Para citar o enlazar este recurso, use: http://hdl.handle.net/11191/7488

Casa abierta al tiempo

Universidad Autónoma Metropolitana

Azcapotzalco

DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

Preparación, caracterización y estudios de estabilidad de redes metal orgánicas de plata y su acción bactericida vs *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

Tesis que presenta:

I.Q. Vanessa Celis Arias

Para obtener el grado de Maestra en Ciencias e Ingeniería de Materiales

Asesores:

Dra. Sandra Loera Serna

Dr. Hiram I. Beltrán Conde

Junio 2019

Agradecimientos

A mis asesores la Dra. Sandra Loera Serna y el Dr. Hiram I. Beltrán Conde, por su apoyo para llevar a cabo esta investigación, además de su paciencia, dedicación y amistad.

Al proyecto CONACYT ***660046*** *por el apoyo para realizar esta investigación y una estancia en el Instituto Madrileño de Estudios Avanzados, en Madrid, España.*

Al Dr. José Efraín Garrido Guerrero por su colaboración y apoyo para realizar las pruebas de estabilidad en el Departamento de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV.

Al laboratorio Divisional de Microscopia Electrónica y en especial al ingeniero Fernando Almanza Hernández, por su paciencia y dedicación para obtener las micrografías utilizadas en este proyecto.

A la Dra. Deyanira Ángeles Beltrán, por su colaboración para realizar esta investigación.

Al jurado por su tiempo brindado en la revisión de esta tesis:
El Dr. Enrique Lima Muñoz, el Dr. José Efraín Garrido Guerrero y el Dr. Jorge Luis Flores Moreno.

A la Dra. Patricia Horcajada por su colaboración y apoyo para realizar parte de esta investigación en el IMDEA-Energía.

A Ana Arenas por su apoyo y dedicación para realizar parte de la experimentación de este proyecto en IMDEA- Energía y en la Universidad de Alcalá.

Al Área de Química de Materiales de la UAM-A, por el apoyo para realizar este proyecto.

En especial a mi mami Virginia Arias, a mi hermano Roberto Celis y mi prometido Romeo Ramos por su amor, comprensión, apoyo, por confiar en mí y siempre darme ánimos para seguir adelante.

A todos mis amigos, primos y tíos por siempre brindarme su apoyo, en especial a mi amigo Jonathan Cortes, y mis primos Fernando, Ameyalli y Eduardo.

A todos mis profesores por compartirme sus conocimientos y siempre exigirme para ser mejor.

Resumen

Actualmente la preocupación por el control de epidemias ha incrementado debido a la resistencia que las bacterias han desarrollado a los antibióticos, por lo que desarrollar alternativas que ayuden con esta problemática se ha convertido en una prioridad. Una opción podría ser utilizar materiales que actúen como bactericidas como las redes metal orgánicas (MOF). Las MOF son materiales porosos que pueden ser diseñados mediante la variación de los metales y ligandos, dando como resultado estructuras con diferentes propiedades fisicoquímicas que funcionen en aplicaciones específicas. De acuerdo con lo anterior podrían considerarse candidatas para actuar como agentes bactericidas, debido a i) la liberación de iones o fragmentos de la red de forma lenta o a ii) que el mismo material cuente con dichas propiedades bactericidas *per se*. La plata (Ag^{+}) se conoce por tener propiedades antibacterianas que mejoran cuando ésta se encuentra ionizada y estructurada a nivel micro o nanométrico. Por lo tanto, en el presente proyecto, se sintetizaron redes metal orgánicas de Ag^{+} a partir de los ligandos: ácido bencen-1,4-dicarboxílico (**BDC**), ácido 2,6-naftalendicarboxílico (**NDC**) y ácido 2,6-piridindicarboxílico (**PDC**) en rendimientos de moderados a bajos, 43, 48 y 21 %, respectivamente, y se evaluó el efecto bactericida en las bacterias de las especies *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Todos los materiales fueron caracterizados por microscopia electrónica de barrido (MEB), difracción de rayos X (DRX), Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR), análisis termogravimétrico (ATG) y adsorción de N_2. Todas las MOF presentaron estructura cristalina y tamaños de cristal en el orden de nanómetros, con diferentes propiedades fisicoquímicas, en función del ligando. Adicionalmente, la estabilidad de las MOF: **AgBDC** y **AgNDC** no se ve afectada ya que mantuvieron la estructura cristalina en medio acuoso, mientras que **AgPDC** presentó menor estabilidad en agua perdiendo 20 % de cristalinidad. En contraste, los tres materiales son inestables en soluciones fisiológicas amortiguadoras y en medios de cultivo celular que contienen cloruros (PBS (Phosphate- buffered physiological saline), DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), DMEM + suero fetal bovino y nutrient broth (NB)) y estables en el medio de cultivo NB sin cloro. Finalmente, con la concentración de 20 $mg \cdot L^{-1}$ de **AgBDC** en suspensión se presentó una mayor actividad bactericida sobre *Escherichia coli* comparada con la de *Staphylococcus aureus*. Sin embargo, la actividad de **AgBDC** aumentó y se mantuvo sobre *E. coli* cuando el material está en forma de película o recubrimiento presentando efecto inmediato y prolongado. Dicha película se consideró como un sistema híbrido de tipo **AgBDC**/AgNPs, debido a las reacciones redox que propician la formación de AgNPs a partir de la MOF **AgBDC** en presencia del medio de cultivo. Debido a todo lo anterior, la MOF **AgBDC** se considera un sistema con alto potencial para aplicaciones biológicas, debido a su comportamiento como agente bactericida al instante y persistente.

Abstract

In recent years the concern for the control of epidemics has increased due to the resistance that bacteria have developed to antibiotics. So, developing alternatives that help with this problem has become a priority. One option could be to use materials that act as bactericides such as metal organic frameworks (MOF). MOFs are porous materials that can be designed by varying the metals and ligands, resulting in structures with different physicochemical properties that work in specific applications. According to the above, they could be considered candidates to act as bactericidal agents, due to i) the slow release of ions or fragments of the network or ii) the own properties of the material to be bactericidal *per se*. Silver is known to have antibacterial properties that improve when it is ionized and structured at the micro or nanometric level. Therefore, in the present project, MOFs of Ag^{+} were synthesized from the ligands: benzene-1,4-dicarboxylic acid (BDC), 2,6-naphthalenedicarboxylic acid (NDC) and 2,6-pyridinedicarboxylic acid (PDC) in moderate to low yields ranging, 43, 48 & 21 %, respectively, and the bactericidal effect towards *Staphylococcus aureu*s and *Escherichia coli* was evaluated. All the materials were characterized by scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD), Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), thermogravimetric analysis (ATG) and N_2 adsorption. All prepared MOFs have crystalline structures and crystal sizes in nanometric scale, with varying physicochemical properties as a function of ligand. Additionally, the stability of the MOFs: **AgBDC** and **AgNDC** was not affected since they maintained the crystalline structure in aqueous medium, whereas **AgPDC** presented lower stability in water, losing 20% of crystallinity. In contrast, the three materials are unstable in biological and culture media containing chlorines (PBS (Phosphate buffered physiological saline), DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), DMEM + bovine serum and nutrient broth (NB)) and stable in the NB culture medium without chlorine. Finally, with the concentration of 20 $mg \cdot L^{-1}$ of **AgBDC** in suspension there was a higher bactericidal activity on *Escherichia coli* compared with that of *Staphylococcus aureus.* However, the activity of **AgBDC** increased and remained on *E. coli* when the material is in the form of a film or coating. This film is considered as a hybrid system of **AgBDC**/AgNPs type, due to the redox reactions that form AgNPs starting from **AgBDC** in culture media. Because of all the latter, the **AgBDC** MOF could be considered as a high potential system for biological appliances, due to its behavior as instantaneous and persistent bactericidal agent.

