del proceso infeccioso es la adherencia del patógeno a las células del huésped función que se encargan de desarrollarla unas proyecciones filamentosas que se encuentran en la superficie de la bacteria llamados *pilis*, de tipo 1 y de tipo 3; el de tipo 1 se asocia a la patogénesis de las infecciones del tracto urinario y del tracto respiratorio; el de tipo 3 participa en la adherencia al epitelio del tracto urinario y respiratorio, además a las células endoteliales (López, 2009).

1.7.4.3. Resistencia bacteriana de la *K. pneumoniae*

Generalmente es resistente a la ampicilina gracias a la presencia de la β - lactamasa SHV-1 que es codificada en el cromosoma de la bacteria. Las modificaciones de las enzimas SHV-1 y TEM-1 y después la aparición de una nueva familia de β – lactamasas de espectro extendido (BLEE), que por su inclinación a hidrolizar el cefotaxime fue nombrada CTX-M, ocasionaron la aparición de numerosos tipos de BLEE (López, 2009).

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Lugar de la investigación

La obtención de las nanopartículas se lo realizó en el Laboratorio de Investigación de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH).

Los estudios bactericidas de las nanopartículas sobre las diferentes cepas bacterianas fueron realizados en el laboratorio de Microbiología.

2.2. Materiales, equipos y reactivos

2.2.1. *Nanopartículas*

Las nanopartículas con las que se trabajaron fueron GO, CPCG y GO - Ag, las cuales fueron obtenidas a partir de procesos químicos, con el fin de ser utilizadas como sustrato en la determinación de la actividad bactericida de las mismas.

2.2.2. *Material microbiológico*

El material microbiológico utilizado fueron cepas de bacterias Gram positivas tales como: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y cepas de bacterias Gram negativas así como: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 otorgadas por el laboratorio de Análisis Clínicos de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Facultad de Ciencias perteneciente a Escuela Superior Politécnica de Chimborazo., con el fin de ser indicadoras en la evaluación de la actividad antimicrobiana.

2.2.3. Materiales de laboratorio utilizados

Tabla 1-2 Descripción de los materiales de laboratorio utilizados

ANÁLISIS	MATERIALES
<p align="center">SÍNTESIS DE ÓXIDO DE GRAFENO</p>	<p>Varilla de agitación Balón esmerilado de tres picos 500 mL Bureta 25 mL Vaso de precipitación 100 mL Vaso de precipitación 250 mL Vaso de precipitación 600 mL Espátula Erlenmeyer 1000 mL Pipeta 5 mL Embudo Büchner Papel filtro Botellas de vidrio 500 mL Botellas de vidrio 250 mL Tubos falcon 50 mL</p>
<p align="center">SÍNTESIS DE COPOS DE POCAS CAPAS DE GRAFENO</p>	<p>Vaso de precipitación 100 mL Vaso de precipitación 250 mL Espátula Pipeta 5 mL Tubos falcon 50 mL</p>
<p align="center">SÍNTESIS CPCG CON NONIL FENOL 9 M</p>	<p>Vaso de precipitación 100 mL Balón aforado 10 mL Balón aforado 50 mL Probeta 100 mL Piseta</p>
<p align="center">SÍNTESIS DE NANOHÍBRIDO DE ÓXIDO DE GRAFENO CON PLATA</p>	<p>Vaso de precipitación 100 mL Erlenmeyer 250 mL Vidrio reloj Espátula Vaso de precipitación 600 mL Botella de vidrio ámbar 500 mL</p>
<p align="center">DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA</p>	<p>Erlenmeyer 500 mL Probeta 100 mL Tubos de ensayo Puntas amarillas estériles Puntas azules estériles Pipetas de 1 mL Lámpara de alcohol</p>

	Pera Gradilla Papel aluminio Gasas Rotulador Cajas Petri de vidrio Papel Parafilm Asa de platino
--	---

Realizado por: Morales, Pamela, 2021

2.2.4. Equipos

Tabla 2-2 Equipos utilizados en la investigación

ANÁLISIS	EQUIPOS
SÍNTESIS DE ÓXIDO DE GRAFENO	Sonicador Branson 3510 Agitador magnético Thermo Scientific Termómetro Estufa Memmert SNB400 Balanza RADWAG Espectrofotómetro UV-VIS S2150UV Espectrofotómetro IR FT/IR-4100 JASCO Macrocentrífuga Bomba de vacío pHmetro Jenway
SÍNTESIS DE COPOS DE POCAS CAPAS DE GRAFENO	Microscopio de Barrio Electrónico (SEM) Sonicador Branson 3510 Macrocentrífuga
SÍNTESIS CPCG CON NONIL FENOL 9 M	Sonicador Branson 3510 pHmetro Jenway Rotavapor
SÍNTESIS DE NANOHÍBRIDO DE ÓXIDO GRAFENO CON PLATA	Espectrofotómetro UV-VIS S2150UV Espectrofotómetro IR FT/IR-4100 JASCO Sonicador Branson 3510 Agitador magnético Thermo Scientific Balanza RADWAG Macrocentrífuga Microscopio de Barrio Electrónico (SEM)
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA	Estufa MEMMERT Cámara de flujo laminar STREAMLINE Autoclave

	Balanza RADWAG Pipeta automática de 100 µL Pipeta automática de 0.10 – 1000 mL Refrigerador
--	--

Realizado por: Morales, Pamela, 2021

2.2.5. Reactivos

Tabla 3-2 Descripción de los reactivos utilizados

ANÁLISIS	REACTIVOS
SÍNTESIS DE ÓXIDO DE GRAFENO	Permanganato de potasio Grafito Peróxido de hidrógeno al 30 % Ácido sulfúrico al 97 % Agua destilada Ácido clorhídrico 37 % Ácido cítrico
SÍNTESIS DE COPOS DE POCAS CAPAS DE GRAFENO	Grafito DMF
SÍNTESIS CPCG CON NONILFENOL 9 M	CPCG Nonilfenol 9 M
SÍNTESIS DE NANOHÍBRIDO DE ÓXIDO DE GRAFENO CON PLATA	Borohidruro de sodio Nitrato de plata Agua destilada Citrato de plata Óxido de grafeno
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA	Nanopartículas sintetizadas Agua destilada Alcohol potable N-N-Dimetilformamida (DMF)
	MEDIOS DE CULTIVO Caldo Luria Bertani (LB) Agar Müller Hinton Agar Triptona-Soja (TSA) Peptona

Realizado: Morales, Pamela, 2021

2.3. Técnicas y métodos

2.3.1. Síntesis de nanopartículas

2.3.1.1. Síntesis de Óxido de Grafeno

De acuerdo con lo reportado con Tene, Tubón, et al. (2020), se añadieron 3.0 g de grafito en polvo a 70 mL de ácido sulfúrico al 97 % en un baño de agua helada para controlar la reacción exotérmica que se produce, con agitación constante y moderada; seguidamente se adicionaron 9.0 g de permanganato de potasio controlando que la temperatura de la suspensión sea menor a 20° C durante 45 minutos.

La mezcla se transfirió a un baño de aceite a 50° C para mantener la solución por debajo de los 35 °C, la cual se agitó de manera vigorosa con la ayuda de un agitador magnético por 30 minutos aproximadamente. Se añadió a la mezcla 150 mL de agua destilada, causando una violenta efervescencia y una fuerte reacción exotérmica que elevó la temperatura hasta 100° C, a esta temperatura la solución fue agitada por 20 minutos aproximadamente, se agregaron 500 mL extras de agua destilada seguido de una adición de peróxido de hidrógeno al 30 % lentamente y se agitó para que se produzca el cambio de color de marrón oscuro a amarillento dado así por finalizado el procedimiento.

La suspensión de óxido de grafito se lavó con una solución de HCl en proporción 1:10 y agua destilada varias veces como proceso de exfoliación por el cual fueron eliminados los iones metálicos, cada una por 10 minutos a 3000 rpm hasta poder alcanzar un pH aproximadamente de valor de 6, se dejó secar el GO totalmente exfoliado en la estufa a 50° C por 24 horas para continuar con los procesos de caracterización.

2.3.1.2. Síntesis de Copos de Pocas Capas de Grafeno

Empleando el proceso realizado por Vacacela, Tene, et al (2019), en una concentración inicial 1:1 se mezcló grafito en polvo y el solvente DMF y se sometió al proceso de sonicación durante dos horas para romper los enlaces de ambas partes (soluto y solvente) para que se pueda dar una mezcla homogénea, posterior se realizó una centrifugación a 1000 rpm durante 10 min y se recuperó el sobrenadante.

2.3.1.3. Derivatización de Copos de Pocos Capas de Grafeno con Nonilfenol 9 M

Se realizó la derivatización de los CPCG contenido en DMF con destilación fraccionada a una temperatura de 75°C en un rotavapor Marca Buchi R – 300 a una solución de Nonil fenol 0,1 ppm. La soluciones se llevaron a un volumen de 50 mL, posteriormente se sonificaron por 2 horas.

2.3.1.4. Síntesis de Nanopartículas de Plata

En base a la síntesis empleada por Mavani y Shah (2013), se colocó 188 mL de solución 0.002 M de borohidruro de sodio en un erlemeyer de 250 mL en un baño de hielo y agua dejándolo enfriar por 20 minutos, transcurrido el tiempo se colocó el Erlenmeyer sobre un agitador magnético y se comenzó a agitar de manera rápida, luego se agregó gota a gota 63 mL de una solución de nitrato de plata 0,001 M, al terminar de agregar la solución inmediatamente se detuvo la agitación, por último se incorporó 250 mL de solución de citrato de sodio 1.5×10^{-3} M y se mezcló cuidadosamente.

2.3.1.5. Funcionalización del Nanohíbrido de Grafeno con Plata

De acuerdo con lo realizado por Sundos, et al (2020), la funcionalización de las AgNP's con el GO se realizó de la siguiente manera: 4 mL de la suspensión de GO a una concentración de 0.64 mg/mL se mezclaron por medio de agitación con un volumen igual de AgNP's a una concentración de 500 µg/mL en un agitador magnético por 15 minutos. La solución fue sonicada por 10 minutos y después es agitado nuevamente por 15 minutos, por último la mezcla se centrifuga a 13 000 rpm por 15 minutos utilizando una microcentrífuga.

Para obtener las diferentes concentraciones del nanohíbrido solamente se cambió la concentración del GO y se obtuvieron 5 soluciones: 0.15 mg/mL; 0.34 mg/mL; 0.65 mg/mL; 1.25 mg/mL y 2.5 mg/mL.

2.3.2. Caracterización de las nanopartículas

2.3.2.1. Espectrofotometría UV – visible

Esta técnica de espectroscopía consiste en el paso de la radiación por la muestra de estudio, la cantidad de luz que se absorbe obedece la ley de Lambert – Beer, a partir de los espectros se puede determinar la transparencia de un material a un rango determinado.

Se realizaron mediciones en el espectro de absorción UV – visible del GO, los CPCG tanto en DFM como en nonilfenol y el GO - Ag, para poder comprobar la forma y el tamaño de las nanopartículas sintetizadas.

2.3.2.2. Caracterización de nanopartículas por FT – IR

La espectroscopía infrarroja se basa en el paso de la radiación IR por una muestra, una parte de la radiación absorbe la muestra, otra es transmitida por la muestra y otra parte es reflejada, como resultado de se obtiene un espectro donde se muestran los picos que corresponden a las absorciones producidas por las vibraciones de los enlaces atómicos en las moléculas que componen la muestra.

Se extrae una cantidad suficiente de muestra la cual es homogenizada bajo la lámpara infrarroja evitando que la muestra absorba humedad y así poder determinar los grupos funcionales correspondientes de cada muestra, por este medio se caracteriza el GO y verificar sus grupos funcionales.

2.3.2.3. Caracterización de nanopartículas sintetizadas por SEM

La suspensión del GO, de los CPCG en DFM y del GO – Ag fueron observadas por medio de la técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM, siglas en inglés: *Scanning Electron Microscope*). Para ello se dispuso la muestra en suspensión sobre placas de vidrio para ser secadas, posteriormente la muestra se dispuso en el microscopio utilizando el software miXroscopy™ y se realizó la observación.

2.3.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana de las nanopartículas sintetizadas

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana de las nanopartículas sintetizadas, fueron utilizados como microorganismos indicadores las cepas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*,

Pseudomonas aeruginosa y *Klebsiella pneumoniae*; el método que fue empleado para la determinación fue la concentración inhibitoria mínima (CIM) tanto por la técnica de dilución en caldo como por la técnica de difusión radial en agar (Malbrán, 2012).

Todos los estudios microbiológicos fueron realizados por duplicado en condiciones de esterilidad, bajo campana de flujo laminar y mechero, utilizando las normas asépticas microbiológicas específicas para aislamientos y recuentos en medios sólidos, manipulación instrumental y siembras en medios líquidos.

2.3.3.1. Cepas empleadas y su activación

Para este estudio se utilizaron cepas que comúnmente pueden ser parte de la microbiota natural del organismo humano y posteriormente pueden producir infecciones oportunistas: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*; estos agentes infecciosos se transmiten principalmente por contacto con personas están infectadas por ellos, así como por medio de objetos, alimentos, agua o animales, además estas especies se encuentran entre las causas más frecuentes de enfermedades infecciosas asociadas a la atención médica, también son especies problemáticas debido a la resistencia o multirresistencia a los antibióticos existentes en el mercado.

Las cepas bacterianas mencionadas anteriormente están conservadas en glicerol, a partir de este medio fueron inoculadas en caldo nutritivo para ser activadas y utilizadas en las posteriores determinaciones microbiológicas.

2.3.3.2. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) por dilución en caldo

La CIM es conocida como la menor concentración a la que determinado agente antibacteriano es capaz de inhibir el desarrollo *in vitro* de los microorganismos (bacterias). Para su determinación por medio de la técnica de dilución en caldo, se colocan concentraciones decrecientes del agente antibacteriano en una serie de tubos de ensayo con medio de cultivo en caldo que se inoculan con las bacterias que actúan como indicadores y se incuban en las condiciones de temperatura y tiempo óptimas para su crecimiento (López, Torres, 2006).

La determinación de la CIM de las nanopartículas sintetizadas sobre cepas bacterianas se realizó en el medio de cultivo caldo Luria Bertani (LB), preparado con 5 g/L NaCl, 5 g/L de extracto de levadura y 10 g/L de peptona de caseína. Se realizaron diluciones a diferentes concentraciones de nanopartículas sintetizadas, inoculando en cada sistema de dilución una cepa bacteriana, la incubación en todos los ensayos fue a 37° C durante 24 horas, posterior al tiempo de incubación se verificó el crecimiento de la cepa (presencia de turbidez). En cada ensayo se incubaron tubos de control de esterilidad y control de crecimiento.

A partir de los tubos donde no se observó turbiedad se pudo determinar la CIM y se efectuó un subcultivo en placas de Agar TSA, incubando a una temperatura de 37° C por 24 horas, para observar el desarrollo o no de colonias viables; el tubo subcultivado que obtenga la menor concentración de nanopartículas y no dé lugar al desarrollo de colonias, nos ayuda a determinar la Concentración Bactericida Mínima (CBM), el ensayo se resume en la Figura 1-2.

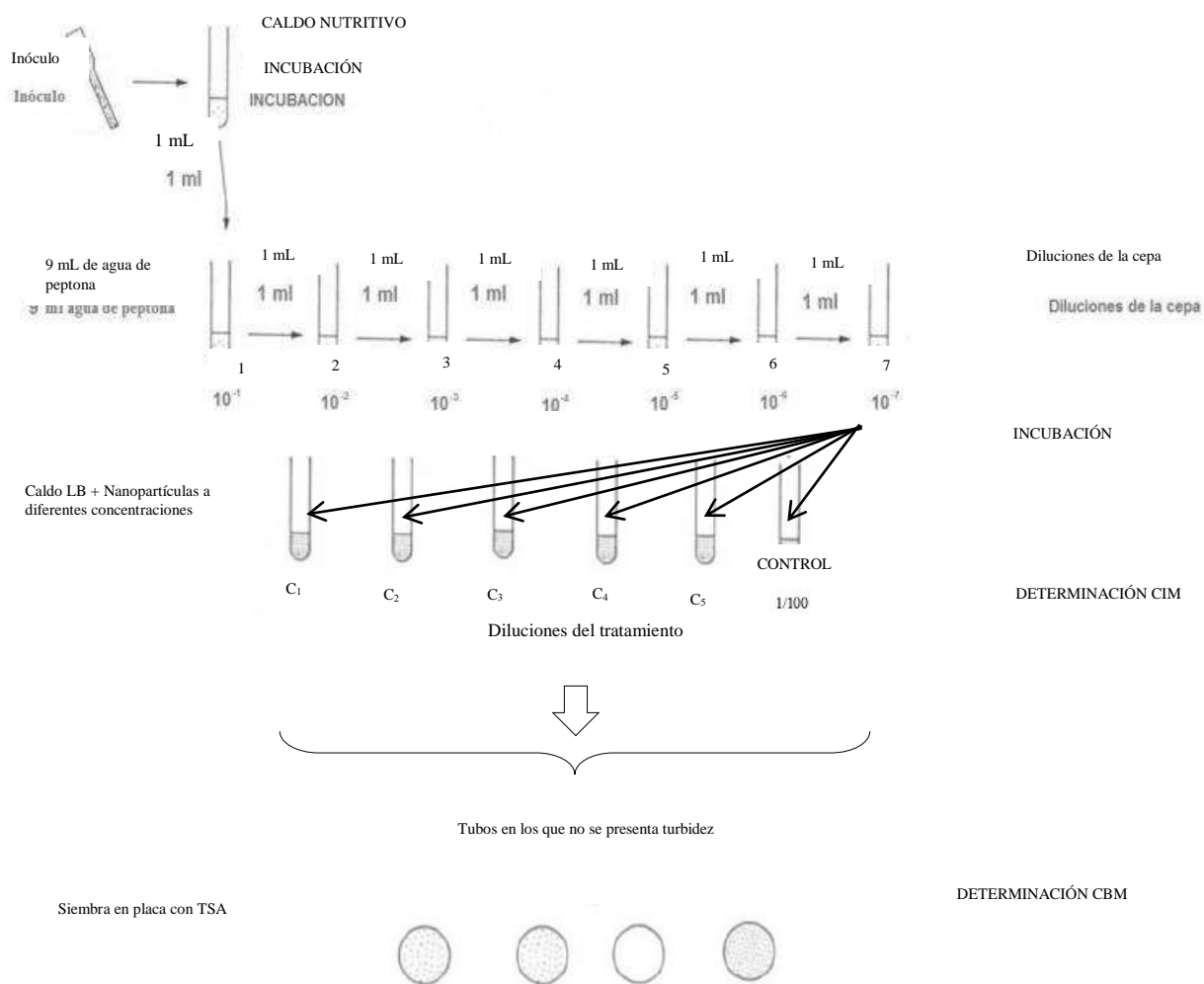


Figura 1-2 Representación gráfica de las pruebas realizadas para la determinación de CIM y CBM de cada nanopartícula a diferentes concentraciones, para cada cepa bacteriana y su control.

Realizado por: Morales, Pamela, 2020

2.3.3.3. Evaluación de la actividad inhibitoria mínima

La técnica de difusión en agar es una alternativa para la realizar la evaluación de la actividad inhibitoria de agentes antibacterianos, por medio de esta técnica se permite evaluar la eficacia de diferentes antibióticos a la vez.

Para la aplicación de esta técnica se utilizaron placas Petri de vidrio conteniendo medio Müller-Hinton, sobre el cual se sembraron 1 mL de las cepas indicadoras activadas y se distribuyeron con una espátula de Drigalski, posteriormente en las placas ya sembradas se realizaron siete pozos circulares dispuestos en forma de cruz, en cada orificio se sembraron 20 μ L de los controles, los controles fueron: GO, CPCG, CPCG con nonilfenol, GO - Ag a diferentes concentraciones, uno de los antibióticos más utilizados frente a cada bacteria y además se incorporó un control negativo utilizando agua destilada. Las placas fueron incubadas durante 24 – 48 horas a 37° C.

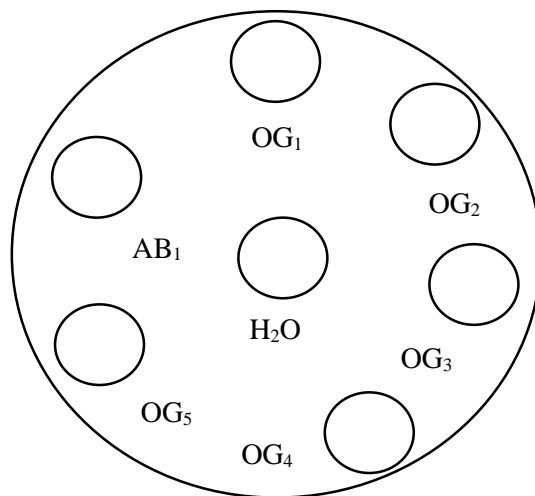


Figura 2-2 Esquema del tratamiento de difusión en agar para GO a las diferentes concentraciones a las que se encuentra la nanopartícula junto con el control negativo y el control positivo.

Realizado por: Morales, Pamela 2020

CAPÍTULO III

3. MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

3.1. Síntesis de nanopartículas

3.1.1. Síntesis de Óxido de Grafeno



Figura 1-3 Solución de óxido de grafeno



Figura 2-3 Óxido de Grafeno en estado seco

Realizado por: Morales, Pamela, 2020

Por medio del método de Hummers se obtuvo una solución en estado líquido de GO con un color café – negro como se puede observar en la figura 3.3, a una concentración de 0.574 mg/mL. Para las pruebas microbiológicas la solución fue diluida con agua destilada obteniendo muestras a 0.032 mg/mL; 0.062 mg/mL; 0.125 mg/mL; 0.250 mg/mL y 0.5 mg/mL.

El pH de la solución fue de 6.8, parámetro importante para poder inferir que la síntesis fue obtenida de manera adecuada y se obtuvieron las nanopartículas esperadas; la solución de GO fue sometida a

secado a 65° C por 24 horas, resultando así láminas del material con un color negro brillante como se observa en la figura 4.3, para tener una mejor conservación del material.

3.1.1.1. Espectro UV – vis de Óxido de Grafeno

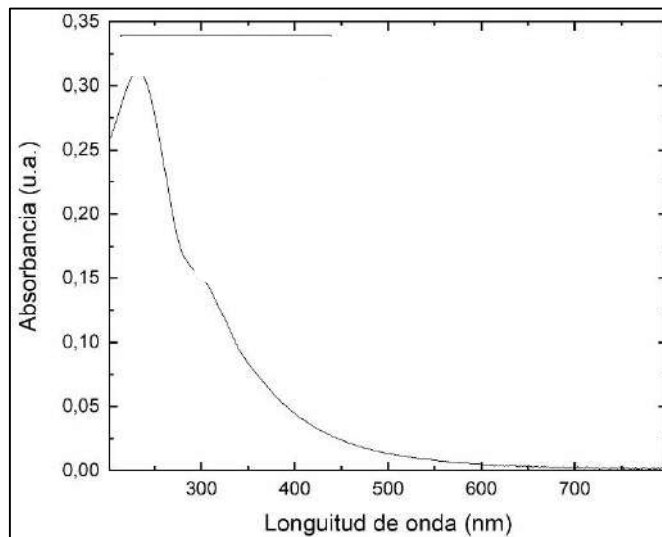


Gráfico 1-3 Espectro de absorción UV - Vis de óxido de grafeno

Realizado por: Morales, Pamela, 2020

El espectro del GO en forma de suspensión fue determinado a una longitud de onda de 200 a 750 nm, en el gráfico 1-3 se puede verificar que mostró un pico de absorción máxima a los 230 nm, este pico de absorción se le atribuye a la transición π - π de los enlaces aromáticos C=C, el cual es característico de esta nanopartícula, por lo que con esto se puede validar el proceso de síntesis del material, las gráficas coincidieron con los espectros del estudio realizado por Talia Tene, Gabriela Tubón y colaboradores, que presentan picos a los 233 nm que corresponden a la transición π - π de los enlaces aromáticos C=C (Tene, Tubón, et al, 2020) de manera similar al del presente estudio.

3.1.1.2. FT – IR de Óxido de Grafeno

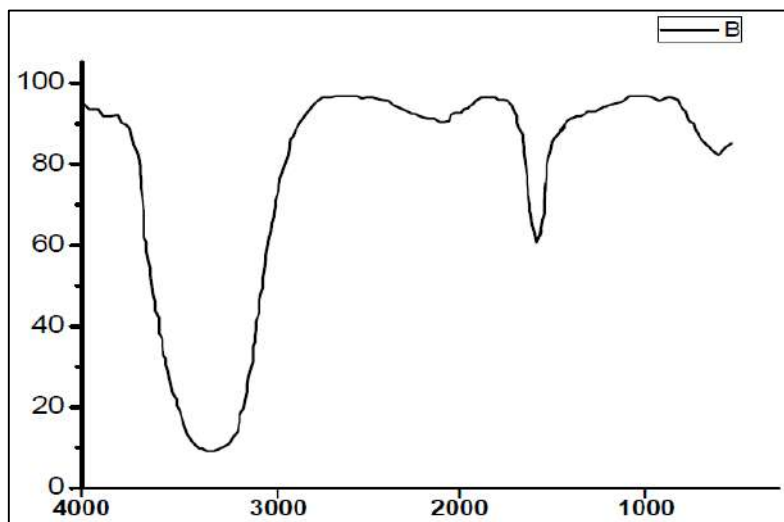


Gráfico 2-3 Espectro FT - IR de óxido de grafeno

Realizado por: Morales, Pamela, 2020

El gráfico 2-3, muestra el espectro infrarrojo del GO en el cual se visualizó la banda de absorción a 3353.6 cm^{-1} que corresponde a la vibración de estiramiento perteneciente al enlace O-H, es decir, a los grupos funcionales hidroxilos que posee el grafito.

Otra banda que se presentó fue a los 2138.67 cm^{-1} que corresponde a la vibración de estiramiento de los grupos funcionales carbonilos, la presencia de estas bandas sugieren que la oxidación del grafito se realizó adecuadamente al aplicar la técnica anteriormente detallada, además el espectro presentó bandas de absorción correspondientes al estrechamiento de grupos carbonilos, dando un pico alrededor de 1641.13 cm^{-1} , también se observó una banda de absorción que corresponde al enlace C-O-C a 1006.66 cm^{-1} .

Los resultados obtenidos tienen correlación con trabajos previos realizados por Talía Tene, Gabriela Tubón y colaboradores, que presentan bandas características de los grupos funcionales: C-O-C (1044 cm^{-1}), C-O (1222 cm^{-1}), un grupo hidroxilo a 3426 cm^{-1} y también se determinaron moléculas de agua absorbidas entre las capas del GO dándole así una mayor dispersabilidad en agua (Tene, Tubón, et al, 2020).

3.1.2. Síntesis de Copos de Pocas Capas de Grafeno

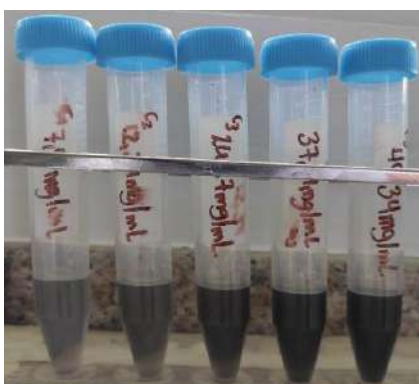


Figura 3-3 Copos de grafeno de pocas capas

Realizado por: Morales, Pamela, 2020

Para la síntesis de estas nanopartículas se siguió el método descrito en el estudio realizado por Cristian Vacacela, Talia Tene y colaboradores, por el cual se obtuvo una solución final de color negro – café que se observa en la figura 5.3, mediante la determinación de la absorbancia a una longitud de onda de 380 nm y utilizando el coeficiente de adsorción molar (1360.57 mL/mg.mol) (Cuzco, 2020) se calculó que los CPCG están a una concentración de 143.08 mg/mL.

Para las pruebas microbiológicas la solución fue diluida con DMF a diferentes concentraciones: 7.40 mg/mL; 12.33 mg/mL; 24.67 mg/mL; 37.05 mg/mL y 49.34 mg/mL.

3.1.2.1. Espectro UV – vis de CPCG

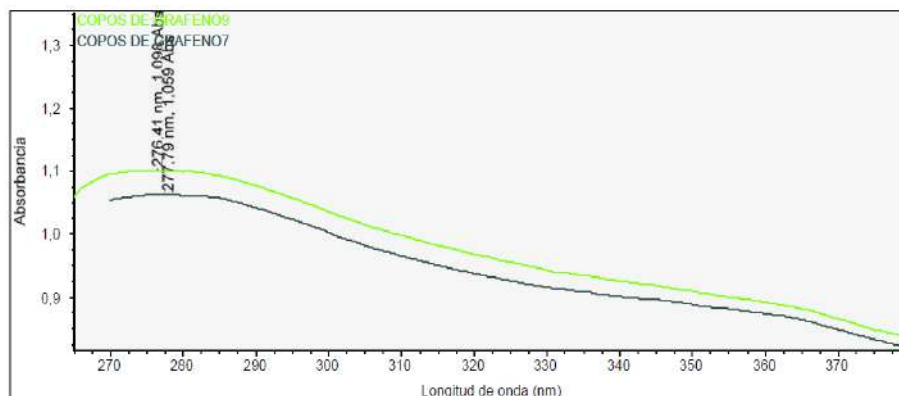


Gráfico 3-3 Espectro de absorbancia UV - Vis de copos de pocas capas de grafeno

Realizado por: Morales, Pamela, 2020

El espectro de los CPCG en forma de suspensión del gráfico 3.3, mostró un pico de absorción máxima a los 278 nm, este pico de absorción se le atribuye a la transición π - π de los enlaces aromáticos C=C, el cual es característico del grafeno por lo que es lógico su presencia en el espectro de esta nanopartícula demostrando que la síntesis se logró de manera adecuada.

3.1.3. *Derivatización de CPCG con nonilfenol*



Figura 4-3 Copos de Pocas Capas de Grafeno con Nonilfenol

Realizado por: Morales, Pamela, 2020

Siguiendo el procedimiento mencionado en capítulo II, se obtuvo una solución final de color negro tal como se presenta en la figura 6.3; por medio de la determinación de la absorbancia a una longitud de onda de 276.53 nm y utilizando el coeficiente de adsorción molar (1360.57 mL/mg.mol) (Cuzco, 2020) se calculó que los CPCG con nonilfenol están a una concentración de 154.01 mg/mL.

Para las pruebas microbiológicas la solución fue diluida con nonilfenol 0.1 ppm a diferentes concentraciones: 1 mg/mL, 7.40 mg/mL; 12.33 mg/mL; 24.67 mg/mL; 37.05 mg/mL, 50 mg/mL, 80 mg/mL, 100 mg/mL y 150 mg/mL.

3.1.3.1. UV – Vis de CPCG con nonilfenol

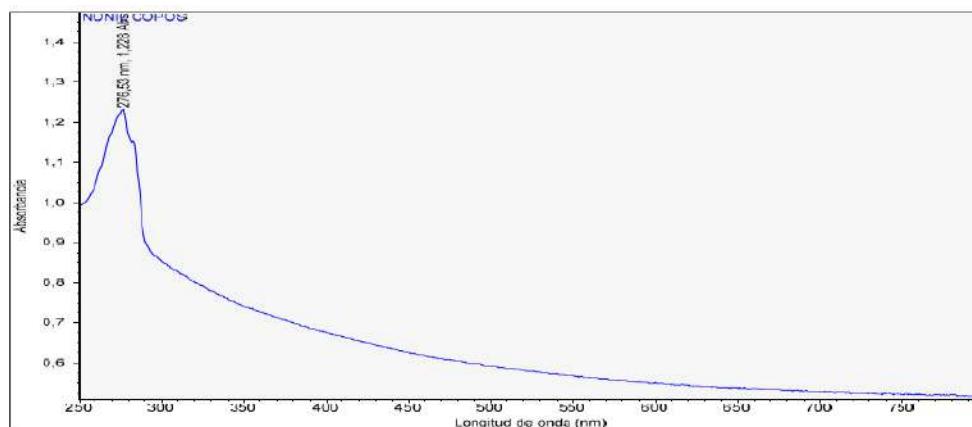


Gráfico 4-3 Espectro de absorción UV - Vis de CPCG con nonilfenol

Realizado por: Morales, Pamela, 2020

El espectro de los CPCG con nonilfenol en forma de suspensión del gráfico 4.3, mostró un pico de absorción máxima a los 276.53 nm, este pico de absorción al posicionarse en un rango similar al de los CPCG sintetizados con DMF, se puede mencionar que de igual manera se le atribuye a la transición π - π de los enlaces aromáticos C=C, que es característico del grafeno, corroborando así que la destilación de los copos y su combinación con el surfactante, nonilfenol, no provocó ningún daño en su estructura química debido a la presencia de grafeno en ella.