Introducción 1

Justificación 2

Hipótesis 3

Objetivos 3

General 3

Específicos 3

Capítulo 1. Marco teórico 4

1.1. Resistencia bacteriana 4

1.2. Bacterias 5

1.2.1. Staphylococcus aureus 6

1.2.2. Escherichia coli 7

1.3. Propiedades antimicrobianas de la plata 7

1.3.1. Mecanismos de la acción bactericida de la plata 8

1.4. Redes metal orgánicas (MOF) 8

1.4.1. Métodos de síntesis de las redes metal orgánicas 10

1.5. Técnicas de caracterización 11

1.5.1. Microscopia electrónica de barrido (MEB)-Espectroscopia de energía acoplada de rayos X (EDS) 11

1.5.2. Difracción de rayos X 11

1.5.3. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) 12

1.5.4. Análisis termogravimétrico (ATG) 12

1.5.5. Adsorción de N_2 12

1.6. Propiedades de la plata 12

1.7. MOFs de plata 13

1.7.1. Antecedentes de actividad bactericida de las MOF de plata 16

Capítulo 2. Procedimiento experimental 19

2.1. Materiales 19

2.1.1. Reactivos 19

2.1.2. Medios nutritivos 19

2.1.3. Cepas 19

2.2. Técnicas de caracterización 20

2.3. Procedimiento y caracterización 21

2.3.1. MOF AgBDC 21

2.3.2. MOF AgNDC 22

2.3.3. MOF AgPDC 22

2.4. Estabilidad de los materiales 23

2.4.1. Estabilidad estructural 23

2.4.2. Estabilidad coloidal 24

2.5. Actividad bactericida 24

2.5.1. Ensayo en suspensión 24

2.5.2. Ensayo en recubrimiento 25

Capítulo 3. Propiedades físico - químicas 27

3.1. Morfología 27

3.2. Propiedades estructurales 31

3.3. Propiedades espectroscópicas 33

3.4. Estabilidad térmica y propiedades texturales 35

3.5. Comparación de las propiedades fisicoquímicas 39

Capítulo 4. Estabilidad de los materiales en distintos medios 42

4.1. Estabilidad estructural 43

4.2. Estabilidad coloidal 46

4.3. Comparación de los materiales en diferentes medios 47

Capítulo 5. Actividad bactericida 49

5.1. Ensayo en suspensión 49

5.1.1. Staphylococcus aureus 49

5.1.2. Escherichia coli 50

5.2. Ensayos en recubrimiento 52

5.3. Actividad bactericida diferencial entre gram-positivas / gram-negativas debido a MOF AgBDC 59

5.4. Actividad bactericida de MOF AgBDC: suspensión vs recubrimiento 60

Conclusiones generales 62

Referencias 64

Anexo A 68

Introducción

Los nanomateriales que contienen plata se caracterizan por tener actividad antibacteriana debido a la propiedad intrínseca que este metal les brinda [1]. Sin embargo, se ha observado que el efecto aumenta si la plata está presente en forma de ion [1]. Algunos materiales estudiados recientemente con acción bactericida son las nanopartículas y las redes metal orgánicas (*Metal-Organic Frameworks*, MOFs). Las MOF son nanomateriales porosos y cristalinos formados por un catión metálico (M^+) que actúa como ácido de Lewis coordinado con bases de Lewis (o ligandos), que en este caso son moléculas orgánicas. La versatilidad de sus estructuras provenientes de su diseño permite que sean materiales candidatos para regular e inclusive dosificar la liberación de iones o cúmulos metálicos para posibles aplicaciones terapéuticas [2].

Estudios recientes reportaron la actividad bactericida de una MOF de plata, con ligandos bis-carboxílicos (dipodales) con estructuras tridimensionales y con microestructura en forma de barras, sobre dos tipos de bacterias [3]. Este resultado abre la posibilidad de desarrollar una nueva línea de investigación concerniente al desarrollo de MOF de plata con potencial aplicación biocida.

En la actualidad se ha evidenciado que las bacterias están mostrando resistencia ante los antibióticos, hecho que ha incitado a los científicos a investigar sobre moléculas o materiales con potentes y modificadas propiedades antibacterianas [1, 4].

Es con base en las evidencias experimentales de potencial biológico y a la premisa indicada en el párrafo anterior, que este estudio se enfoca en:

i) la síntesis y caracterización de MOF de plata a partir de la variación de los ligandos,
ii) la evaluación del comportamiento de la liberación de iones o cúmulos de plata en medios fisiológicos y de cultivo, y

iii) la evaluación bactericida en dos de las especies de bacterias que han desarrollado resistencia a los antibióticos (*Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*), para

iv) finalmente determinar si se podrían considerar a estos nuevos sistemas como potenciales agentes antibacterianos.

Justificación

La plata es un metal con excelentes propiedades antibacterianas y en especial en forma de ion o nanoestructurada en partículas, por lo que, sintetizar nanomateriales que incluyan este metal y se consiga lixiviar/disociar, podría resultar una estrategia eficiente para la posible aplicación como agentes bactericidas.

El conocimiento que se tiene sobre el comportamiento de la liberación de iones es escaso y más escaso es en el caso de nanopartículas con plata, de modo que, este proyecto es el inicio de un amplio estudio enfocado a desarrollar una potencial aplicación biológica de MOF.

Tomando en cuenta los antecedentes y la justificación aquí plasmadas, en la página siguiente se plantean la hipótesis y los objetivos del trabajo.

Hipótesis

Las MOF de plata sintetizadas empleando diversos ligandos orgánicos tendrán diferentes estructuras, porosidades y perfiles de liberación de iones con potencial aplicación bactericida.

Objetivos

General

Sintetizar y caracterizar redes metal orgánicas de plata variando en tres tipos diferentes los ligandos orgánicos, para su aplicación potencial como bactericidas.

Específicos

- Sintetizar MOFs de plata a partir de los ligandos ácido benceno-1,4-dicarboxílico, ácido 2,6 naftaleno dicarboxílico y ácido 2,6-piridindicarboxílico.
- Caracterizar los materiales por las técnicas de microscopia electrónica de barrido, difracción de rayos X, espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier, análisis termogravimétrico y adsorción de N_2.
- Evaluar la estabilidad y degradación de las MOFs sintetizadas en medio acuoso, en medios fisiológicos (PBS, DMEM y DMEM con 10% de suero fetal bovino) y en medio de cultivo bacteriano *Nutrient Broth*.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de una MOF en suspensión y soportada en película, sobre las especies de bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.
- Determinar si los sistemas de estudio son candidatos potenciales para una aplicación biológica, en particular de tipo bactericida.

Capítulo 1. Marco teórico

1.1. Resistencia bacteriana

En los últimos años se ha incrementado la preocupación por el control de las epidemias causadas por bacterias, debido a la resistencia que éstas han desarrollado a los antibióticos [1, 4]. En el 2014, la OMS (Organización Mundial de la Salud) publicó el primer informe basado en 114 países, acerca de la amenaza que esto significaba en el sector salud y alimenticio [4].

De acuerdo con este informe, el mal uso de los antibióticos en humanos y animales ha provocado que las bacterias adquieran mutaciones en su genoma, que las vuelven resistentes a los fármacos, causando infecciones más difíciles de tratar. En el año 2018, la OMS publicó la primera lista de las bacterias patógenas que necesitan ser tratadas empleando nuevos agentes antibacterianos, entre ellas se encuentran: la *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y *Escherichia coli* [4].

Debido al riesgo que esto provoca, se ha priorizado la investigación en el desarrollo de nuevos antibióticos u otras tecnologías afines como nanomateriales con propiedades antibacterianas que ayuden a atacar o mitigar el problema. Por ejemplo, la plata se ha utilizado en diferentes tratamientos terapéuticos, debido a su propiedad bactericida. Algunos compuestos usados como bactericidas y antisépticos son: plata metálica, sales de plata ($AgNO_3$, AgBr, AgF, etc.), óxidos de plata y plata coloidal [5]. Sin embargo, a pesar de la eficiente acción de la plata, otros estudios reportan los efectos que han presentado los seres humanos al estar en contacto con altas concentraciones y prolongadas exposiciones con plata, entre ellos se encuentran, la Argiria la cual es una enfermedad que provoca una coloración permanente en la piel y en ocasiones sucede en los ojos, y algunos casos de problemas respiratorios, irritaciones intestinales y daños en los riñones [6].