3.1.4. Síntesis de Nanopartículas de Plata



Figura 5-3 Nanopartículas de plata en estado seco



Figura 6-3 Solución de nanopartículas de plata

Realizado por: Morales, Pamela, 2020

Siguiendo el método de síntesis de nanopartículas de plata planteado por Mavani y Shah (2013) con soluciones de AgNO_3 0.001 M y 0.005 M, al reaccionar con borohidruro de sodio (0.002 M) se obtuvo una solución de color grisáceo y una solución de color café amarillento respectivamente como se puede visualizar en la figura 7.3, el cambio de color es característico de la presencia de nanopartículas de plata las cuales se determinó su presencia mediante el análisis de UV - vis a una longitud de onda de 200 – 1000nm. El color café amarillento indica una concentración de 26,30ppm AgNP 's aproximadamente. Lo cual corrobora el proceso de síntesis realizada en el laboratorio.

El pH de la solución fue de 7.5, parámetro importante para poder inferir que la síntesis fue obtenida de manera adecuada y se obtuvieron las nanopartículas esperadas, esto se corrobora posteriormente al realizar las pruebas de caracterización con la medición del espectro UV – Vis.

La solución de AgNP 's fue sometida a secado a 65° C por 24 horas, resultando así el material en forma de polvo, con un color negro brillante muy similar a la escarcha como se observa en la figura 8.3, para tener una mejor conservación del material, este proceso no perjudicó ni alteró sus propiedades químicas ni antibacterianas.

3.1.4.1. UV – vis de AgNP's

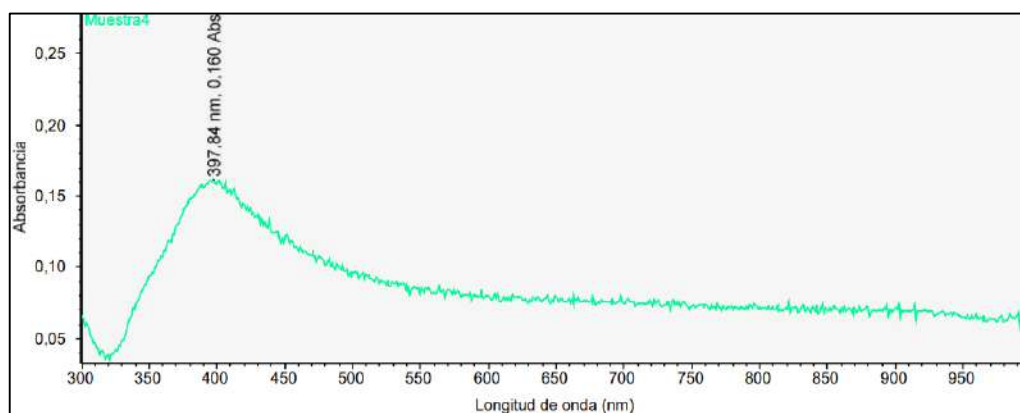


Gráfico 5-3 Espectro de absorción UV - Vis de nanopartículas de plata

Realizado por: Morales, Pamela, 2020

En el gráfico 5.3 se puede apreciar que las nanopartículas de plata sintetizadas con borohidruro de sodio y citrato de plata mostraron su pico máximo a los 397.84 nm aproximadamente, esto fue corroborado con el estudio realizado por Juan P. Gallo y Claudia Ossa en la Universidad de Antioquía en donde mencionan que el pico a obtener debe ser entre los 400 – 450 nm, este rango se da debido a que puede existir una variación en el tamaño, el método de síntesis o la dispersión de las nanopartículas (Gallo y Ossa, 2019).

3.1.5. Funcionalización de Nanohíbrido de Óxido de Grafeno con Plata



Figura 7-3 Nanohíbrido de óxido de grafeno con nanopartículas de plata a diferentes concentraciones.

Realizado por: Morales, Pamela, 2020

De acuerdo con lo realizado por Sundos, et al (2020), la funcionalización de las AgNP's con el GO presentó desde un color grisáceo casi transparente, pasando a un color café – negro llegando a un color casi totalmente negro, la variación del color dependió de la concentración del GO que fue agregado en la solución de AgNP's como se puede observar en la figura 9.3.

La correcta síntesis del nanohíbrido fue comprobada al momento de realizar las pruebas de caracterización en el SEM; para las pruebas microbiológicas y obtener las concentraciones de 0.16 mg/mL; 0.31 mg/mL; 0.625 mg/mL; 1.25 mg/mL y 2.5 mg/mL se cambió la cantidad de GO de la solución.

3.1.6. *Determinación de la estructura mediante Microscopio Electrónico de Barrido (SEM)*

Las nanopartículas sintetizadas fueron observadas en el Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) modelo JSM-IT100LA de la Facultad de Mecánica de la ESPOCH; con el fin de comprobar si su funcionalización fue realizada de manera adecuada además de su morfología.

3.1.6.1. *Óxido de Grafeno*

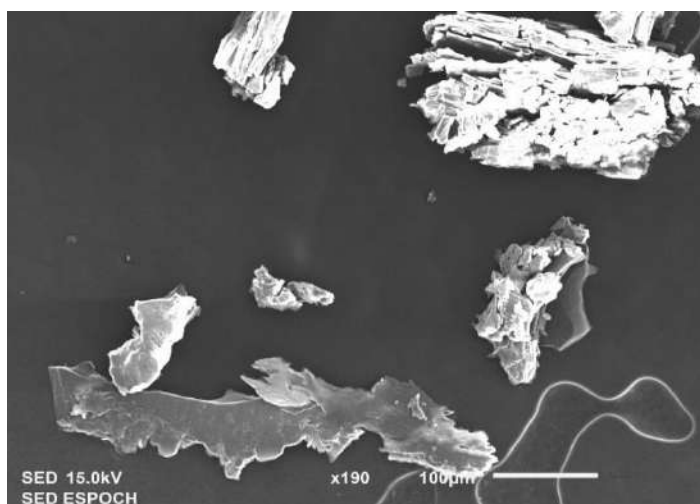


Figura 8-3 Micrografía SEM (x190) del óxido de Grafeno

Realizado por: Morales, Pamela, 2020

En la figura 10-3 de la micrografía SEM del óxido de grafeno se observan diferentes tamaños de partículas, debido al proceso utilizado para sintetizar, además se puede apreciar que las partículas muestran desniveles en la superficie que se asocian a los límites de las monocapas que posee el

nanomaterial las cuales a su vez están conformadas por hibridaciones sp^3 , que son las que le confieren al óxido de grafeno una estructura no planar (Mokkapati, 2018).

3.1.6.2. Copos de pocas capas de grafeno

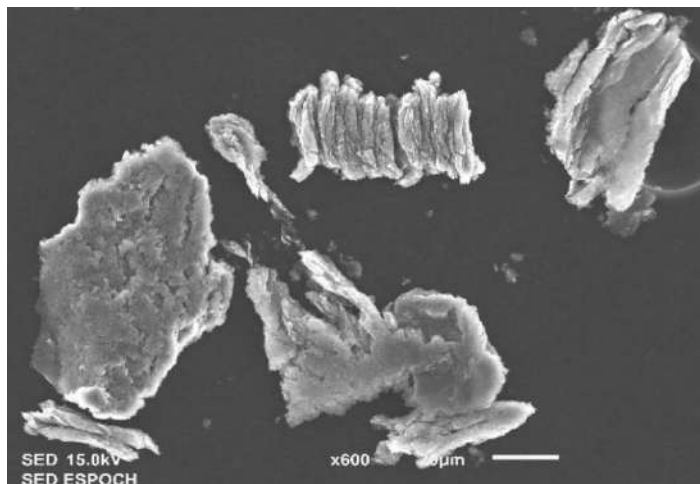


Figura 9-3 Micrografía SEM (x600) de CPG

Realizado por: Morales, Pamela, 2020

En la figura 11-3 de la micrografía SEM de CPG se pueden observar la forma típica de los copos que se presentan como escamas debido al proceso de exfoliación mecánica que fue utilizado en la síntesis de las nanopartículas en el estudio.

3.1.6.3. Nanopartículas de plata

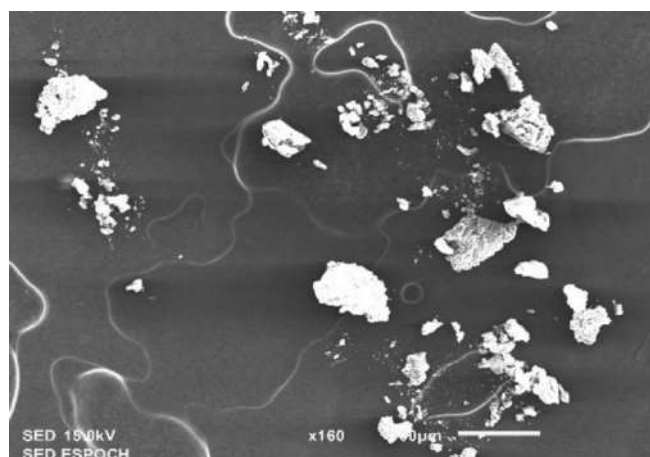


Figura 10-3 Micrografía SEM (x160) de AgNPs

Realizado por: Morales, Pamela, 2020

En la figura 12-3 obtenido por medio del SEM se pudieron observar nanopartículas de diversos tamaños con formas esféricas que no presentan gran agregación, indicando que el agente reductor es un gran estabilizante dentro la síntesis utilizada en el estudio.

3.1.6.4. Nanohíbrido de óxido de grafeno con plata

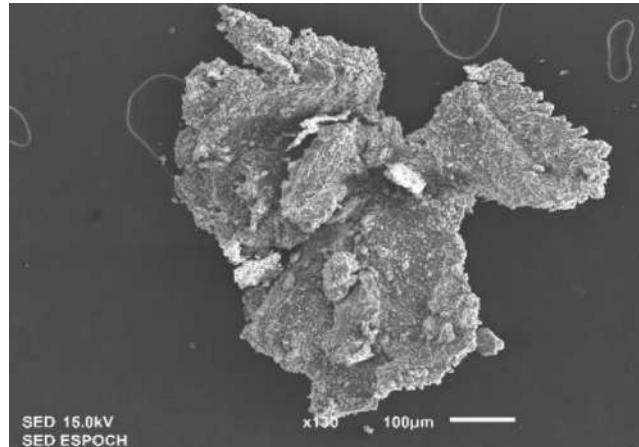


Figura 11-3 Micrografía SEM (x150) de OG - Ag

Realizado por: Morales, Pamela, 2020

En la figura 13-3 del SEM de GO-Ag se puede apreciar tanto la eficacia de la oxidación del grafeno como el anclaje de las AgNP's en las láminas de GO. La unión de grupos oxigenados durante el proceso de oxidación provocó una expansión severa; es decir una ampliación significativa del espacio entre capas, lo que a su vez provocó que se logre una disminución del tamaño de las capas GO. Por otro lado, se formaron láminas autoensambladas, debido a la presencia de puentes de hidrógeno que se crearon entre las funciones oxigenadas. Cuando el GO sufre estos cambios, toma forma de aglomerados voluminosos con una superficie lisa (Bouchareb et al, 2020).

3.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana de las nanopartículas sintetizadas

3.2.1. Inóculos utilizados en los ensayos microbiológicos

De las cepas bacterianas (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli*) del banco de cepas almacenadas en glicerol se tomó dos azadas y se las inoculó en caldo nutritivo a 37° C por 24h para su activación, posterior a esto se realizó una primera dilución en agua destilada y se procedió a diluir en agua de peptona; para la determinación de CIM tanto en caldo como en agar se utilizó la carga

bacteriana de la séptima dilución, la cual fue diferente para cada bacteria, en la tabla 8.3 se puede evidenciar las UFC que fueron contabilizados en cada cepa.

Tabla 1-3 UFC tubo de control

positivo

Cepa bacteriana	UFC
<i>E. coli</i>	288
<i>K. pneumoniae</i>	302
<i>P. aeruginosa</i>	317
<i>S. aureus</i>	321

Realizado por: Morales, Pamela, 2021

3.2.2. Determinación de la CIM

En las siguientes tablas están expresados los resultados obtenidos que corresponden a la CIM de las diferentes concentraciones en las que se encontraban las nanopartículas sintetizadas inoculadas con cargas bacterianas de la séptima dilución, de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.

Según varios estudios se ha determinado que las actividades antimicrobianas de las nanopartículas están fuertemente relacionadas con varios factores físicos como su tamaño lateral, el número de capas, la forma, la modificación de su superficie y su aglomeración (Zou, 2006).

Además se considera el hecho de que las bacterias Gram negativas como *E. coli*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* poseen una fina capa de péptidoglicano en medio de su membrana celular interna y externa, mientras que las bacterias Gram positivas como *S. aureus* poseen una capa de péptidoglicano más gruesa en su pared celular de una sola unidad, lo que hace que exista una variación entre ambos tipos de bacterias ante la sensibilidad y resistencia que podrían llegar a tener frente a diferentes antibióticos o nanomateriales que presenten actividad bactericida (Zou, 2006).

Además de ser aplicadas las diferentes concentraciones de las nanopartículas sintetizadas en la difusión con agar también se aplicó el antibiótico con el que principalmente se tratan las infecciones

de las cepas bacterianas en estudio para así poder realizar una comparación de la CIM e identificar su efectividad.

Los halos de inhibición que se presentaron frente a los antibióticos fueron bastante notorios presentando sensibilidad por parte de las cepas bacterianas empleadas en el estudio, además se pudo determinar que las bacterias presentan mayor sensibilidad frente a los antibióticos de uso común para el tratamiento de infecciones ocasionadas que frente a las nanopartículas sintetizadas en el estudio.

3.2.2.1. CIM Óxido de Grafeno

La evaluación de la actividad bactericida del GO sintetizado frente a *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, presenta resultados alentadores a concentraciones elevadas aproximadamente de 0.500 mg/mL, observándose inhibición de crecimiento en tres de las cuatro bacterias analizadas; a continuación se presentan los resultados.

- Dilución en caldo:
 - La CIM para *E. coli* se presentó a la concentración más baja a la que se encontraba el GO que fue 0.032 mg/mL, ya que la bacteria al estar expuesta al GO, su membrana, que se caracteriza por tener una capa fina de péptidoglicano, se aplana y a su vez pierde su integridad, siendo estos daños irreversibles para el microorganismo (Shaobin, 2011),
 - La CIM para *P. aeruginosa* se presentó en las concentraciones más altas a la que se encontraba el óxido de grafeno, 0.250 y 0.500 mg/mL, pero teniendo ya una ligera actividad a 0.125 mg/mL, ésta actividad se podría deber al estrés oxidativo que provoca el nanomaterial y también a la alteración física que provoca este sobre la bacteria (Shaobin, 2011),
 - La CIM para *K. pneumoniae* se presentó a 0.250 y a 0.500 mg/mL siendo las concentraciones más alta y además con una ligera actividad a 0.125 mg/mL, siendo esta también una bacteria de tipo Gram negativa, la actividad del GO se puede deber por las mismas razones que se mencionan con las dos bacterias anteriores
 - La CIM para *S. aureus* se evidenció a 0.250 mg/mL ya que esta bacteria al ser Gram positiva, en su estructura presenta varias capas de péptidoglicano lo que da la capacidad de ser más resistente frente a la acción antibacteriana del GO (Tang, 2013).

Tabla 2-3 Resultados del CIM de óxido de grafeno en caldo LB

Tipo de bacteria	Tratamiento GO (mg/mL)				
	0.500	0.250	0.125	0.062	0.032
<i>E. coli</i>	+/-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	+/-	+	+
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	+/-	+	+
<i>S. aureus</i>	-	-	+	+	+

Referencias: (+) presencia de turbidez, (+/-) turbidez intermedia, (-) ausencia de turbidez

Realizado por: Morales, Pamela, 2021

Los resultados a 0.500 mg/mL frente a *E. coli* y a 0.125 frente a *P. aeruginosa* y frente a *K. pneumoniae* se encuentran tabulados como presencia de turbidez intermedia pero en los resultados prácticos presentó un nivel de turbidez inferior.

- Difusión en agar:

En el ensayo de difusión en agar Müller Hinton se presentaron:

- La CIM para *E. coli* se evidenció a 0.032 mg/mL presentando un halo de inhibición de 1 mm, el cual representa una actividad del 14.29 % respecto al efecto presentado por la Gentamicina, principal antibiótico utilizado en el mercado frente a una infección de esta especie que generó un halo de inhibición de 7 mm, demostrando que a esas concentraciones el nanomaterial posee menor actividad bactericida que el antibiótico,
- La CIM para *K. pneumoniae* se evidenció a 0.032 mg/mL presentando un halo de inhibición de 1mm, el cual representa una actividad del 13 % respecto al efecto presentado por la Amikacina, principal antibiótico utilizado en el mercado frente a una infección de esta especie que generó un halo de inhibición de 8 mm, demostrando que a esas concentraciones el nanomaterial posee menor actividad bactericida que el antibiótico,
- En el caso de *P. aeruginosa* no se presentaron halos de inhibición a ninguna concentración por lo que no se pudo determinar la CIM por difusión en agar; esto se puede atribuir a que esta especie se presenta como un microorganismo sensible ante el GO, debido a que posee la capacidad de reducir al mismo sin ningún mediador redox involucrado en el proceso, puesto que al pasar 24 horas de incubación aún se observa la presencia de la bacteria tanto en el caldo como en la placa con agar, dado que la reducción del GO a rGO no se produce de manera inmediata, sino que se acelera con el tiempo y por lo tanto con el aumento del número de bacterias (Mokkapat, 2018); para

su comparación con el principal antibiótico utilizado en el mercado frente a una infección de esta especie, se utilizó amikacina, que presentó un halo de inhibición de 9 mm, demostrando que a esas concentraciones el nanomaterial posee menor actividad bactericida que el antibiótico,

- Para *S. aureus* se identificó la CIM a 0.250 mg/mL con un halo de inhibición de 1mm el cual representa una actividad del 7.7 % respecto al efecto presentado por la Azitromicina, principal antibiótico utilizado en el mercado frente a una infección de esta especie que generó un halo de inhibición de 13 mm, demostrando que a esas concentraciones el nanomaterial posee menor actividad bactericida que el antibiótico.

Tabla 3-3 Resultados del antibiograma en agar Müller Hinton

Tipo de bacteria	Tratamiento GO (mg/mL)					Antibiótico		
	0.50	0.25	0.13	0.06	0.03	Amikacina	Azitromicina	Gentamicina
<i>E. coli</i>	2 mm	1 mm	1 mm	1 mm	1 mm			7 mm
<i>K. pneumoniae</i>	3 mm	2 mm	2 mm	2 mm	1 mm	8 mm		
<i>P. aeruginosa</i>	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	9 mm		
<i>S. aureus</i>	1 mm	1 mm	0 mm	0 mm	0 mm		13 mm	

Realizado por: Morales, Pamela, 2021

Después de realizados los ensayos se puede observar que el material tiene un poder bactericida que depende tanto de la bacteria sobre la que actúe como de la concentración a la que se encuentra el nanomaterial, además con estos resultados se determinó que tiene mayor eficacia frente a bacterias Gram negativas debido a las diferentes estructuras y composiciones químicas que poseen sus paredes celulares, las Gram negativas están compuestas por paredes celulares con solo una fina capa de péptidoglicano en comparación con las Gram positivas que están conformadas por múltiples capas de péptidoglicano en su pared celular lo que les podría proporcionar una mayor protección frente a la acción del GO, convirtiéndolas en bacterias con mayor resistencia frente a la nanopartícula (Tang, 2013).

3.2.2.2. CIM Copos De Pocas Capas de Grafeno

- Dilución en caldo:

En el ensayo de difusión en Caldo LB se presentó una inhibición total por parte de los copos a todas las concentraciones frente a todas las especies bacterianas, resultados que pueden deberse a que el

reactivo (DMF) en que se encuentran disueltos los copos presenta cierta toxicidad misma que está identificada en la ficha técnica del reactivo.

Para verificar si el DMF presentaba acción sobre las bacterias se realizó un ensayo de dilución en caldo con el reactivo y las especies bacterianas dando como resultado una completa inhibición.

Tabla 4-3 Resultados del CIM de copos de pocas capas de grafeno en caldo LB

Tipo de bacteria	Tratamiento CPCG (mg/mL)				
	49.34	37.05	24.67	12.33	7.40
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-

Referencias: (+) presencia de turbidez, (+/-) turbidez intermedia, (-) ausencia de turbidez

Realizado por: Morales, Pamela, 2021

Tabla 5-3 Resultados del CIM de DMF en caldo LB

Tipo de bacteria	Tratamiento DFM
<i>E. coli</i>	-
<i>K. pneumoniae</i>	-
<i>P. aeruginosa</i>	-
<i>S. aureus</i>	-

Referencias: (+) presencia de turbidez, (+/-) turbidez intermedia, (-) ausencia de turbidez

Realizado por: Morales, Pamela, 2021

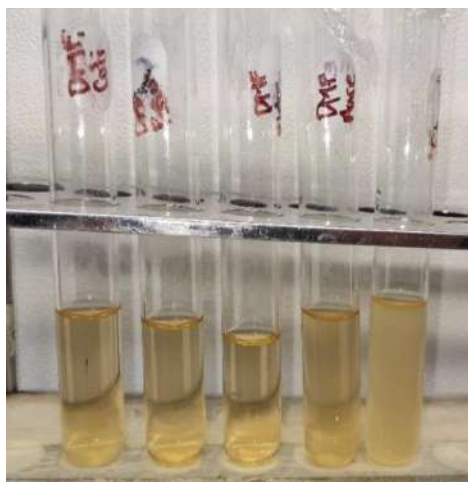


Figura 12-3 CIM para DMF

Realizado por: Morales, Pamela, 2021

- Difusión en agar:

En el ensayo de difusión en agar Müller Hinton no se presentaron halos de inhibición frente a ninguna especie bacteriana y a ninguna concentración utilizada en el ensayo, corroborando así los resultados obtenidos en el ensayo de la CIM en dilución en caldo.

Tabla 6-3 Resultados del antibiograma en agar Müller Hinton

Tipo de bacteria	Tratamiento CPCG (mg/mL)					Antibiótico		
	49.34	37.05	24.67	12.33	7.40	Amikacina	Azitromicina	Gentamicina
<i>E. coli</i>	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm			7 mm
<i>K. pneumoniae</i>	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	8 mm		
<i>P. aeruginosa</i>	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	9 mm		
<i>S. aureus</i>	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm		13 mm	

Realizado por: Morales, Pamela, 2021

Los CPCG no tuvieron actividad bactericida debido a que el solvente en el que estaban suspendidos tiene una toxicidad intermedia para el ser humano por lo tanto la toxicidad para las bacterias es mucho mayor, por lo que los copos al encontrarse en suspensión con este reactivo adquirieron su toxicidad, por lo tanto se decidió cambiar de solvente para poder descartar que los copos tienen o no actividad bactericida frente a las cepas seleccionadas en el estudio.

3.2.2.3. CIM Copos De Pocas Capas de Grafeno con nonilfenol

Para poder cambiar de solvente en el que estaban suspendidos los CPCG, primero se realizaron pruebas con el nonilfenol para verificar si este poseía o no actividad bactericida frente a las cepas bacterianas del estudio.

Tabla 7-3 CIM para nonilfenol

Tipo de bacteria	Tratamiento nonilfenol (mg/mL)		
	1	1	0.1
<i>E. coli</i>	+	+	+
<i>K. pneumoniae</i>	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	+
<i>S. aureus</i>	+	+	+

Referencias: (+) presencia de turbidez, (+/-) turbidez intermedia, (-) ausencia de turbidez

Realizado por: Morales, Pamela, 2021

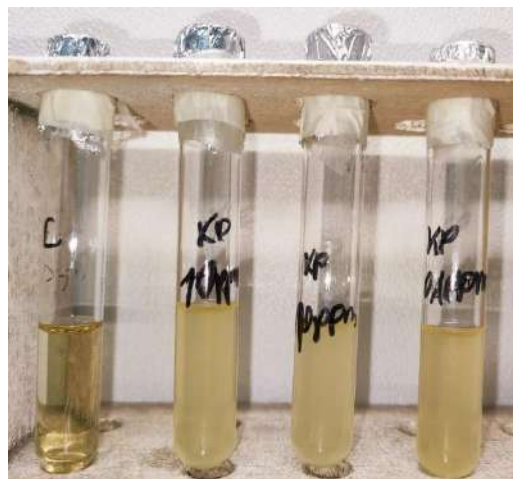


Figura 13-3 CIM para nonilfenol

Realizador por: Morales, Pamela, 2021

El solvente no presentó actividad bactericida frente a las cepas bacterianas por lo que se procedió a combinarlo con los CPCG y a realizar el ensayo de la CIM.

- Dilución en caldo:

Los CPCG con nonilfenol en el ensayo de dilución en caldo no presentó inhibición del crecimiento bacteriano a todas las concentraciones utilizadas para el ensayo y frente a todas las especies por lo tanto se observó presencia de turbidez en todos los tubos de ensayo, comprobando así que los copos no poseen actividad bactericida frente a las cepas seleccionadas en el estudio y a las concentraciones utilizadas en el ensayo.

Tabla 8-3 Resultados del CIM de copos de pocas capas de grafeno con nonilfenol en caldo LB

Tipo de bacteria	Tratamiento CPCG (mg/mL)									
	150	100	80	50	37.05	24.67	12.33	7.40	1	
<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>K. pneumoniae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Referencias: (+) presencia de turbidez, (+/-) turbidez intermedia, (-) ausencia de turbidez

Realizado por: Morales, Pamela, 2021

- Difusión en agar:

En el ensayo de difusión en agar Müller Hinton no se presentaron halos de inhibición frente a ninguna especie bacteriana y a ninguna concentración utilizada en el ensayo, corroborando así los resultados obtenidos en el ensayo de la CIM en dilución en caldo.

Tabla 9-3 Resultados del antibiograma en agar Müller Hinton

Tipo de bacteria	Tratamiento CPCG (mg/mL)									
	150	100	80	50	37.05	24.67	12.33	7.40	1	
<i>E. coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	
<i>K. pneumoniae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	

<i>S. aureus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm

Tipo de bacteria	Antibiótico		
	Amikacina	Azitromicina	Gentamicina
<i>E. coli</i>			0.7 mm
<i>K. pneumoniae</i>	0.8 mm		
<i>P. aeruginosa</i>	0.9 mm		
<i>S. aureus</i>		1.3 mm	

Realizado por: Morales, Pamela, 2021

Los resultados obtenidos en el ensayo se explicarían debido a que la larga sonicación empleada en la síntesis de los copos produjo un rompimiento de los enlaces del soluto y del solvente haciendo que los hidroxilos del óxido de grafeno se pierdan en el proceso y no provoquen una correcta adhesión (Vacacela, et al, 2019), eliminando así la capacidad de presentar actividad bactericida frente a las cepas bacterianas.

3.2.2.4. CIM para nanohíbrido de óxido de grafeno con plata

La evaluación de la actividad bactericida del GO – Ag sintetizado frente a *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, no presentó resultados alentadores a las concentraciones utilizadas en el estudio ya que mientras se aumenta la concentración de las nanopartículas estas perdieron su actividad; a continuación se presentan los resultados.

- Dilución en caldo:

En el ensayo CIM realizado para GO – Ag los resultados obtenidos fueron:

- Para *E. coli* no se pudo determinar la CIM ya que varios estudios presentan que la CIM para esta bacteria se presenta a partir de los 3 mg/mL, pero a pesar de eso se evidenció una turbidez intermedia en los tubos, con lo que se podría inferir que la nanopartícula estaba actuando ligeramente sobre la cepa,

- Para *K. pneumoniae* de igual manera no se pudo determinar la CIM, pero al presentar una turbidez intermedia, se infiere que la nanopartícula tiene actividad bactericida sobre la cepa pero a concentraciones un poco más altas a las que fueron expuestas en el ensayo,
- Para *P. aeruginosa* la CIM se presentó a la concentración más alta, a 2.50 mg/mL, haciendo alusión a que la nanopartícula logró inhibir el crecimiento de la bacteria provocándole ablandamiento de la membrana y pérdida de su integridad (Shaobin, 2011),
- Para *S. aureus* se obtuvieron resultado ambiguos ya que en el ensayo se presentó la CIM en la concentración más baja, 0.16 mg/mL, pero al aumentar la concentración se presentó un ligero crecimiento, lo que se puede inferir es que en concentraciones más bajas, la cepa no fue correctamente inoculada puesto que en varios estudios se presenta que la CIM para esta especie se presenta a partir de los 6 mg/mL.

Tabla 10-3 Resultados del CIM de nanohíbrido de óxido de grafeno con plata en caldo LB

Tipo de bacteria	Tratamiento GO-Ag (mg/mL)				
	2.50	1.25	0.63	0.31	0.16
<i>E. coli</i>	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
<i>K. pneumoniae</i>	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
<i>P. aeruginosa</i>	-	+/-	+	+/-	+
<i>S. aureus</i>	+/-	+/-	-	-	-

Referencias: (+) presencia de turbidez, (+/-) turbidez intermedia,

(-) ausencia de turbidez

Realizado por: Morales, Pamela, 2021

Los resultados a 1.25 y a 2.50 mg/mL frente a *E. coli* y *S. aureus* se encuentran tabulados como presencia de turbidez intermedia pero en los resultados prácticos presentó un nivel de turbidez inferior.

- Difusión en agar:

En el ensayo realizado de difusión en agar Müller Hinton se obtuvieron los siguientes resultados:

- La CIM frente a *E. coli* se presentó a 0,63 mg/mL como un halo de inhibición de 1 mm, el cual representa una actividad del 14.29 % respecto al efecto presentado por la Gentamicina, principal antibiótico utilizado en el mercado frente a una infección de esta especie que generó un halo de inhibición de 0.7 mm,

- La CIM para *K. pneumoniae* se evidenció a 0.16 mg/mL con un halo de inhibición de 1 mm el cual representa una actividad del 13 % respecto al efecto presentado por la Amikacina, principal antibiótico utilizado en el mercado frente a una infección de esta especie que generó un halo de inhibición de 8 mm,
- Halos de inhibición de 1 mm a 1.25 mg/mL que sería en el valor de la CIM frente a *P. aeruginosa*; el cual representa una actividad del 11.1 % respecto al efecto presentado por la Amikacina, principal antibiótico utilizado en el mercado frente a una infección de esta especie que generó un halo de inhibición de 9 mm,
- La CIM frente a *S. aureus* se presentó a 0.31 mg/ml con un halo de inhibición de 1.5 mm, el cual representa una actividad del 11,54% respecto al efecto presentado por la Azitromicina, principal antibiótico utilizado en el mercado frente a una infección de esta especie que generó un halo de inhibición de 13 mm.

Tabla 11-3 Resultados del antibiograma en agar Müller Hinton

Tipo de bacteria	Tratamiento GO-Ag (mg/mL)					Antibiótico		
	2.5	1.25	0.63	0.31	0.16	Amikacina	Azitromicina	Gentamicina
<i>E. coli</i>	1 mm	1 mm	1 mm	0 mm	0 mm			7 mm
<i>K. pneumoniae</i>	2 mm	2 mm	1 mm	1 mm	1 mm	8 mm		
<i>P. aeruginosa</i>	1 mm	1 mm	0 mm	0 mm	0 mm	9 mm		
<i>S. aureus</i>	1 mm	1 mm	2 mm	1.5 mm	0 mm		13 mm	

Realizado por: Morales, Pamela, 2021

Los resultados obtenidos en el estudio ponen al GO – Ag como una nanopartícula con una baja actividad bactericida a las concentraciones utilizadas, lo cual no son resultados alentadores, puesto que, se esperaba que este nanomaterial presente una mayor actividad bactericida debido a que en su composición posee nanopartículas de plata, las cuales según Flores (2014), tienen una gran capacidad microbicida frente a virus y bacterias, por las propiedades físicas y químicas que presentan, y además está compuesta también por GO con el que se pudo observar en los ensayos anteriores que este nanomaterial si presenta una actividad bactericida efectiva frente a las cepas bacterianas, por lo tanto a las concentraciones trabajadas en el estudio no se puede apreciar una acción sinérgica entre el GO y las nanopartículas de Ag.

En un estudio realizado por María Cobos y colaboradores (2020), de igual manera se determina la CIM del nanohíbrido a diferentes concentraciones (de 0.28 mg/mL a 20 mg/mL) y con las cepas de *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. coli*, teniendo como resultado que la CIM para *S. aureus* fue a 6 mg/mL

y para *P. aeruginosa* y *E. coli* fue a 3 mg/mL; en otro estudio realizado por Tang (2013), la CIM para *E. coli* se dio a los 5 mg/mL y para *S. aureus* a 8 mg/mL, comprobando así que la nanopartícula sintetizada sí posee actividad bactericida pero a concentraciones más elevadas que a las que se trabajó en el ensayo.