1.2. Bacterias

Los microorganismos son organismos fundamentales de la vida que se encuentran en todo el entorno y participan en procesos como la degradación de materia orgánica y algunos compuestos químicos. Sin embargo, hay algunos microorganismos patógenos que causan enfermedades infecciosas en seres humanos, animales y plantas. De acuerdo con el árbol filogenético de los seres vivos (Figura 1.1), los tres dominios son: Bacteria, Archaea y Eukarya, en donde los primeros dos pertenecen a los organismos con células procariotas y el último a las eucariotas. Las células eucariotas, son complejas por tener organelos (ribosomas, aparato de Golgi, etc.) y un núcleo que contiene el ADN. Existen organismos eucariotas unicelulares, como los protozoarios y hongos, y pluricelulares como los animales, las plantas, los seres humanos. Las células procariotas por otro lado, son células sencillas que no contienen núcleo, como las bacterias [7]**.**

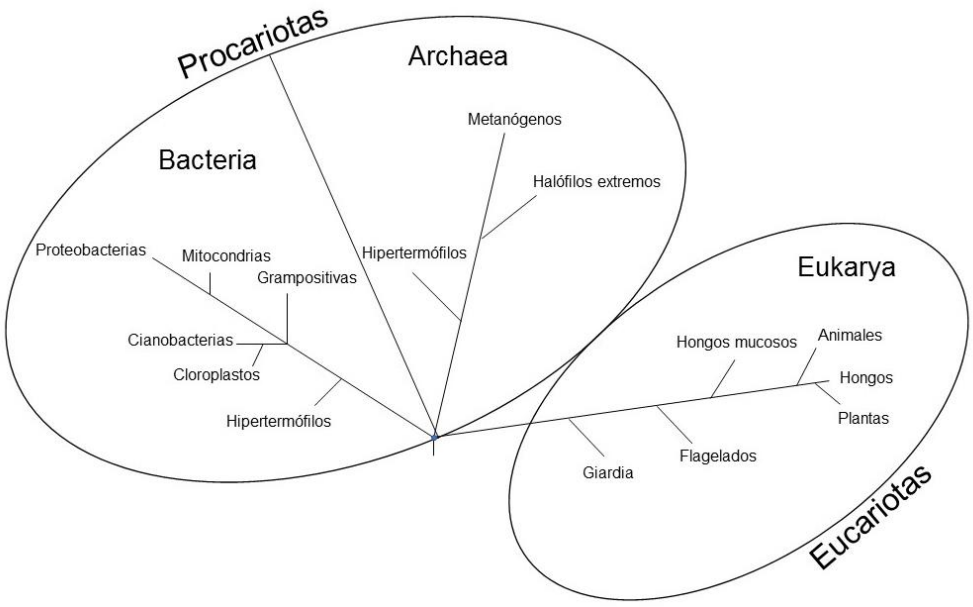


Figura 1.1. Árbol filogenético de los seres vivos.

Las bacterias son microorganismos unicelulares de tamaños microscópicos aproximados entre 0.5 - 3.0 μm. Se encuentran en el medio ambiente y en ocasiones pueden llegar a formar biopelículas sobre superficies, como tuberías, paredes, partes del cuerpo humano, etc. Su reproducción es por fisión binaria (asexual), es decir, se forman dos células a partir de una. Regularmente presentan morfologías

de coco (esférico), bacilo (cilíndrico) y espirilos (bacilos con curvas), dependiendo de cada bacteria. Estas se dividen en dos grupos: grampositivas y gramnegativas. Como se observa en la Figura 1.2 la pared celular de las bacterias grampositivas contiene una capa gruesa de peptidoglicano que rodea la membrana plasmática, mientras que en las gramnegativas la pared es más compleja ya que se constituye por una membrana externa y una capa delgada de peptidoglicano, que rodean la membrana plasmática. Las capas de peptidoglicano son porosas para permitir el acceso de los metabolitos a la membrana plasmática. Éste es un elemento muy importante, ya que participa en la estructura y rigidez, la replicación y la supervivencia de la célula en su hábitat [8].

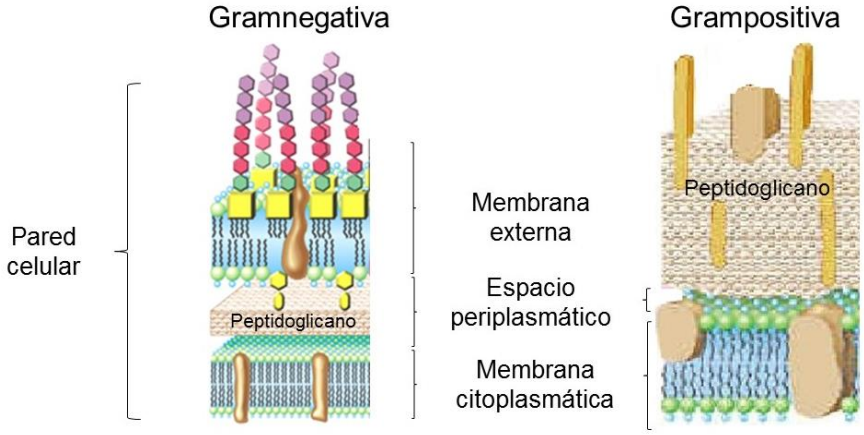


Figura 1.2. Composición de la pared celular de las gramnegativas y grampositivas [7].

1.2.1. Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) es una bacteria grampositiva de las más importantes del género *Staphylococcus*. Son cocos de tamaños entre 0.5 – 1.0 µm de diámetro, los cuales tienden a agruparse y formar racimos de forma irregular. Es una bacteria anaerobia, inmóvil, y regularmente se aloja en la piel y mucosa de individuos de forma latente. Es muy resistente y causa infecciones cutáneas y respiratorias [9].

1.2.2. Escherichia coli

Escherichia coli (E. *coli*) es una bacteria gram negativa con forma de bacilos, con tamaños aproximados de 0.5 μm de ancho por 3.0 μm de largo. Es una bacteria anaerobia resistente a agentes externos. Se encuentran en el medio ambiente y en la mayoría de los seres humanos formando parte de la flora del tubo digestivo. Estas pueden causar infecciones gastrointestinales con diarrea [9].

De acuerdo con la ONU las bacterias descritas anteriormente, han presentado resistencia a ciertos antibióticos, por lo que dada esa importancia fueron seleccionadas para los ensayos bactericidas del presente proyecto.

1.3. Propiedades antimicrobianas de la plata

Durante siglos se ha utilizado la plata en tratamientos de quemaduras, infección de los ojos y desinfección de agua, debido a la propiedad intrínseca bactericida que posee, la cual depende de la concentración y del perfil de liberación. Sin embargo, actualmente se están investigando y diseñando materiales con propiedades bactericidas, vendajes con plata para la curación de heridas, películas o recubrimientos que ayuden a atacar o prevenir las biopelículas formadas por bacterias [10].

En diversas investigaciones se demuestra que la plata presenta alta actividad bactericida. Por ejemplo, Rai *et al.* y Feng *et al.* estudiaron que presuntamente los iones de plata inhibieron el crecimiento de las bacterias *S. aureus* y *E. coli*. Sin embargo, observaron que *S. aureus* es más resistente que la *E. coli* debido a su gruesa pared, la cual protege a la célula de la penetración de la plata [10, 11]. En otro estudio Rai *et al.* y Sondi *et al.*, demostraron la elevada actividad bactericida sobre *S. aureus* y *E. coli*, y encontraron que el efecto depende del tamaño de las nanopartículas, adicionalmente observaron que las nanopartículas interactúan con los componentes de la membrana provocando la muerte de las células de *E. coli* [10, 12]. Finalmente, en otra investigación demostraron que la plata aumentó el efecto bactericida al actuar sinérgicamente con los antibióticos de penicilina G, amoxicilina, eritromicina, clindamicina y vancomicina [10, 13].

1.3.1. Mecanismos de la acción bactericida de la plata

Los mecanismos de acción bactericida de la plata aun no son conocidos con exactitud, sin embargo, existen diferentes autores que proponen posibles procesos de acción. Wyszogrodzka *et al*. mencionan que la plata podría afectar las células bacterianas: i) alterando la pared celular y la membrana plasmática, ii) disminuyendo los niveles de ATP (adenosín trifosfato) provocando el colapso de la membrana, iii) afectando el proceso de replicación del ADN, iv) interaccionando con los grupos tioles, v) perjudicando la función de las proteínas de la membrana y vi) acumulándose en la pared celular, disminuyendo la permeabilidad [14].

En otros estudios, Feng *et al*. y Wilkinson *et al*., propusieron que la plata penetra la pared celular y daña el ADN, convirtiéndolo en una forma condensada, afectando los procesos metabólicos como el de replicación, provocando la muerte de la célula [11, 15].