3.2.2.5. CBM para las nanopartículas sintetizadas

Después de determinada la **CIM** de todas las nanopartículas utilizadas frente a todas las especies bacterianas del estudio, se determinó la **CBM** a partir de los tubos en donde no se observó turbidez, comparando los valores de los recuentos obtenidos de los tubos negativos con el tubo que se consideró como control positivo, el mismo que nos da la cantidad total de bacterias inoculadas representando el 100% de UFC/mL y con ese resultado se determinó el porcentaje de crecimiento que se obtuvo en cada tubo sin turbidez.

Tabla 12-3 CBM en placa de agar TSA

Tratamiento (mg/mL)	<i>E. coli</i> (%)	<i>S. aureus</i> (%)
GO (0.062)	0.7	-
GO (0.125)	0.6	-
GO (0.250)	0.5	1.6
GO (0.500)	-	1.2
GO - Ag (0.16)	-	4.4
GO - Ag (0.31)	-	3.1
GO - Ag (0.63)	-	2.8
Gentamicina	0.5	-
Azitromicina	-	0.5

Realizado por: Morales, Pamela, 2021

Realizado el subcultivo en TSA de los tubos negativos y comparando con el tubo de control positivo se corroboró que el GO a esas concentraciones frente a *E. coli* y a *S. aureus* tiene mayor efecto bactericida que el GO – Ag frente a *S. aureus*, ya que el porcentaje de CBM del GO es mucho menor que el del nanohíbrido, debido a que actúa a concentraciones más bajas sobre las mismas especies bacterianas.

Además se realizó una comparación de la CBM de las nanopartículas sintetizadas con la CBM de los antibióticos de referencia para cada cepa bacteriana y se determinó que los antibióticos poseen mejor nivel bacteriostático ya que permite un menor porcentaje de crecimiento bacteriano en comparación al porcentaje de las nanopartículas a las concentraciones utilizadas en el ensayo.

3.3. Análisis Estadístico

Para realizar el análisis estadístico de los tratamientos obtenidos de todas las nanopartículas sintetizadas, se utilizó el análisis ANOVA, en el cual se va a determinar si $p > 0.05$ y aceptar la hipótesis nula teniendo como conclusión que no existe una diferencia significativa entre los tratamientos, pero si $p < 0.05$ se va a realizar el test de Tukey para así determinar cuál de los grupos de tratamiento presenta una diferencia significativa.

3.3.1. Óxido de Grafeno

En la tabla 8.3 está descrito el ensayo de la CIM del GO a sus diferentes concentraciones frente a las 4 cepas bacterianas que fueron utilizadas en el estudio.

Prueba de ANOVA

A continuación, se indica el análisis estadístico de la CIM del GO a sus diferentes concentraciones frente a las 4 cepas bacterianas que fueron utilizadas en el estudio.

$H_0 = \bar{X}$ actividad bactericida del GO a diferentes concentraciones para *K. pneumoniae* = \bar{X} actividad bactericida del GO a diferentes concentraciones para *E. coli* = \bar{X} actividad bactericida del GO a diferentes concentraciones para *S. aureus* = \bar{X} actividad bactericida del GO a diferentes concentraciones para *P. aeruginosa*.

$H_1 = \bar{X}$ actividad bactericida del GO a diferentes concentraciones para *K. pneumoniae* \neq \bar{X} actividad bactericida del GO a diferentes concentraciones para *E. coli* \neq \bar{X} actividad bactericida del GO a diferentes concentraciones para *S. aureus* \neq \bar{X} actividad bactericida del GO a diferentes concentraciones para *P. aeruginosa*

Tabla 13-3 Análisis estadístico. CIM del óxido de grafeno, ANOVA.

F. Var.	Df	Sum Sq	Mean Sq	F. value	Pr (>F)
Especie_trat	3	0.11902	0.03967	29.643	7.85e ⁻⁰⁶ ***
Dilución_bloq	4	0.02282	0.00571	4.263	0.0225 *
Error	12	0.01606	0.00134		
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					

Realizado por: Morales, Pamela, 2021

De acuerdo con el análisis realizado con un nivel de confianza del 95 % se obtuvo como resultado que $p < 0.05$, por lo tanto se procedió a rechazar la hipótesis nula y a aceptar la hipótesis alternativa planteada, que sugiere que al menos uno de los tratamientos presenta diferencia significativa.

Con el resultado anteriormente expuesto se procedió a realizar el test de Tukey con una confianza del 95 %, para así poder determinar cuál de los tratamientos es el que presenta una diferencia significativa.

Tabla 14-3 Diferencias significativas entre las cepas bacterianas, Test Tukey.

Especie tratada	Media	Grupo
<i>K. pneumoniae</i>	0.200	a
<i>E. coli</i>	0.120	b
<i>S. aureus</i>	0.038	c
<i>P. aeruginosa</i>	0.000	c

Los tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes

Realizado por: Morales, Pamela, 2021

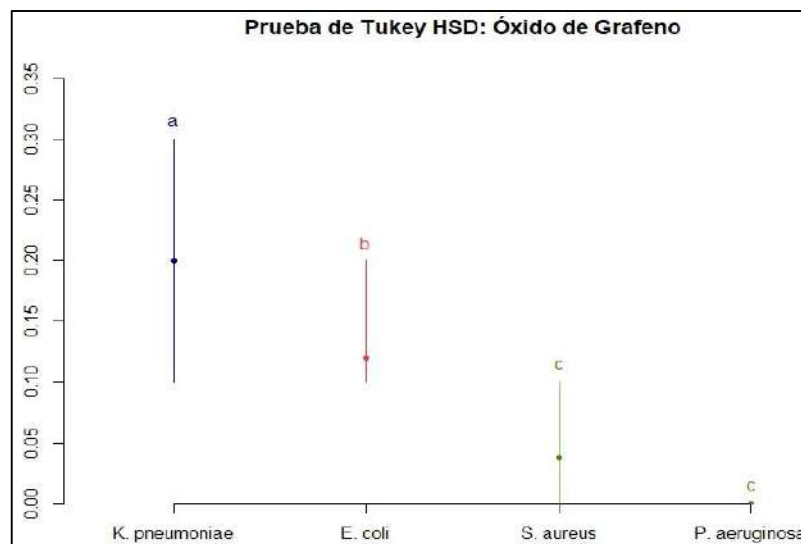


Gráfico 6-3 CIM óxido de grafeno, Test de Tukey.

Realizado por: Morales, Pamela, 2021

Por medio del test de Tukey se logró determinar que tratamientos fueron los que tenían una estrecha relación y cuales fueron significativamente diferentes. En la tabla 2-3 se puede observar que la actividad que tuvo el GO frente a *S. aureus* y a *P. aeruginosa* no presentó una diferencia significativa, en cambio la actividad frente a *K. pneumoniae* y a *E. coli* se evidenció una diferencia significativa frente a los demás tratamientos, concluyendo así que el nanomaterial utilizado es más efectivo ante las dos últimas especies bacterianas.

3.3.2. Copos de Pocas Capas de Grafeno

Al observarse ninguna actividad inhibitoria por parte de los CPCG no se puede determinar una diferencia estadística porque no presenta condiciones de variabilidad.

3.3.3. Nanohíbrido de óxido de grafeno con plata

En la tabla 16-3 está descrita la CIM del GO – Ag a sus diferentes concentraciones frente a las 4 cepas bacterianas que fueron utilizadas en el estudio.

Prueba de ANOVA

A continuación, se indica el análisis estadístico de la CIM del GO – Ag a sus diferentes concentraciones frente a las 4 cepas bacterianas que fueron utilizadas en el estudio.

$H_0 = \bar{X}$ actividad bactericida del GO – Ag a diferentes concentraciones para *K. pneumoniae* = \bar{X} actividad bactericida del GO – Ag a diferentes concentraciones para *E. coli* = \bar{X} actividad bactericida del GO – Ag a diferentes concentraciones para *S. aureus* = \bar{X} actividad bactericida del GO – Ag a diferentes concentraciones para *P. aeruginosa*.

$H_1 = \bar{X}$ actividad bactericida del GO – Ag a diferentes concentraciones para *K. pneumoniae* $\neq \bar{X}$ actividad bactericida del GO – Ag a diferentes concentraciones para *E. coli* $\neq \bar{X}$ actividad bactericida del GO – Ag a diferentes concentraciones para *S. aureus* $\neq \bar{X}$ actividad bactericida del GO – Ag a diferentes concentraciones para *P. aeruginosa*.

Tabla 15-3 Análisis estadístico. CIM del nanohíbrido de óxido de grafeno con plata, ANOVA.

F. Var.	Df	Sum Sq	Mean Sq	F. value	Pr (>F)
Especie_trat	3	0.052	0.017333	16.000	0.000171 ***
Dilución_bloq	4	0.023	0.005750	5.308	0.010717 *
Error	12	0.013	0.001083		
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					

Realizado por: Morales, Pamela, 2021

De acuerdo con el análisis realizado con un nivel de confianza del 95 % se obtuvo como resultado que $p < 0.05$ por lo tanto se procedió a rechazar la hipótesis nula y a aceptar la hipótesis alternativa planteada que sugiere que al menos uno de los tratamientos presenta diferencia significativa.

Con el resultado anteriormente expuesto se procedió a realizar el test de Tukey con una confianza del 95 % para así poder determinar cuál de los tratamientos es el que presenta una diferencia significativa.

Tabla 16-3 Diferencias significativas entre las cepas bacterianas, Test Tukey.

Especie tratada	Media	Grupo
<i>K. pneumoniae</i>	0.14	a
<i>E. coli</i>	0.06	b
<i>P. aeruginosa</i>	0.04	b
<i>S. aureus</i>	0.01	b

Los tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes

Realizado por: Morales, Pamela, 2021

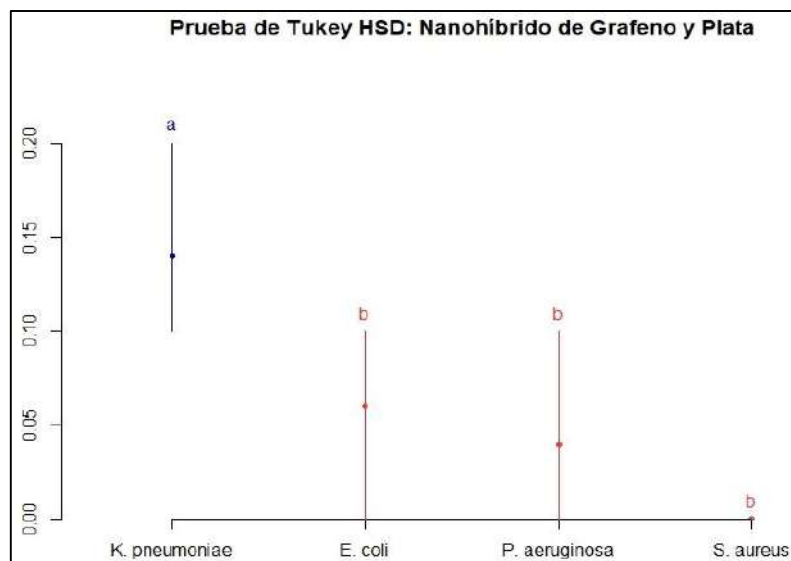


Gráfico 7-3 CIM nanohíbrido de óxido de grafeno con plata, Test de Tukey.

Realizado por: Morales, Pamela, 2021

Por medio del test de Tukey se logró determinar que tratamientos fueron los que tenían una estrecha relación y cuales fueron significativamente diferentes. En la tabla 10-3 se puede observar que la actividad que tuvo el GO – Ag frente a *E. coli*, a *S. aureus* y a *P. aeruginosa* no presentó una diferencia significativa, por otra parte, la actividad frente a *K. pneumoniae* presentó diferencia significativa frente a los demás tratamientos, dando a entender que el nanomaterial utilizado es más efectivo ante esta cepa bacteriana.

CONCLUSIONES

- Para determinar el derivado del grafeno que tiene una mayor actividad bactericida frente a las cepas bacterianas se desarrollaron varios ensayos entre ellos se determinó la CIM, la CBM y además se realizó un análisis ANOVA; la CIM es el ensayo con el que mejor se determina la actividad bactericida de las nanopartículas ya que con este se pudo evaluar cual es la concentración más baja a la que actúa frente a las bacterias, en el caso del GO la CIM para *E. coli* fue a 0.032 mg/mL, para *K. pneumoniae* fue a 0.250 mg/mL, para *P. aeruginosa* fue a 0.500 mg/mL y para *S. aureus* fue a 0.125 mg/mL; en el caso de CPCG no se evidenció inhibición bacteriana por lo que no sería parte de la comparación y con el GO – Ag la CIM para *E. coli* y para *K. pneumoniae* no se pudo evidenciar debido al ligero crecimiento que se produjo, para *P. aeruginosa* fue a 2.50 mg/mL y para *S. aureus* fue a 0.16 mg/mL pero con un ligero crecimiento a las concentraciones más altas; por lo tanto con estos resultados se identificó que el derivado de grafeno con mayor actividad bactericida es el óxido de grafeno debido a las características físicas y químicas que presenta el nanomaterial sobretodo frente a las bacterias Gram negativas que presentan una pared celular más fina y más accesible para la actividad antibacteriana de la nanopartícula.
- Siendo el GO el derivado de grafeno que presentó mayor actividad bactericida, con la CIM en difusión en agar Müller Hinton, se realizó una comparación con los fármacos comúnmente utilizados cuando aparece una infección ocasionada por las cepas seleccionadas, para el estudio se utilizó discos de antibióticos de amikacina, azitromicina y gentamicina, con los que se pudo observar que los fármacos tienen una actividad bactericida mucho más efectiva que el nanomaterial utilizado, puesto que los halos de inhibición que presentó el GO fueron casi imperceptibles siendo así para *E. coli* fue de 2 mm, para *K. pneumoniae* fue de 3 mm, con *P. aeruginosa* no se presentaron halos de inhibición y para *S. aureus* fue de 1 mm, a comparación de los halos de inhibición que presentaron los antibióticos, teniendo que el halo de gentamicina frente a *E. coli* fue de 7 mm, el de amikacina frente a *K. pneumoniae* fue de 8 mm y frente a *P. aeruginosa* fue de 9 mm y el de azitromicina frente a *S. aureus* fue de 13 mm.
- De acuerdo con el ensayo de la CBM los antibióticos poseen un mejor nivel bacteriostático que las nanopartículas sintetizadas a las concentraciones estudiadas, puesto que con los antibióticos presentan un menor porcentaje de crecimiento bacteriano en relación con las UFC tubo original, Gentamicina presentó un 0.5 % frente a *E. coli* y el GO presentó a 0.062 mg/mL: 0.7 %, a 0.125

mg/mL: 0.6% y a 0.250 mg/mL: 0.5%, la última sería la única concentración que tendría el mismo porcentaje de crecimiento que el estándar; Azitromicina presentó un 0.5 % para *S. aureus* y el GO presentó a 0.250 mg/mL: 1.6 % y a 0.500 mg/mL: 1.2 % y el GO – Ag presentó a 0.16 mg/mL: 4.4 %, a 0.31 mg/mL: 3.1 % y a 0.63 mg/mL: 2.8 %.

RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio acerca de la capacidad que posee la *P. aeruginosa* para reducir el GO a rGO en un medio de cultivo sin la utilización de algún agente redox involucrado en su proceso.
- Determinar si otros antibióticos que no son comúnmente utilizados en el tratamiento de infecciones causadas por las cepas bacterianas utilizadas tienen mayor o similar efectividad que las nanopartículas empleadas en el estudio.
- Efectuar el mismo estudio, con las mismas nanopartículas sintetizadas a diferentes concentraciones para verificar si su actividad bactericida es diferente al momento de cambiar los parámetros.

GLOSARIO

Agar Müller Hinton. – El agar Müller Hinton es un medio de cultivo recomendado para realizar pruebas de sensibilidad de patógenos facultativos de crecimiento rápido o aeróbicos. La reproducibilidad de los resultados de las pruebas con diferentes lotes de este medio es buena; posee bajo contenido de inhibidores de tetraciclina, sulfonamidas y trimetoprima lo que permite el crecimiento de la casi todos los gérmenes patógenos.

Alotropía. - Propiedad que poseen algunos elementos químicos de poder aparecer en más de una forma en el mismo estado físico, estas formas presentan diferentes propiedades químicas y físicas dependiendo de la agrupación de los átomos que conforman sus moléculas, por ejemplo las formas alotrópicas del carbono son el fullereno, el grafito (de donde se obtiene el grafeno), el diamante, el nanotubo de carbono de pared simple, el carbono amorfo y el nanotubo de carbono de pared múltiple.

Caldo LB. – Caldo Luria Bertani o caldo LB, está compuesto por extracto de levadura y peptona de caseína los cuales le proporcionan al medio nutrientes necesarios para el desarrollo óptimo de varios microorganismos, además posee cloruro de sodio que le ayuda a mantener el equilibrio osmótico del medio.

DMF. – La N, N – dimetilformamida, es un compuesto químico orgánico, es un líquido incoloro, miscible en agua y en la mayoría de los componentes orgánicos; es comúnmente utilizado como disolvente polar para reacciones químicas y presenta un alto punto de ebullición.

Grafito. – Material constituido por un alto número de placas superpuestas de grafeno en forma de cristales débilmente unidas.

Monocatenario. – Se refiere a que está formado por una sola cadena de nucleótidos, en lugar de una doble hélice por la que están formados los virus generalmente.

Nonilfenol. – Coadyuvante utilizado principalmente dentro de la fabricación de productos de limpieza, resinas, pesticidas, entre otros, también es utilizado en la síntesis de etoxilados de nonilfenol que de igual manera son utilizados en productos de limpieza, pasta de papel, textiles sintéticos y naturales, cueros, aditivos de pinturas de látex y plaguicidas, tiene una consistencia química viscosa

entre amarillo e incoloro que presenta un olor característico, es prácticamente insoluble en agua, pero es miscible con varios solventes orgánicos.

Patogenicidad. – Es la capacidad que tiene un agente infeccioso de producir enfermedad en un huésped que es susceptible o está inmunodeprimido.

Transistor. – Es un componente electrónico que está conformado por materiales de semiconductores, son de pequeñas dimensiones y con múltiples funcionalidades.

Tryptic Soy Agar (TSA). – Es un medio de cultivo de uso general para ensayos microbiológicos, favorece el crecimiento de microorganismos de todo tipo, tanto exigentes, moderadamente exigentes como no exigentes. En la microbiología clínica puede ser utilizado para el cultivo de cepas bacterianas.

Unidades Formadoras de Colonias (UFC). - Describe las actividades microbiológicas que pueden estar presentes en un medio de cultivo; también se define como una o varias células que crecen hasta formar una sola colonia visible, su unidad de medida es UFC/mL.

BIBLIOGRAFÍA

ALÓS, Juan. “Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global”. *ELSIEVER* [en línea]. 2015, (España) 33 (10), pp. 692-699, [Consulta: 22 mayo 2020]. ISSN 0213-005X. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-pdf-S0213005X14003413>

ÁLVAREZ FRAGA, Leopoldo. Materiales híbridos grafeno-metal para detección óptica (Trabajo de titulación). (Doctoral) Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España. 2017. pp. 8. [Consulta: 22 mayo 2020]. Disponible en: <https://repositorio.uam.es/handle/10486/683532>

ALVEZ DA SILVA, Carina; et al. “Revisión Sistemática sobre la toxicidad derivada de la exposición al Grafeno”. *Medicina y Seguridad del Trabajo*. [en línea]. 2018, (España), 64(250), pp. 75-88, [Consulta: 26 julio 2020]. ISSN 1989-7790. Disponible en: <http://scielo.isciii.es/pdf/mesetra/v64n250/0465-546X-mesetra-64-250-00075.pdf>

AMOR GARCÍA, Mario. Grafeno: Bibliografía de un material (Trabajo de titulación) (Doctoral). [En línea] Facultad de Filosofía, Universidad Nacional de Educación a Distancia, (España). 2017. [Consulta: 30 julio de 2020]. Disponible en: <http://e-spacio.uned.es/fez/view/bibliuned:grado-Filosofia-Filosofia-Mamor>

BOUCHAREB, Samir; et al. “Noncovalent functionalization of graphene oxide using self-assembly of silver-triphenylphosphine for bactericidal formulations”. *Materials Chemistry and Physics*. [en línea]. 2020, (Suiza) [Consulta: 30 mayo 2020]. ISSN 0254-0584. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0254058419314087>

CALDERÓN ROJAS, Germán & AGUILAR ULATE, Leidy, “Resistencia Antimicrobiana: Microorganismos Más Resistentes Y Antibióticos Con Menor Actividad”, *Revista Médica de Costa Rica y Centro América*, [en línea]. 2016, (Costa rica), 73(621), pp. 757-763, [Consulta: 24 julio 2020]. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=69870>

CALLE CARDEÑO, Lukas & LONDOÑO, Martha, “Síntesis verde de nanopartículas de plata mediante el uso del ajo (*Allium sativum*)”, *Revista Soluciones de Postgrados EIA*, [en línea]. 2014, (Colombia), 12, pp. 129 - 140, [Consulta: 15 diciembre 2020]. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=69870>

CAMACHO POLO, Jesús & DESCHAMPS MERCADO, Luis. Síntesis de nanopartículas de plata y modificación con pulpa de papel para aplicación antimicrobial (Trabajo de titulación) (Doctoral). [En línea] Facultad de Ingeniería, Universidad de Cartagena, (Colombia). 2013. [Consulta: 28 noviembre de 2020]. Disponible en: <https://repositorio.unicartagena.edu.co/handle/11227/73>

CANET, Juan J. “*Escherichia coli*: características, patogenicidad y prevención (I)” [blog]. 2016. [Consulta: 16 enero 2021]. Disponible en: <https://www.betelgeux.es/blog/2016/01/19/escherichia-coli-caracteristicas-patogenicidad-y-prevencion-i/>

CASAL, M; et al. “Investigación de las resistencias a antimicrobianos en *Enterococcus faecalis*”. *Rev Esp Quimioter*, 22(3). 2009, p. 117 - 119. [Consulta: 16 enero 2021]. Disponible en: <http://www.seq.es/seq/0214-3429/22/3/casal.pdf>

CERCENADO, Emilia. “*Enterococcus*: resistencias fenotípicas y genotípicas y epidemiología en España”. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. [en línea]. 2011, (Madrid - España) 29(Supl 5), pp. 59 - 65, [Consulta: 08 enero 2021]. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/ccs-2010-bacteriologia.pdf>

COBOS, Mónica; et al. “Graphene Oxide–Silver Nanoparticle Nanohybrids: Synthesis, Characterization, and Antimicrobial Properties”. *Nanomaterials*. [en línea]. 2020, (Basilea-Suiza) 10(376), pp. 2-22, [Consulta: 08 julio 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7075288/>

DÍAZ, Marilyn; et al. “Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad”. *Revista cubana de higiene y epidemiología*. [en línea]. 2010, (Cuba), 48(2), pp. 147 - 161, [Consulta: 22 enero 2021]. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/hie/v48n2/hie06210.pdf>

FLORES, Constanza. Nanopartículas de plata con potenciales aplicaciones en materiales implantables: síntesis, caracterización fisicoquímica y actividad bactericida (Trabajo de titulación) (Doctoral). [En línea] Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de la Plata, (Argentina). 2014. [Consulta: 28 diciembre de 2020]. Disponible en: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/34946/Documento_completo.%20Flores%20%20A%20rea%20Qu%20C3%20ADmica.pdf?sequence=1&isAllowed=y

GAGO, Israel; et al. “Introducción al estudio de las propiedades antibacterianas del grafeno”. *Revista de Pensamiento Estratégico y Seguridad CISDE*. [en línea]. 2016, (Cartagena-España), 1(2), pp. 87-94, [Consulta: 22 mayo 2020]. Disponible en: https://redib.org/Record/oai_articulo1243290

GALLO RAMÍREZ, Juan Pablo & OSSA OROZCO, Claudia Patricia. “Fabricación y caracterización de nanopartículas de plata con potencial uso en el tratamiento del cáncer de piel”. *Ingeniería y Desarrollo*. [en línea]. 2019, (Medellín-Colombia), 1(37), pp. 88-104, [Consulta: 13 marzo 2021]. ISSN 2145-9371. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/inde/v37n1/2145-9371-inde-37-01-00088.pdf>

GIL MÓNICA D. DE M. “*Staphylococcus aureus*: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a meticilina”. *Rev Chil Infect*. [en línea]. 2000, (Chile), 12(17), p. 145. [Consulta: 22 mayo

2020]. ISSN 0716-1018. Disponible en:
https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182000000200010

GÓMEZ, Arley. “Nanomedicina y su impacto en la práctica médica”. *Repertorio de Medicina y Cirugía*. [en línea]. 2017, (España) 26 (3), pp. 129-130, [Consulta: 25 junio 2020]. ISSN 0121-7372. Disponible en:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S012173721730078X?via%3Dihub>

GUERRERO CONTRERAS, Jesús. Síntesis de óxido de grafeno como plataforma nanoscópica para materiales funcionales (Trabajo de titulación) (Doctoral). [En línea] Instituto Politécnico Nacional, (Tamaulipas - México). 2015. [Consulta: 20 julio de 2020]. Disponible en:
<https://tesis.ipn.mx/handle/123456789/14714>

GRAPHENANO. “*El grafeno: propiedades y aplicaciones*” [blog]. 2017. [Consulta: 16 julio 2020]. Disponible en: <https://www.graphenano.com/uploads/2017/11/Que-es-el-grafeno.pdf>

HORNA QUINTANA, Gertrudis; et al. “Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas”. *Revista Médica Hered.* [en línea]. 2005, 16(1), pp. 39-45, [Consulta: 21 julio 2020]. ISSN 1018-130X. Disponible en:
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X2005000100007

HOSSAIN, Kaizar; et al. *Graphene-Based Nanotechnologies for Energy and Environmental Applications*. [en línea]. Mohammad Jawaid and Akil Ahmad and David Lokhat, 2019. [Consulta: 21 julio 2020]. Disponible en:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128158111000168?via%3Dihub>

JIMÉNEZ HIDALGO, Moisés Eduardo “Grafeno” [blog]. México: Instituto de Ciencias Nucleares, UNAM, 2017. [Consulta: 25 julio 2020]. Disponible en:
https://bigbang.nucleares.unam.mx/~jimenez/FAMC/TrabajosFAMC2017/Jim%20C3%A9nezHidalgoM_Grafeno.pdf

LEYVA GÓMEZ, Gerardo. “Nanopartículas de plata: tecnología para su obtención, caracterización y actividad biológica”. *Investigación en Discapacidad*. [en línea]. 2013, (México) 2 (1), pp. 18-22, [Consulta: 10 noviembre 2020]. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=40366>

LÓPEZ VARGAS, Jaime Alberto & ECHEVERRI TORO, Lina María. “*K. pneumoniae*: ¿La nueva “superbacteria”? Patogenicidad, epidemiología y mecanismos de resistencia”. *IATREIA*. [en línea]. 2010, (Venezuela), 23(2), pp. 157 - 165, [Consulta: 12 enero 2021]. Disponible en:
<http://www.scielo.org.co/pdf/iat/v23n2/v23n2a7.pdf>

MAGUIÑA, Ciro; et al. “Uso adecuado y racional de los antibióticos”. *Acta Med Per.* [en línea]. 2016, (Perú) 23 (1), pp. 15-20, [Consulta: 10 junio 2020]. ISSN 1728-5917. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1728-59172006000100004

MALBRÁN, Carlos G. “Método de Determinación de Sensibilidad Antimicrobiana por Dilución. MIC Testing”. *Servicios Antimicrobianas-INEI.* [en línea]. 2012, 32(2), pp. 1-48, [Consulta: 31 julio 2020]. Disponible en: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/04-DETERMINACION-DE-LA-SENSIBILIDAD-METODO-DE-DILUCION-2012.pdf>

MAO, Liang; et al. “Biodistribution and toxicity of radio-labeled few layer graphene in mice after intratracheal instillation”. *Particle and Fibre Toxicology.* [en línea]. 2016, 13(7), pp. 1-12, [Consulta: 26 julio 2020]. ISSN 1743-8977. Disponible en: <https://particleandfibretoxicology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12989-016-0120-1>

MAVANI, Kandarp & SHAH, Mihir. “Synthesis of Silver Nanoparticles by using Sodium Borohydride as a Reducing Agent”. *International Journal of Engineering Research & Technology.* [en línea]. 2013, 2(3), pp. 1 - 5, [Consulta: 27 enero 2021]. ISSN 2278 - 0181. Disponible en:

https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/48172135/V2I3-IJERTV2IS3605.pdf?1471605997=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DSynthesis_of_Silver_Nanoparticles_by_usi.pdf&Expires=1614024284&Signature=QQIZmxW4aDQsQtJJ8vx7OUmbfvS3Fa-KjP1-xsffPx9n7m9iQQhyRd8YjHZp1D3BKKEqITp7ox79QV5~dR4Dcq4VpkP03lft3Yj-he5jeID0XKVVxOTe7EEHAfN1LKq6~DRn4Pr15wcSLMfdVtOGcLH71KhbeSrbOMrfkMEQ7TF5o9Um8ou~NANteHBwsJ65UeCDyLOUF494lrsLNmnzIN0-2EMDshHbt~Gh2Tfi~fYNLrdKM9amorjYbD7HowWcvUI-HhSt5mFpFNuorv2AmGhGobcOLadJeUJtBos-Jc3hnLAcfaaPqW04EziXYK0pcICh3Q6vbuaedOyK6H-BuA__&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA

MOKKAPATI VRSS; et al. “Bacterial response to graphene oxide and reduced Graphene oxide integrated in agar plates”. *R. Soc. open sci.* [en línea]. 2018, (Suecia) 5, pp. 1-10, [Consulta: 20 mayo 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6281925/>

MOSQUITO, Susan; et al. “Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea”. *Rev. Perú Med Exp Salud Pública.* [en línea]. 2011, (México) 28(4), pp. 648 - 56, [Consulta: 20 diciembre 2020]. Disponible en: <https://www.scielosp.org/pdf/rpmesp/2011.v28n4/648-656/es>

PATLOLLA, Anita; et al. “Toxicity Evaluation of Graphene Oxide in Kidneys of Sprague-Dawley Rats”. *Environmental Research and Public Health.* [en línea]. 2016, (EE. UU) 13(4), pp 380,

[Consulta: 26 julio 2020]. ISSN 1660-4601. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1660-4601/13/4/380>

PAZ ORTEGA, Irene. EL GRAFENO Posibilidades del Grafeno en la Arquitectura (Trabajo de titulación) (Doctoral). [En línea] Escuela Técnica Superior de Arquitectura de Madrid, (Madrid - España). 2018. [Consulta: 14 julio de 2020]. Disponible en: http://oa.upm.es/49708/1/TFG_Paz_Ortega_Irene.pdf

PAZ ZARZA, Víctor Manuel; et al. “*Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria”. *Rev Chilena Infectol.* [en línea]. 2019, (CDMX - México), 36(2), pp. 180-189, [Consulta: 12 enero 2021]. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v36n2/0716-1018-rci-36-02-0180.pdf>

PÉREZ CANO, Héctor Javier & ROBLES CONTRERAS, Atzín, “Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana”, *Revista Médica MD*, [en línea] 2013, (Guadalajara-México), 4(3), pp. 186-191, [Consulta: 24 julio 2020]. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=41421>

PÍREZ, M, MOTA, M. *Temas de Bacteriología y Virología Médica.* [en línea]. 2° edición. Uruguay: Oficina del Libro FEFMUR, 2006. [Consulta: 03 enero 2021]. Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/MorfologiayEstructuraBacteriana.pdf>

REAL, Cristina. “Grafeno: el material más versátil al servicio de la salud”. *SANIDAD DM.* [en línea]. 2014, pp. 15, [Consulta: 25 junio 2020]. Disponible en: <http://www.nanomedicinelab.com/wp-content/uploads/2014/10/DIARIOMEDICO-SANIDAD.pdf>

RODRIGUEZ, Guadalupe A. “Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*”. *Salud Publica Mex.* [en línea]. 2002, (México) 44(5), pp 460 - 475, [Consulta: 26 diciembre 2020]. ISSN 1660-4601. Disponible en: https://www.adiveter.com/ftp_public/E.coli.pdf

RODRIGUEZ GONZÁLEZ, Claramaría & VASILIEVNA KHARISSOVA, Oxana. “Propiedades y aplicaciones del grafeno”. *Ingenierías.* [en línea]. 2008, (México) 38(11), pp 17 - 23, [Consulta: 26 febrero 2021]. Disponible en: http://eprints.uanl.mx/10375/1/38_propiedades.pdf