Finalmente, en otras investigaciones se menciona que la plata interacciona con la membrana plasmática y los grupos tioles (inactivando las proteínas), afectando el proceso de respiración. Adicionalmente, encontraron que los iones de plata afectan el proceso de replicación del ADN, induciendo a la célula a la muerte. En cuanto a las nanopartículas de plata, se sabe que se adhieren y atraviesan la membrana atacando principalmente los procesos de respiración, afectando la replicación del ADN y llevando a la muerte celular [10, 15].

1.4. Redes metal orgánicas (MOF)

Las MOF por sus siglas en ingles "*Metal Organic Frameworks*" son materiales con estructuras cristalinas formadas por al menos un centro metálico (ácido de Lewis) coordinado con moléculas orgánicas (base de Lewis) conocidas como ligandos [16]. Se caracterizan por tener o presentar alta área superficial, buena estabilidad térmica y alta cristalinidad [17]. La variación del número y tipo de centros metálicos y ligandos, generan una enorme diversidad estructural, dando lugar a sistemas 1D, 2D o 3D, con características intrínsecas específicas. Se han empleado casi todos los metales de la tabla periódica, y entre los más estudiados se encuentran Zn^{2+},

Cr^{3+}, Fe^{3+}, Cu^{2+}, Al^{3+}, Ni^{2+}, Zr^{4+}, V^{3+} y Mg^{2+}. En la actualidad, se estudian en aplicaciones como: adsorción y separación de gases, catálisis, dispositivos ópticos, retención y liberación de moléculas biológicamente activas, entre otras [18].

Las estructuras dependen del número de coordinación y de la geometría del metal, así como de la naturaleza fisicoquímica y geométrica de los ligandos. Las uniones entre las partes orgánica e inorgánica forman compuestos de coordinación generando estructuras porosas de diversos tamaños, formas, dimensiones y rigidez [17]. Existen diferentes tipos de ligandos dependiendo del número de sitios de unión disponibles, los cuales se conocen como bidentados, cuando tienen dos sitios básicos, tridentados cuando tienen tres sitios básicos y así sucesivamente. Pero también existe la definición en cuanto a los sitios geométricos que toman estas bases o ligandos en la red, en este caso se consideran bipodales (dos brazos) cuando el ligando ocupa dos sitios en la red, o tripodales (tres brazos) cuando ocupa tres sitios, etc. Los más utilizados son los que tienen anillos aromáticos con carboxilatos, como por ejemplo el ácido tereftálico o *para*-fenilen-dicarboxílico (BDC) y los ácidos naftalendicarboxilicos (NDC). Estos proporcionan rigidez a la estructura, porosidad, estabilidad y conectividad favorable, debido a su alta versatilidad para construir nodos de coordinación con topologías bien definidas. En especial, los NDC forman cavidades más grandes que los de tipo BDC en las redes obtenidas, ya que por naturaleza tienen dimensiones mayores que otros ligandos [18].

Los metales pueden coordinarse con los carboxilatos de los ligandos de forma: i) iónica o no coordinada, ii) monodentado, iii) quelato bidentado y iv) puente bidentado (Figura 1.3). Las vibraciones características de las interacciones de cada tipo, permite identificarlos por medio de un espectro de infrarrojo [19].

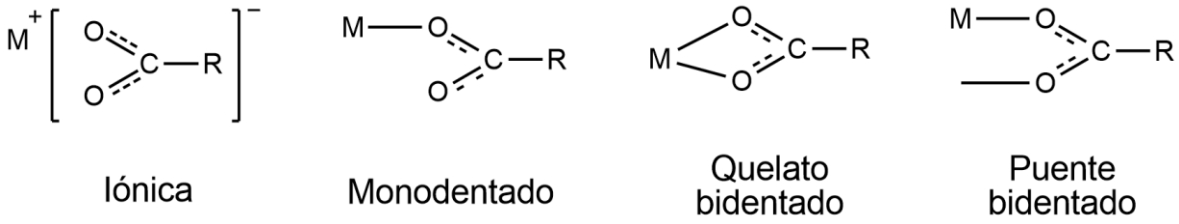


Figura 1.3. Interacciones del metal con los carboxilatos.

1.4.1. Métodos de síntesis de las redes metal orgánicas

Existen diferentes métodos utilizados para sintetizar MOFs. Algunas síntesis más utilizadas son: i) solvotérmica/ hidrotérmica, ii) mecanoquímica, iii) asistida por microondas, iv) electroquímica, v) microfluídica, vi) sonoquímica y vii) temperatura ambiente. En diferentes estudios se ha comprobado que cada método de síntesis puede influir en la morfología, el rendimiento, la estructura, además en los tamaños de partículas y de cristal de los materiales resultantes. En el presente proyecto se obtuvieron los mejores rendimientos mediante síntesis a temperatura ambiente y sonoquímica. Ambas son eficientes, económicas y más amigables con el ambiente. En particular, en la síntesis a temperatura ambiente por metátesis o reacción de doble desplazamiento, la activación del ligando (activación alcalina) es un paso importante para llevar a cabo este tipo de reacción, ya que se utiliza para obtener carboxilatos de sodio los cuales reaccionan fácilmente con las sales metálicas formando compuestos de coordinación y como subproducto CO_2 y la sal de $NaNO_3$, la cual es soluble por lo que no interfiere en la formación de la MOF. Tal como se reportó en la síntesis de la HKUST-1 a temperatura ambiente en donde propusieron la siguiente reacción [2]:

$$Na_3BTC + Cu(NO_3)_2 \rightarrow NaNO_3 + [Cu_3(BTC)_2]$$

Mientras que en la síntesis sonoquímica o por ultrasonido las vibraciones cíclicas interaccionan con el líquido generando variaciones de presiones y formación de burbujas, las cuales crecen, se vuelven inestables y colapsan liberando energía que favorece para la formación de los materiales. Al fenómeno descrito anteriormente se le conoce como cavitación [20, 21].

1.5. Técnicas de caracterización

1.5.1. Microscopia electrónica de barrido (MEB)-Espectroscopia de energía acoplada de rayos X (EDS)

La microscopia electrónica de barrido (MEB), es una técnica que se basa en realizar un barrido en la superficie de la muestra con un haz de electrones. Es decir, los electrones provenientes de un filamento de tungsteno pasan a través de una columna que se encuentra en vacío. En ella el haz es disminuido y enfocado por medio de diferentes lentes sobre la muestra. La señal emitida, es detectada para obtener imágenes de morfología de la superficie de los sólidos, llamadas micrografías [22]. De manera conjunta con MEB se emplea la espectroscopia de energía acoplada (Energy Dispersive Spectroscopy, EDS o también EDX), la cual es una técnica que se utiliza para obtener análisis químicos de los elementos presentes en una muestra.

1.5.2. Difracción de rayos X

En la difracción de rayos X (DRX), se hace incidir un haz de electrones en la muestra, los cuales chocan con los átomos y difractan. Las emisiones son captadas por un detector para obtener un patrón de difracción. Los patrones son huellas dactilares de cada material y se utilizan para identificar los compuestos cristalinos y los parámetros cristalográficos de los materiales [23].

Los tamaños de cristal fueron calculados mediante la ecuación de Scherrer definida como:

$$D = \frac{k\lambda}{B cos\theta}$$

Donde “D” representa el tamaño de cristal (Å), “k” es la constante de Scherrer, usualmente se considera 1, “λ” es la longitud de onda de la radiación de rayos X (Å), “B” es el ancho del pico a media altura y por último “θ” es el ángulo del pico máximo (°) [24].

1.5.3. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR), llamada también espectroscopia vibracional asimétrica, se basa en hacer incidir un haz de luz infrarrojo sobre la muestra, las moléculas vibran debido a esta radiación emitiendo señales que son detectadas, para obtener un espectro e identificar los grupos funcionales presentes [23].

1.5.4. Análisis termogravimétrico (ATG)

El análisis termogravimétrico (ATG) es un análisis donde se registra la pérdida del peso de la muestra en función de un incremento en la temperatura, en una atmósfera controlada. Este análisis permite obtener termogramas, los cuales representan la descomposición térmica y de esta manera se conoce la estabilidad térmica del material [23].