RODRÍGUEZ VILLALÓN, Alba. Grafeno: Síntesis, propiedades y aplicaciones biomédicas (Trabajo de titulación) (Doctoral). [En línea] Universidad Complutense, (Madrid - España). 2016. [Consulta: 16 julio de 2020]. Disponible en: <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/ALBA%20RODRIGUEZ%20VILLALON.pdf>

SALDIVAR, Carlos. “El Grafeno. Propiedades y aplicaciones”. *UCA.* [en línea]. 2014, pp. 1-17, [Consulta: 14 julio 2020]. Disponible en: <http://jeuazarru.com/wp-content/uploads/2014/10/grafeno.pdf>

SEJÍA, V. *Temas de Bacteriología y Virología Médica*. [en línea]. 2° edición. Uruguay: Oficina del Libro FEFMUR, 2006. [Consulta: 03 enero 2021]. Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/MorfologiayEstructuraBacteriana.pdf>

SHAOBIN, Liu; et al. “Antibacterial Activity of Graphite, Graphite Oxide, Graphene Oxide, and Reduced Graphene Oxide: Membrane and Oxidative Stress”. *ACS Nano*. [en línea]. 2011, (Corea) 5(9), pp. 6971 - 6980, [Consulta: 25 mayo 2021]. ISSN 1936-0851. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/nn202451x>

SITANSU SEKHAR, Nanda; et al. “Study of antibacterial mechanism of graphene oxide using Ramanspectroscopy”. *Scientific Reports*. [en línea]. 2016, (Corea) 6(28443), pp. 1-12, [Consulta: 30 julio 2020]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/srep28443>

SUNDOS SULEMAN, Ismail Abdalla; et al. “Antimicrobial activity of multifaceted lactoferrin or graphene oxide functionalized silver nanocomposites biosynthesized using mushroom waste and chitosan”. *RSC Adv*. [en línea]. 2020, (Reino Unido) 10, pp. 4969 - 4983, [Consulta: 30 enero 2021]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1039/C9RA08680C>

TANG, Jia; et al. “Graphene Oxide–Silver Nanocomposite as a Highly Effective Antibacterial Agent with Species-Specific Mechanisms”. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. [en línea]. 2013, 5 (9), 3867 – 3874, [Consulta: 18 mayo 2021]. ISSN 1944-8244. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/am4005495>

TENE, Talia; et al. “Toward Large – Scale Production of Oxidized Graphene”. *nanomaterials*. [en línea]. 2020, (Basel - Suiza) 279(10), pp 2 - 11, [Consulta: 26 enero 2021]. ISSN 2079-4991. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2079-4991/10/2/279>

URCUYO, Roberto; GONZÁLES, Diego; CORDERO, Karla. “Perspectivas y aplicaciones reales del grafeno después de 16 años de su descubrimiento”. *Rev. Colombia. Química*. [en línea]. 2021, 50(1), pp. 51 - 85, [Consulta: 22 abril 2021]. ISSN 2076-3417. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2076-3417/9/12/2539>

VACACELA GÓMEZ, Cristian; et al. “Preparation of Few-Layer Graphene Dispersions from Hydrothermally Expanded Graphite”. *Applied Sciences*. [en línea]. 2019, 2539(9), pp. 1 - 8, [Consulta: 22 enero 2021]. ISSN 2357 - 3791. Disponible en: <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v50n1.90134>

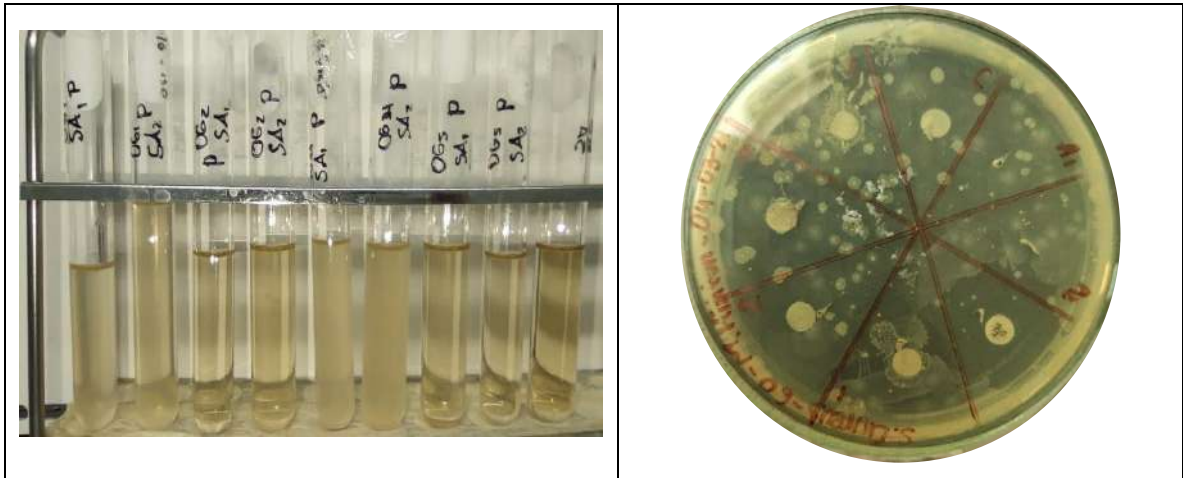
YOUSEFI, Mohammadreza; et al. “Anti-bacterial activity of graphene oxide as a new weapon nanomaterial to combat multidrug-resistance bacteria”. *Materials Science and Engineerin*. [en línea]. 2017, (Irán) 74, pp. 568-581, [Consulta: 24 julio 2020]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28254332/>

ZENDEJAS MANZO, Guadalupe; et al. “Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación”. *Rev Biomed.* [en línea]. 2014, (México) 25, pp. 129 – 143, [Consulta: 03 enero 2021]. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2014/bio143d.pdf>

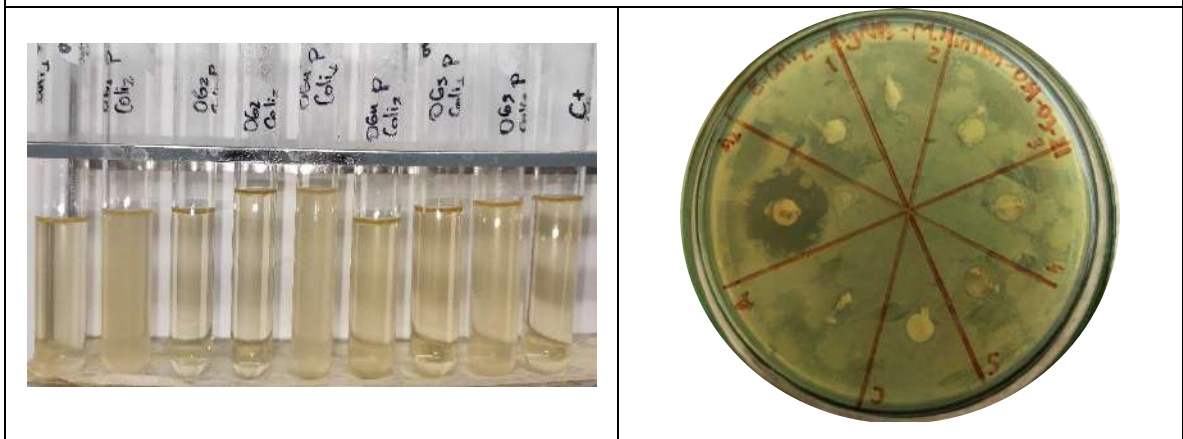
ZOU, Xuefeng; et al. “Mechanisms of the Antimicrobial Activities of Graphene Materials”. *J. Am. Chem. Soc.* [en línea]. 2016. 138(7), pp 2064 - 2077, [Consulta: 31 marzo 2021]. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jacs.5b11411>

ANEXOS

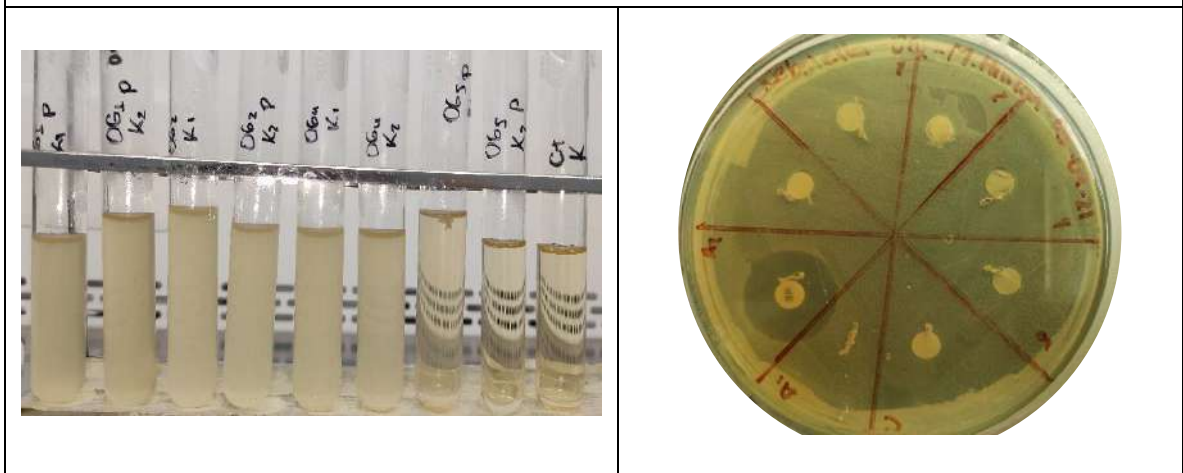
ANEXO A. CIM DE ÓXIDO DE GRAFENO.



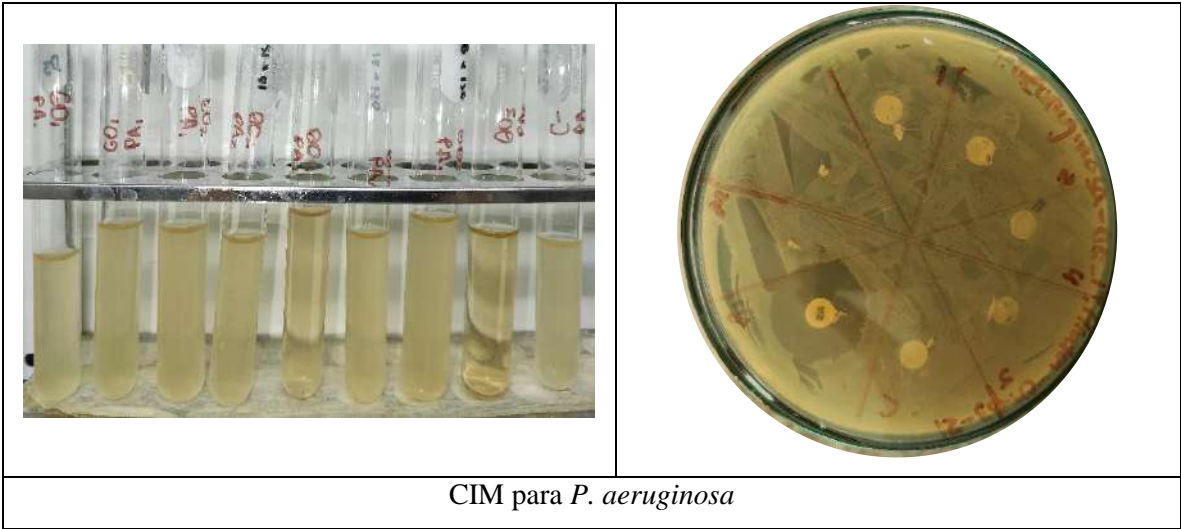
CIM para *S. aureus*



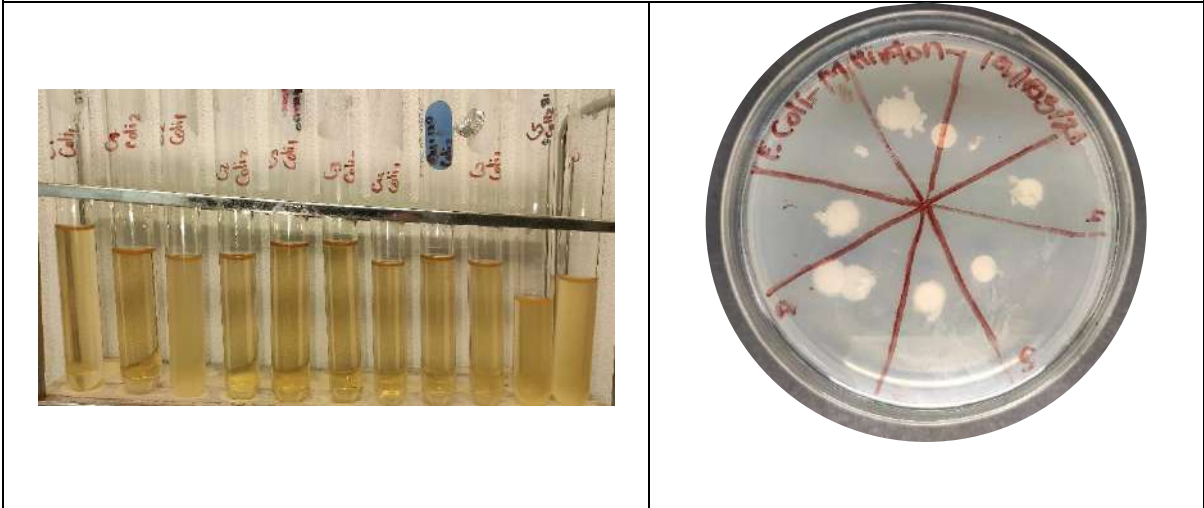
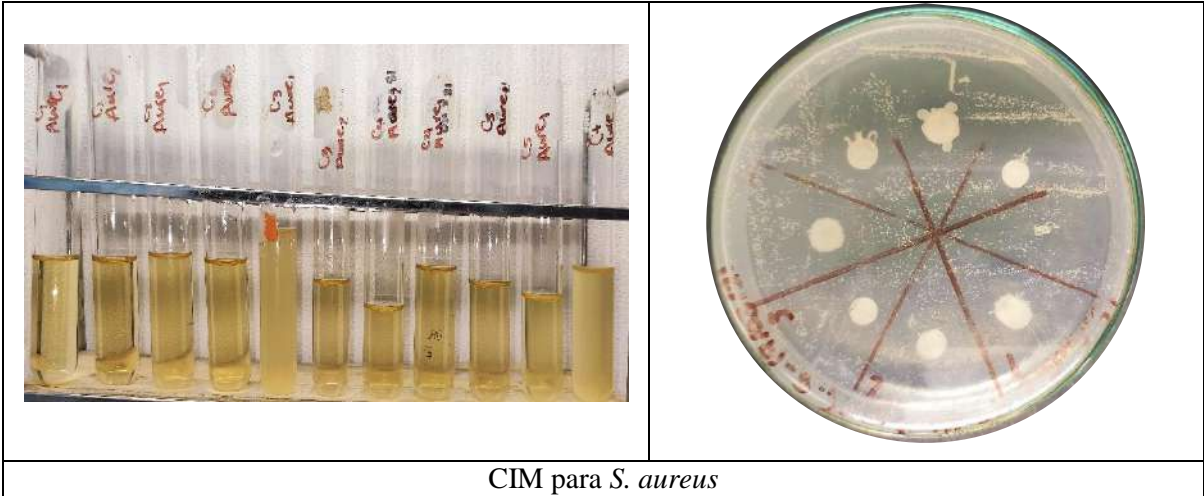
CIM para *E. coli*

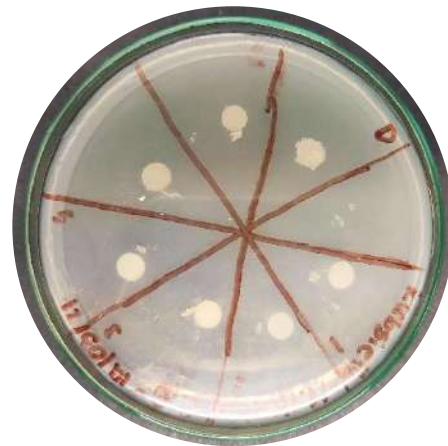
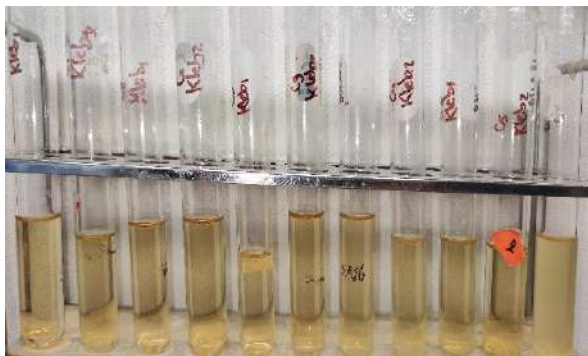


CIM para *K. pneumoniae*

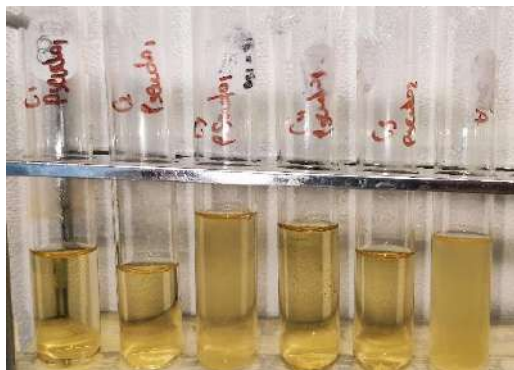


ANEXO B. CIM DE COPOS DE POCAS CAPAS DE GRAFENO.