1.5.5. Adsorción de N_2

La adsorción de N_2 es una técnica que permite conocer las propiedades texturales de los materiales. El experimento consiste en desgasificar la muestra para después ponerla en contacto con diferentes presiones del gas, y medir los volúmenes adsorbidos para construir una gráfica, llamada isoterma. Las isotermas se clasifican de acuerdo con la IUPAC y su interpretación permite conocer las características y propiedades superficiales del material [25].

1.6. Propiedades de la plata

La plata es un metal de transición brilloso, maleable y blando, con elevada conductividad eléctrica y térmica y por lo general es inerte. Está ubicado en el grupo 11 de la tabla periódica, con número atómico 47. Tiene lleno el orbital d y un solo electrón en el s, debido a ellos presenta estas propiedades características [26].

Presenta tres estados de oxidación, pero el +1 es su estado más estable. Puede adoptar diferentes números de coordinación entre 2 y 6, siendo el 2 el más común seguido del 4, y el 6 resulta ser el menos usual. Estos números presentan las

geometrías de coordinación siguientes: lineal para el 2, plana trigonal para el 3, tetraédrica para el 4, bipirámide trigonal o pirámide de base cuadrada para 5 y octaédrica para 6. Una de las principales aplicaciones de la plata son las disoluciones coloidales que se utilizan como agentes bactericidas [27].

1.7. MOFs de plata

Las redes metal orgánicas con plata (I) como centro metálico, han comenzado a ser estudiadas en los últimos años, debido a las propiedades fisicoquímicas que han presentado, volviéndolos candidatas para aplicaciones potenciales. A continuación se presentan algunos antecedentes en torno a esta línea de investigación emergente que es importante para la comprensión del objetivo del presente proyecto de investigación.

En 2016 Wu *et al*. sintetizaron MOFs de plata con un ligando pentacarboxílico, dando lugar a $[Ag_2(ddcba)(4,4´\text{-bipy})_2]$ donde ddcba= ácido 3,5-(di(2´,5´-dicarboxilfenil) benzoico y 4,4´-bipy= 4,4´bipiridina, en la cual, sobre el ion de plata interaccionan dos ligandos diferentes, 4,4´-bipy y ddcba [28]. Este compuesto presentó una estructura cristalina en grupo espacial monoclínico, donde la plata es plana trigonal y se encuentra coordinada a dos átomos de nitrógeno de la bipiridina y un átomo de oxígeno del ligando ddcba, tal cual lo estipulan los autores, ver Figura 1.4. En dicha estructura se pueden evidenciar interacciones adicionales sobre los dos átomos de Ag presentes en la unidad asimétrica. Para un átomo de Ag, al menos dos interacciones adicionales se dan lugar, generando una geometría de coordinación pentacoordinada, deformada entre una bipirámide trigonal y una pirámide de base cuadrada. Estas dos interacciones son: i) una más cercana, entre la plata y uno de los oxígenos de carbonilo del ligando ddcba, de 2.98 Å y es menor que la suma de los radios de Van der Waals de Ag y O (∑=3.24 Å). Mientras que también se observa otra interacción, ii) en este caso ligeramente mayor que la suma de los radios de Van der Waals de Ag y N (∑=3.27 Å), de 3.33 Å; a pesar de ser mayor, se observan deformaciones geométricas que dan cuenta de dicha interacción. Mientras que en el otro átomo de Ag se observa al menos una interacción de tipo pi-catión entre un anillo aromático y el centro metálico, sin

embargo, la estructura tiene mucha complejidad para un análisis más profundo, debido a ello los autores solo analizaron las interacciones convencionales. También fue posible determinar que tres de los cinco fragmentos carboxílicos permanecen protonados, pero esto no impide que en los fragmentos C=O se formen enlaces de coordinación, además de puentes de hidrógeno entre: i) carboxilatos coordinados y no coordinados y entre ii) carboxilatos no coordinados con carboxilatos no coordinados, formando una estructura de tipo polímero de coordinación y de tipo supramolecular. Además, encontraron que estos materiales podrían ser utilizados como catalizadores para la degradación de compuestos nitroaromáticos.

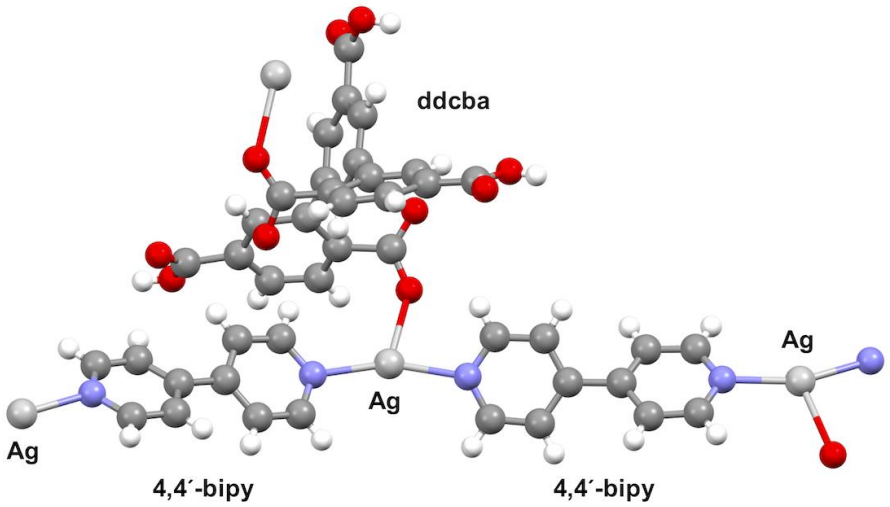


Figura 1.4. Unidad monomérica de la MOF de plata de tipo [Ag_2(ddcba)(4,4´-bipy)$_2$], donde se observan las interacciones convencionales del compuesto.

Adicionalmente, en 2017 Guo *et al*. fabricaron el nanocompósito AgMOF(Ag), en el cual utilizaron el ligando ácido 2-aminotereftalico. El material presentó estructura cristalina y una morfología o microestructura en forma de barras o varillas. Además, en los espectros de infrarrojo se observaron vibraciones en 1342 cm^{-1} (O-C-O), 1071 y 775 cm^{-1} (anillos bencénicos), bandas cercanas a 693 cm^{-1} (grupos -COO) y finalmente vibraciones medio fuertes en 758, 528 y 454 cm^{-1} (O-Ag-O).

En este estudio encontraron que estos materiales podrían utilizarse en la detección de contaminantes en un medio acuoso, ya que, mostraron alto rendimiento de

fluorescencia y una excelente selectividad y sensibilidad para compuestos de tipo 2,4,6-trinitrofenol [29].

Finalmente, en 2014 Lu *et al.* sintetizaron MOFs de plata con los ligandos: ácido 5-hidroxi-isoftálico (HO-H_2IPA) y ácido 3,5 piridindicarboxílico (H_2PYDC). La primera presentó una estructura cristalina triclínica, en donde la plata interacciona con los oxígenos del ligando, 2.22 Å, pero también hay interacciones plata-plata, con dos diferentes distancias de interacción, una de 2.84 Å y la otra de 3.14 Å (Figura 1.5); mientras que la segunda MOF presentó una estructura en el grupo espacial ortorrómbico. Como se muestra en la Figura 1.6, hay tres interacciones de la plata, la primera es con los oxígenos pertenecientes al ligando, 2.5 Å, la segunda plata-plata, 3.1 Å, y la tercera plata-nitrógeno, con una distancia de enlace plata-nitrógeno de 2.24 Å. Los dos materiales preparados presentaron estructuras tridimensionales y una morfología de barras con un diámetro de 0.3-1.0 μm y una longitud de 3.0-10.0 μm. Además, mostraron estabilidad en medio acuoso y una estabilidad térmica hasta los 220 °C. Reportaron que estos materiales podían regular la liberación de los iones de plata, y de esta manera tener alta y dosificada actividad bactericida, por lo que podrían ser candidatos como agentes antibacterianos [3].

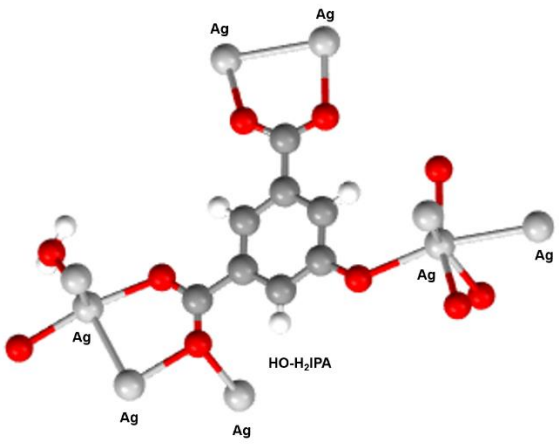


Figura 1.5. Unidad monomérica de la MOF de plata de tipo [Ag_2(O-IPA) (H_2O) · (H_3O)], donde se observan las interacciones convencionales del compuesto.

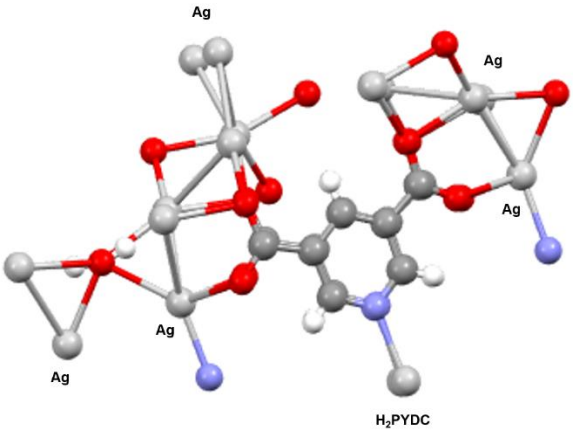


Figura 1.6. Unidad monomérica de la MOF de plata de tipo [Ag_3(PYDC)(OH)], donde se observan las interacciones convencionales del compuesto.

1.7.1. Antecedentes de actividad bactericida de las MOF de plata

Hace algunos años se retomó el interés por los nanomateriales que contienen plata, debido a sus propiedades intrínsecas antimicrobianas [1]. Las nanopartículas de plata (Ag-NP) y las MOF pertenecen al grupo de nanomateriales con actividad antibacteriana. En años recientes se han investigado las MOF, debido al control de liberación de iones que estas pueden tener.

Recientes estudios mencionan que la actividad bactericida de las MOF podría deberse a la presencia de cationes metálicos activos distribuidos en la red, los tamaños nanométricos que suelen tener las partículas y la liberación de componentes activos provocada por la degradación del material. El conjunto de estas características podría favorecer las aplicaciones biomédicas (liberación de fármacos, material quirúrgico, terapia, etc.) o industriales (alimentos, textiles, ventilación, aire acondicionado, productos de construcción, etc.), inhibiendo o previniendo las áreas con bacterias o la formación de biopelículas [14].

En particular, la actividad antibacteriana de la plata depende principalmente de sus iones (Ag^+) y estos han resultado ser más eficientes que la plata metálica. Los nanomateriales que contienen este metal tienen las ventajas de tener menor incidencia a la resistencia bacteriana y pueden utilizarse para controlar la dosificación de iones [1].

A pesar de que las investigaciones sobre las aplicaciones de MOF han aumentado de forma exponencial, existen pocos reportes acerca de las posibles aplicaciones biológicas que estos materiales podrían tener. En la Tabla 1.1 se presentan algunos estudios recientes acerca de las pruebas antibacterianas que se han realizado con nanomateriales de plata.

Varios autores coinciden en la teoría de que las propiedades antibacterianas de las MOF, se debe a la gradual liberación de los iones de Ag^+ debido a la degradación del material. Además, de considerar que la MOF puede actuar como un reservorio de iones que puede proporcionar un efecto de mayor duración [14].

Tabla 1-1. Resumen de las investigaciones recientes de nanomateriales de plata con efecto bactericida.

Material evaluado	Información del material	Microorganismo	Aportación	Ref.
Ag-NP	Forma esférica con diámetros menores a 140 nm	Bacterias: * *Escherichia coli* * *Pseudomonas aeruginosa* * *Salmonella* * *Staphylococcus aureus* * *Steptococcus pyogenes*	Se observó inhibición de las bacterias en los tratamientos que contenían Ag-NP (tanto en forma independiente, como en combinación con antibiótico) en comparación con los tratamientos de referencia. Comprobando la eficiencia del efecto antibacteriano.	[30]
MOF Ag-TAZ (TAZ: 1,2,4-triazol)	Estructura cristalina	Organismos fotosintéticos: * *Anabaena* (filamentoso) * *Synechococcus* (cianobacteria) * *Clamidomonas* (alga)	Los materiales presentaron altas actividades antimicrobianas. Además, estudiaron la biodisponibilidad de los metales disueltos y los compararon con las concentraciones de iones libres, calculadas teóricamente con el programa Visual MINITEQ. Encontraron que las concentraciones detectadas estuvieron cerca a los valores predichos. Los valores teórico y experimental reportados para la plata fueron 0.028 y 0.027± 0.013, respectivamente.	[31]
Ag-NP y MOF: Ag-(HOH_2IPA) Ag-(H_2PYDC)	Estructura cristalina	Bacterias: * *Escherichia coli* * *Staphylococcus aureus*	En comparación con las Ag-NP las MOF tuvieron un efecto bactericida más eficiente con una menor concentración. Las dos MOF liberaron iones, provocando buena actividad antibacteriana.	[3]
[(AgL)NO_3]$\cdot 2H_2O$ [(AgL)CF_3SO_3]$\cdot 2H_2O$ [(AgL-ClO_4]$\cdot 2H_2O$ (L: tris- (4-piridinduril) borano	Estructura cristalina	Bacterias: * *Escherichia coli* * *Staphylococcus aureus*	La MOF presentó alta actividad bactericida para ambas bacterias, Evaluaron el efecto durante 7 meses, encontrando que la actividad se mantiene para *Staphylococcus aureus* y disminuye ligeramente para *Escherichia coli.* Adicionalmente, atribuyen la liberación constante y prolongada, dependiendo de la red y el ligando seleccionado.	[14]

Capítulo 2. Procedimiento experimental

2.1. Materiales

2.1.1. Reactivos

Los reactivos utilizados para la síntesis fueron: ácido bencen-1,4-dicarboxílico (**BDC**, 98%), ácido 2,6-naftalendicarboxílico (**NDC**, 99%), ácido 2,6-piridindicarboxílico (**PDC**, 99%), nitrato de plata (99%) e hidróxido de sodio (98%), los cuales fueron obtenidos de Sigma-Aldrich y se emplearon como fueron recibidos. Además, se emplearon como solventes etanol (99%, Aldrich) y agua desionizada.

2.1.2. Medios nutritivos

Se emplearon medios nutritivos, que fueron preparados según cada caso como se especifica a continuación. El medio NB (Nutrient Broth, pH=7.2) contiene 5 $g \cdot L^{-1}$ de extracto de carne, 10 $g \cdot L^{-1}$ de peptona y 5 $g \cdot L^{-1}$ de cloruro de sodio. La solución PBS (Phosphate- buffered physiological saline) se preparó con NaCl, agua desionizada y buffer (KH_2PO_4 y H_2O desionizada). El medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) contiene principalmente los aminoácidos L-Arginina·HCl, L-Cistina·2HCl, L-Glutamina, Glicina, L-Histidina·HCl·H_2O, L-Isoleucina, L-Leucina, L-Lisina·HCl, L-Methionina, L-Fenilalanina, L-Serina, L-Threonina, L-Triptofano, L-Tirosina·2Na·$2H_2O$, L-Valina), sales inorgánicas ($CaCl_2$, $Fe(NO_3)_3$, $MgSO_4$, KCl, $NaHCO_3$, NaCl y NaH_2PO_4) y vitaminas.

2.1.3. Cepas

Para llevar a cabo la evaluación de actividad bactericida de los materiales de plata se emplearon dos cepas i) *Escherichia coli (E. coli)* (NCIMB 8545) y *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (NCIMB 8625), las cuales fueron adquiridas por la Universidad de Alcalá, España.

2.2. Técnicas de caracterización

Microscopía Electrónica de Barrido (MEB): Las micrografías se obtuvieron de un microscopio electrónico de barrido modelo Supra 55VP, marca Carl Zeiss.

Difracción de rayos-X (DRX): Los patrones de difracción de este proyecto se obtuvieron mediante un difractómetro de polvos acoplado a un tubo de cobre, para la generación de rayos X, marca Philips, modelo X´PERT PRO. La radiación Kα (45 kV, 40 mA, λ = 1.5406 Å), fue empleada por medio de un monocromador, con una velocidad de barrido de $0.11°\cdot s^{-1}$, en el intervalo de 2θ de 5 a 50°.

Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR): Los espectros de infrarrojo se adquirieron en un espectrómetro marca Bruker, modelo Tensor 27, mediante la técnica ATR (reflectancia difusa atenuada). Con un intervalo espectral de 4000-650 cm^{-1} y una resolución de 2 cm^{-1} a temperatura ambiente.

Análisis TermoGravimétrico (ATG): Los termogramas se obtuvieron en un equipo modelo TGA Q500, marca TA Instruments (USA), en una atmósfera de N_2 y una rampa de calentamiento de $5°C\cdot min^{-1}$. Se utilizó un intervalo de calentamiento desde temperatura ambiente hasta 800°C.

Adsorción de N_2: Las isotermas de adsorción fueron adquiridas en un equipo modelo BELSORP-max, de marca BEL Japan Inc. Inicialmente las muestras fueron desgasificadas durante 24 h a 100 °C, y finalmente se obtuvieron las medidas de N_2 adsorbido. Las áreas fueron calculadas mediante la isoterma, empleando el modelo de Brunauer, Emmett y Teller (BET).

Dispersión dinámica de Luz (DLS, *Dynamic Light Scattering*) y potencial ζ (ZP): Esta técnica permite obtener tanto el tamaño de partícula, en nm, como el potencial ζ de dicha partícula. Los análisis se llevaron a cabo en un equipo modelo Zetasizer Nano serie Nno-Zs, marca Malvern Instruments, Worcestershire, UK.

2.3. Procedimiento y caracterización

Para la síntesis de la MOF **AgBDC** se utilizaron las relaciones molares reportadas, y para las MOF **AgNDC** y **AgPDC** se variaron las relaciones molares para encontrar la ideal, la cual se describe a continuación.

2.3.1. MOF AgBDC

La MOF **AgBDC** se sintetizó por agitación a temperatura ambiente (ATA), con una estequiometria 1:1 (ligando: metal) como se observa en la reacción de la Figura 2.1. Se agitaron 0.166 g (1 mmol) de ligando **BDC** y 0.10 g de NaOH en 50 mL de agua desionizada. Posteriormente, se goteó lentamente una solución de 0.169 g (1 mmol) de $AgNO_3$ y 10 mL de etanol, a la solución inicial. La reacción se dejó agitar durante 24 h. Después, el sólido se separó por centrifugación a 6000 rpm durante 15 min. Finalmente, el sólido se secó a 50 °C durante 12 h para dar lugar a 0.16 g de MOF **AgBDC** en 43 % de rendimiento, en base seca, de acuerdo con el análisis termogravimétrico (ATG).

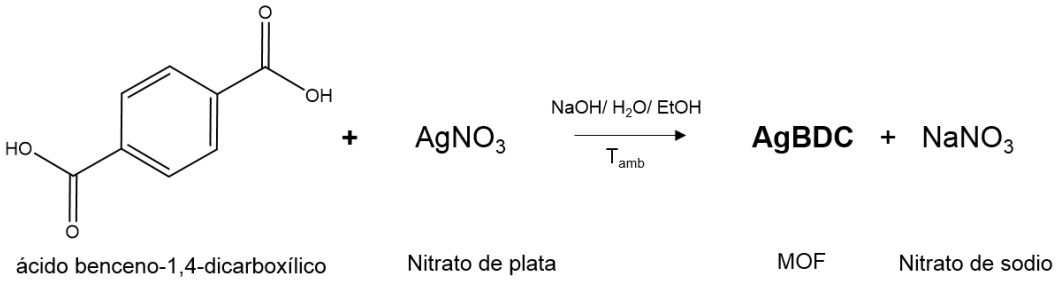


Figura 2.1. Reacción para la formación de AgBDC.

Compuesto **AgBDC**: sólido café, rendimiento 43 %. FTIR (ν, cm^{-1}): 740, 528, 454 (O-Ag-O), 670 – 1228 (C-H), 1492 (COO^-). DRX (2θ, º, (intensidad)$_{[h\ k\ l]}$): 13.2 (1053)$_{[1\ 0\ 0]}$, 16.6 (950) $_{[1\ 1\ 0]}$, 18.8 (1007) $_{[1\ 1\ -1]}$, 25.1 (901) $_{[0\ 2\ 1]}$, 25.6 (920)$_{[1\ 1\ 1]}$, 28.3 (935)$_{[2\ 1\ 0]}$, 30.90 (1282) $_{[1\ 2\ 1]}$, 32. (990) $_{[2\ 2\ -1]}$, 34.2 (952) $_{[1\ 3\ -1]}$, 40.6 (1001) $_{[2\ 3\ 0]}$, 42.6 (944) $_{[1\ 4\ 0]}$. Área BET ($m^2 \cdot g^{-1}$): 4.94 TGA (%w, $T_{intervalo}$ [ºC]): 42% 330–450.

2.3.2. MOF AgNDC

La MOF **AgNDC** se utilizó la síntesis sonoquímica, con una estequiometria 1:1 (ligando: metal) como se observa en la reacción de la Figura 2.2. Se mezclaron 0.21 g (1mmol) de ligando **NDC** y 0.10 g de NaOH en 50 mL de agua desionizada. Posteriormente se goteó lentamente una solución de 0.16 g (1 mmol) de $AgNO_3$ en 12 mL de etanol a la solución inicial y se dejó agitar por 24 h. Después, se sometió a ultrasonido durante 10 min, en un procesador ultrasónico marca Cole Parmer, modelo CPX750, con 750 W de potencia máxima, empleando una frecuencia de 40 % y se dejó en reposo por 24 h. Finalmente, el sólido se separó por centrifugación a 6000 rpm por 15 min y se secó a 50°C durante 12 h para dar lugar a 0.20 g de MOF **AgNDC** en 48 % de rendimiento, en base seca de acuerdo con ATG.

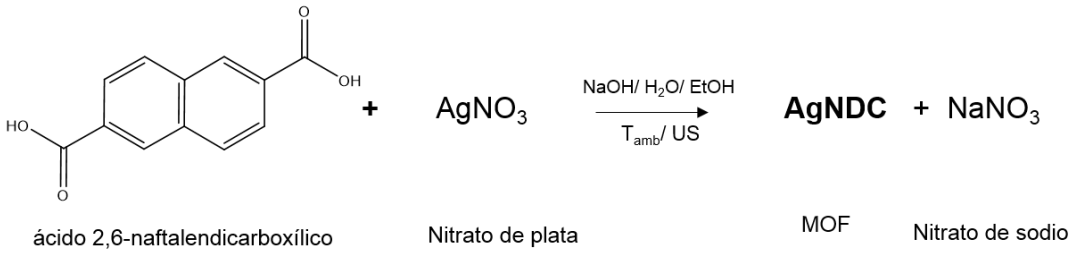


Figura 2.2. Reacción para la formación de AgNDC.

Compuesto **AgNDC**: sólido marrón, rendimiento 48 %. FTIR (ν, cm^{-1}): 756, 548, 450 (O-Ag-O), 670 – 1228 (C-H), 1487, 1523 (COO^-). DRX (2θ, º, (intensidad)): 10.70 (487), 17.60 (189), 18.41 (215), 21.43 (230), 24.50 (221), 27.80 (401), 28.70 (227), 32.00 (274), 34.00 (260), 34.97 (221), 36.89 (221), 41.65 (255), 44.31 (214), 45.69 (181), 47.13 (200), 49.67 (191). Área BET ($m^2 \cdot g^{-1}$): 11.51 TGA (%w, $T_{intervalo}$ [ºC]): 43% 350–400.

2.3.3. MOF AgPDC

Para el último material, **AgPDC**, se sintetizó por agitación a temperatura ambiente (ATA), con una estequiometria 3:1 (ligando: metal) como se observa en la reacción de la Figura 2.3. Se agitaron 0.05 g (0.31 mmol) de ligando **PDC** en 50 mL de agua desionizada. Posteriormente, se goteó lentamente una solución de 0.16 g (0.1

mmol) de $AgNO_3$ y 10 mL de etanol, a la solución inicial. La reacción se dejó agitar durante 24 h. Después, el sólido se separó por centrifugación a 6000 rpm durante 15 min. Finalmente, el sólido se secó a 50 °C durante 12 h para dar lugar a 0.09 g de MOF **AgNDC** en 21 % de rendimiento, en base seca de acuerdo con ATG.