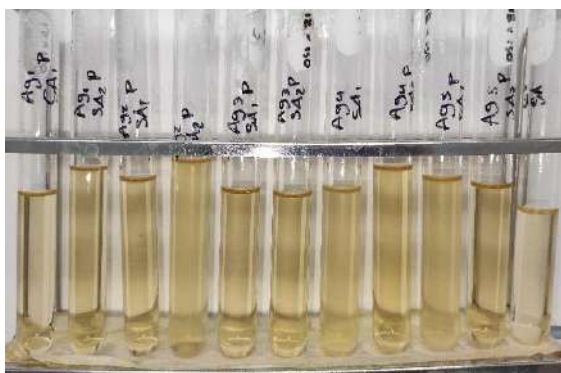


CIM para *K. pneumoniae*

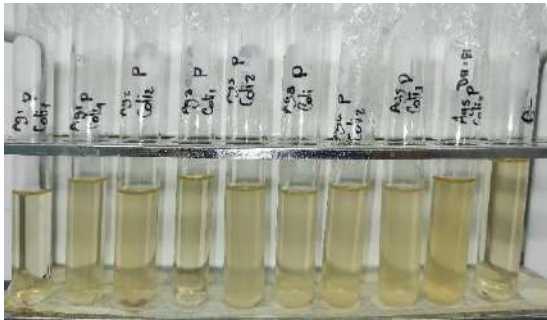


CIM para *P. aeruginosa*

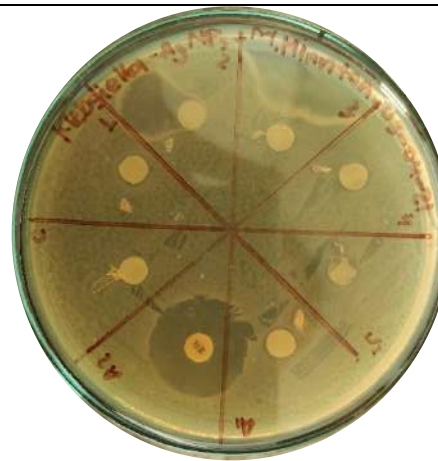
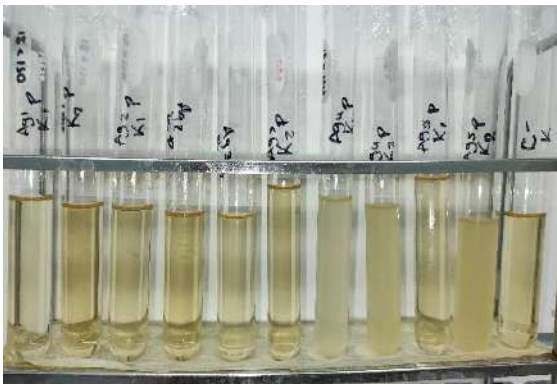
ANEXO C. CIM DE OG - AG



CIM para *S. aureus*



CIM para *E. coli*



CIM para *K. pneumoniae*

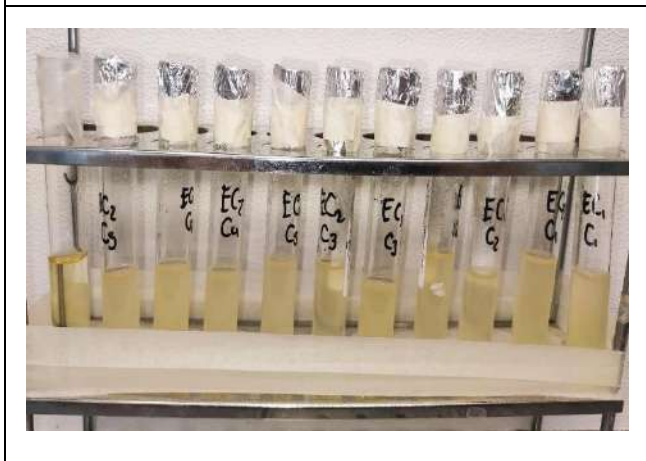


CIM para *P. aeruginosa*

ANEXO D. CIM PARA CPCG CON NONILFENOL



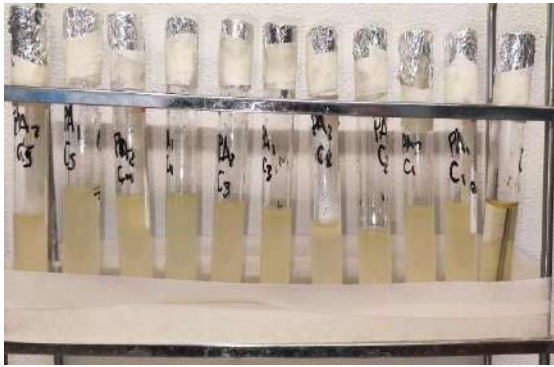
CIM para *S. aureus*



CIM para *E. coli*



CIM para *K. pneumoniae*



CIM para *P. aeruginosa*

ANEXO E. ANOVA Y TEST DE TUKEY PARA ÓXIDO DE GRAFENO.

```
RStudio
File Edit Code View Plots Session Build Debug Profile Tools Help
Go to file/function | Adkins
ANOVA_OG.R ANOVA_OG
1 # Introducción de los datos
2
3 # Introducción de los datos
4 library(readxl)
5 ANOVA_OG <- read_excel("C:/Users/Usuario/Desktop/P/ANOVA_OG.xlsx")
6 View(ANOVA_OG)
1:1 (Top Level)
R Script
Console Terminal Jobs
> # Introducción de los datos
> library(readxl)
> ANOVA_OG <- read_excel("C:/Users/Usuario/Desktop/P/ANOVA_OG.xlsx")
> View(ANOVA_OG)
>
```

	Especie	Dilución	Medición
1	E. coli	0.032	0.10
2	K. pneumoniae	0.032	0.10
3	P. aeruginosa	0.032	0.00
4	S. aureus	0.032	0.00
5	E. coli	0.062	0.10
6	K. pneumoniae	0.062	0.20
7	P. aeruginosa	0.062	0.00
8	S. aureus	0.062	0.00
9	E. coli	0.125	0.10
10	K. pneumoniae	0.125	0.20
11	P. aeruginosa	0.125	0.00
12	S. aureus	0.125	0.00
13	E. coli	0.250	0.10
14	K. pneumoniae	0.250	0.20
15	P. aeruginosa	0.250	0.00
16	S. aureus	0.250	0.09
17	E. coli	0.500	0.20
18	K. pneumoniae	0.500	0.30
19	P. aeruginosa	0.500	0.00
20	S. aureus	0.500	0.10

Showing 1 to 20 of 20 entries, 3 total columns

```

7
8 # ANOVA
9 attach(ANOVA_OG)
10 names(ANOVA_OG)
11 str(ANOVA_OG)
12
13 Especie_trat <- factor(Especie)
14 Dilución_bloq <- factor(Dilución)
15
16 Modelo.OG <- lm(Medición~Especie_trat+Dilución_bloq)
17 ANOVA.OG <- aov(Modelo.OG)
18 summary(ANOVA.OG)
19
8:1 (Top Level)
R Script

```

```

~ /
Console Terminal Jobs
> # Introducción de los datos
> library(readxl)
> ANOVA_OG <- read_excel("C:/Users/Usuario/Desktop/P/ANOVA_OG.xlsx")
> view(ANOVA_OG)
> # ANOVA
> attach(ANOVA_OG)
> names(ANOVA_OG)
[1] "Especie" "Dilución" "Medición"
> str(ANOVA_OG)
tibble [20 x 3] (S3: tbl_df/tbl/data.frame)
 $ Especie : chr [1:20] "E. coli" "K. pneumoniae" "P. aeruginosa" "S. aureus" ...
 $ Dilución: num [1:20] 0.032 0.032 0.032 0.032 0.062 0.062 0.062 0.062 0.125 0.125 ...
 $ Medición: num [1:20] 0.1 0.1 0 0 0.1 0.2 0 0 0.1 0.2 ...
> Especie_trat <- factor(Especie)
> Dilución_bloq <- factor(Dilución)
> Modelo.OG <- lm(Medición~Especie_trat+Dilución_bloq)
> ANOVA.OG <- aov(Modelo.OG)
> summary(ANOVA.OG)
Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Especie_trat 3 0.11902 0.03967 29.643 7.85e-06 ***
Dilución_bloq 4 0.02282 0.00571 4.263 0.0225 *
Residuals 12 0.01606 0.00134
---
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>

```

```

19
20 # TUKEY HSD
21 library(agricolae)
22 Especie.OG <- HSD.test(y=ANOVA.OG, trt = "Especie_trat", group = T, console = T)
23 plot(Especie.OG, main = "Prueba de Tukey HSD: óxido de Grafeno")
24

```

20:1 (Top Level) R Script

Console Terminal Jobs

```

> # TUKEY HSD
> library(agricolae)
warning message:
package 'agricolae' was built under R version 4.0.2
> Especie.OG <- HSD.test(y=ANOVA.OG, trt = "Especie_trat", group = T, console = T)

Study: ANOVA.OG ~ "Especie_trat"

HSD Test for Medición

Mean Square Error: 0.001338333

Especie_trat, means

      Medición      std r Min Max
E. coli      0.120 0.04472136 5 0.1 0.2
K. pneumoniae 0.200 0.07071068 5 0.1 0.3
P. aeruginosa 0.000 0.00000000 5 0.0 0.0
S. aureus    0.038 0.05215362 5 0.0 0.1

Alpha: 0.05 ; DF Error: 12
Critical value of Studentized Range: 4.19866
Minimum Significant Difference: 0.06869227

Treatments with the same letter are not significantly different.

      Medición groups
K. pneumoniae 0.200 a
E. coli      0.120 b
S. aureus    0.038 c
P. aeruginosa 0.000 c
> plot(Especie.OG, main = "Prueba de Tukey HSD: óxido de Grafeno")
>

```

ANEXO F. ANOVA Y TEST DE TUKEY PARA NANOHÍBRIDO DE ÓXIDO DE GRAFENO CON PLATA.

RStudio

File Edit Code View Plots Session Build Debug Profile Tools Help

Go to file/function Addins

ANOVA_NH.R ANOVA_NH

Source on Save Run Source

```

1 # NANOHÍBRIDO DE GRAFENO Y PLATA
2
3 # Introducción de los datos
4 library(readxl)
5 ANOVA_NH <- read_excel("C:/Users/Usuario/Desktop/P/ANOVA_NH.xlsx")
6 View(ANOVA_NH)

```

20:1 (Top Level) R Script

Console Terminal Jobs

```

> # NANOHÍBRIDO DE GRAFENO Y PLATA
>
> # Introducción de los datos
> library(readxl)
> ANOVA_NH <- read_excel("C:/Users/Usuario/Desktop/P/ANOVA_NH.xlsx")
> View(ANOVA_NH)
>

```

	Especie-NH	Dilución-NH	Medición-NH
1	E. coli	0.180	0.0
2	K. pneumoniae	0.160	0.1
3	P. aeruginosa	0.160	0.0
4	S. aureus	0.160	0.0
5	E. coli	0.310	0.0
6	K. pneumoniae	0.310	0.1
7	P. aeruginosa	0.310	0.0
8	S. aureus	0.310	0.0
9	E. coli	0.625	0.1
10	K. pneumoniae	0.625	0.1
11	P. aeruginosa	0.625	0.0
12	S. aureus	0.625	0.0
13	E. coli	1.250	0.1
14	K. pneumoniae	1.250	0.2
15	P. aeruginosa	1.250	0.1
16	S. aureus	1.250	0.0
17	E. coli	2.500	0.1
18	K. pneumoniae	2.500	0.2
19	P. aeruginosa	2.500	0.1
20	S. aureus	2.500	0.0

Showing 1 to 20 of 20 entries, 3 total columns

```

7
8 # ANOVA
9 attach(ANOVA_NH)
10 names(ANOVA_NH)
11 str(ANOVA_NH)
12
13 EspecieNH_trat <- factor("Especie-NH")
14 DiluciónNH_bloq <- factor("Dilución-NH")
15
16 Modelo.NH <- lm("Medición-NH"~EspecieNH_trat+DiluciónNH_bloq)
17 ANOVA.NH <- aov(Modelo.NH)
18 summary(ANOVA.NH)
19
18:18 (Top Level)
R Script

```

```

~/ #
#
# Introducción de los datos
> library(readxl)
> ANOVA_NH <- read_excel("c:/Users/Usuario/Desktop/P/ANOVA_NH.xlsx")
> view(ANOVA_NH)
# ANOVA
> attach(ANOVA_NH)
> names(ANOVA_NH)
[1] "Especie-NH" "Dilución-NH" "Medición-NH"
> str(ANOVA_NH)
tibble [20 x 3] (S3: tbl_df/tbl/data.frame)
 $ Especie-NH : chr [1:20] "E. coli" "K. pneumoniae" "P. aeruginosa" "S. aureus" ...
 $ Dilución-NH: num [1:20] 0.16 0.16 0.16 0.16 0.31 0.31 0.31 0.31 0.625 0.625 ...
 $ Medición-NH: num [1:20] 0 0.1 0 0 0 0.1 0 0 0.1 0.1 ...
>
> EspecieNH_trat <- factor("Especie-NH")
> DiluciónNH_bloq <- factor("Dilución-NH")
>
> Modelo.NH <- lm("Medición-NH"~EspecieNH_trat+DiluciónNH_bloq)
> ANOVA.NH <- aov(Modelo.NH)
> summary(ANOVA.NH)
              Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
EspecieNH_trat  3  0.052  0.017333   16.000 0.000171 ***
DiluciónNH_bloq  4  0.023  0.005750    5.308 0.010717 *
Residuals      12  0.013  0.001083
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>

```

```
19
20 # TUKEY HSD
21 library(agricolae)
22 Especie.NH <- HSD.test(y=ANOVA.NH, trt = "EspecieNH_trat", group = T, console = T)
23 plot(Especie.NH, main = "Prueba de Tukey HSD: Nanohibrido de Grafeno y Plata")
24
```

20:1 (Top Level) R Script

Console Terminal Jobs

```
> # TUKEY HSD
> library(agricolae)
> Especie.NH <- HSD.test(y=ANOVA.NH, trt = "EspecieNH_trat", group = T, console = T)

Study: ANOVA.NH ~ "EspecieNH_trat"

HSD Test for Medición-NH

Mean Square Error: 0.001083333

EspecieNH_trat, means

      Medición.NH      std r Min Max
E. coli      0.06 0.05477226 5 0.0 0.1
K. pneumoniae 0.14 0.05477226 5 0.1 0.2
P. aeruginosa 0.04 0.05477226 5 0.0 0.1
S. aureus     0.00 0.00000000 5 0.0 0.0

Alpha: 0.05 ; DF Error: 12
Critical value of Studentized Range: 4.19866

Minimum Significant Difference: 0.06180261

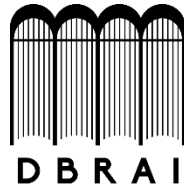
Treatments with the same letter are not significantly different.

      Medición-NH groups
K. pneumoniae 0.14 a
E. coli      0.06 b
P. aeruginosa 0.04 b
S. aureus     0.00 b
> plot(Especie.NH, main = "Prueba de Tukey HSD: Nanohibrido de Grafeno y Plata")
>
```



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

DIRECCIÓN DE BIBLIOTECAS Y RECURSOS PARA EL
APRENDIZAJE Y LA INVESTIGACIÓN



UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 19 / 08 / 2021

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos: : Pamela Monserrath Morales Layedra
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: Facultad de Ciencias
Carrera: Bioquímica y Farmacia
Título a optar: Bioquímica Farmacéutica
f. Analista de Biblioteca responsable: 1557-DBRA-UTP-2021