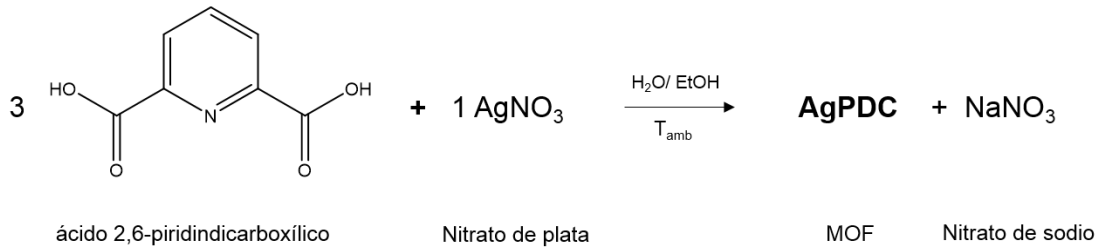


Figura 2.3. Reacción para la formación de AgPDC.

Compuesto **AgPDC**: sólido blanco, rendimiento 21 %. FTIR (ν, cm^{-1}): 754, 512 (O-Ag-O), 670 – 1228 (C-H), 1580, 1558, 1631 (COO^-), 3517 (OH). DRX (2θ, º, (intensidad)): 8.70 (933), 9.44 (674), 15.54 (596), 17.44 (611), 23.40 (656), 26.24 (601), 31.86 (590), 35.16 (607), 39.96 (587), 45.24 (561). TGA (%w, $T_{intervalo}$ [ºC]): 7% 100–150, 38% 240–260, 13% 280–400.

2.4. Estabilidad de los materiales

2.4.1. Estabilidad estructural

La estabilidad se determinó colocando una concentración de 4000 $mg \cdot L^{-1}$ de los materiales **AgBDC**, **AgNDC** y **AgPDC** en: agua desionizada (milli-Q), PBS, DMEM y DMEM + 10 % de suero fetal bovino. Se mantuvieron en agitación lenta y constante durante 24 h a 4 °C, 37 °C y temperatura ambiente. Después se separó el sólido por centrifugación a 6000 rpm durante 10 min. Finalmente, los sólidos se secaron a 50 °C por 18 h y se caracterizaron por DRX.

La evaluación de la estabilidad en el medio de cultivo se realizó en NB y NB sin cloro ($NB_{s/Cl}$). Se utilizó 4000 $mg \cdot L^{-1}$ del material **AgBDC** y se pusieron en contacto con los medios durante 18 h a 37 °C. Cabe destacar, que se utilizaron esas

condiciones, ya que suelen ser las utilizadas en los ensayos de cultivo bacteriano. Al igual que los experimentos anteriores, el sólido fue separado por centrifugación, secado y caracterizado por DRX.

2.4.2. Estabilidad coloidal

La estabilidad coloidal se determinó dispersando 100 y 2000 $mg \cdot L^{-1}$ de MOF **AgBDC** en agua milli-Q y en medio $NB_{s/Cl}$. La estabilidad se evaluó a 37 °C, siguiendo el tamaño de partícula mediante DLS y analizando el ZP (potencial Z), durante el tiempo (0, 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 8 y 18 h).

2.5. Actividad bactericida

2.5.1. Ensayo en suspensión

La actividad bactericida de la MOF **AgBDC** se evaluó en dos bacterias de las más representativas del reino bacteriano, una grampositiva *S. aureus* y una gramnegativa *E. coli*, con la finalidad de evaluar la posibilidad de contar con un amplio espectro.

Las pruebas en suspensión se realizaron como primer ensayo, es decir, el material sólido se agregó en concentraciones de 1, 2.5, 5, 10 y 20 $mg \cdot L^{-1}$ para *S. aureus* y de 1, 2.5, 5, 10, 20, 50, 100 y 200 $mg \cdot L^{-1}$ para *E. coli*, al medio de cultivo con bacteria, y se incubaron durante 18 h a 37 °C. Adicionalmente, se utilizaron como controles, nitrato de plata y ligando **BDC**, que son los precursores de la síntesis de **AgBDC**, en concentraciones proporcionales para 20 $mg \cdot L^{-1}$ de MOF para el caso de *S. aureus* y 20, 50, 100 y 200 $mg \cdot L^{-1}$ para *E. coli*.

La viabilidad bacteriana fue evaluada por duplicado y triplicado, mediante los ensayos de conteo de colonias (Unidades Formadoras de Colonias, UFC), densidad óptica (DO) y actividad enzimática (Fluoresceina Diacetato, FDA).

El conteo de colonias se realizó a partir de diluciones de las suspensiones anteriormente descritas, en PBS y se inocularon 10 μL en cajas Petri (ϕ= 9 cm), que contenían agar compuesto por glucosa, extracto de levadura y triptona. Finalmente

se incubaron a 37 °C por 24 h y se cuantificó el crecimiento bacteriano utilizando un instrumento de conteo CL-1110 (Acequilabs).

La densidad óptica se determinó con alícuotas de las suspensiones de los controles y de la muestra en contacto con la bacteria, y se midió la absorbancia (DO_{600}; λ=600 nm) en un espectrofotómetro UV-1800, Shimadzu.

Por último, la actividad enzimática se evaluó mezclando 5 μL de diacetato de fluoresceína (FDA) y 195 μL de las muestras en contacto con la bacteria. Utilizando un fluorómetro modelo Fluoroskan Acent FL, marca Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Se midió la intensidad de emisión fluorescente (λ_{exc}= 485nm y λ_{emi}= 538 nm), emitida por la reacción enzimática de la bacteria.

2.5.2. Ensayo en recubrimiento

Recubrimientos o películas de MOF **AgBDC**: se prepararon películas sobre discos de vidrio (ϕ = 13 mm), con una concentración de 100 $mg \cdot L^{-1}$ en agua. Se utilizó un spin coater, modelo SPIN150i, marca POLOS. En el cual se diseñó un programa de rotación con las siguientes condiciones: velocidad: 510 rpm, período: 200 ms, amplitud: 90 °, tiempo de giro: 0.0/30.0 ss.s. Adicionalmente, se evaluó la estabilidad de adhesión durante el tiempo, de las películas en el medio $NB_{s/Cl}$, utilizando un DLS, descrito anteriormente.

Viabilidad bacteriana: las películas y los controles (discos sin material), se pusieron en contacto con la bacteria *E. coli*, utilizando una caja de 24 pozos, como se observa en la Figura 2.4, y se incubaron a 37 °C durante 18 h y 7 días.

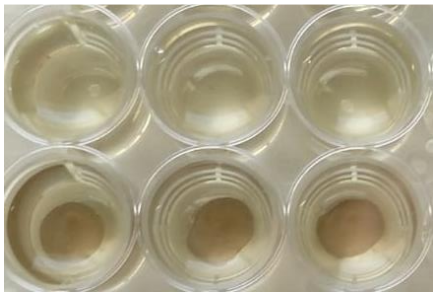


Figura 2.4. Ensayo de viabilidad bacteriana de las películas preparadas y los controles.

Posteriormente la viabilidad se evaluó mediante UFC, DO y FDA para el caso de la suspensión bacteriana que estuvo en contacto con los discos durante 18 h. Mientras que, para la película y el biofilm, se lavaron primero con PBS para retirar las bacterias en exceso, y después con un detergente que contenía SCDLP (Soya Casein Digest Lecithin Polysorbate Broth), esto para despegar las películas y poder evaluar la actividad mediante UFC. Todos los experimentos fueron realizados por duplicado ó triplicado y de acuerdo con la ISO 22196. Adicionalmente, se evaluó la actividad de la película y el biofilm, por microscopia electrónica de barrido y microscopia de barrido láser confocal (CLSM).

Para la técnica de CLSM, las bacterias se tiñeron con 50 µL de un kit Live/Dead, el cual contiene una mezcla de Syto 9 y yoduro de propidio (kit de viabilidad Live / Dead BacLight, Thermo Fisher, EE. UU.), durante 30 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad. Las micrografías se obtuvieron utilizando un microscopio de fluorescencia confocal SP5 de Leica Microsystems (Alemania). Esta técnica permite identificar la viabilidad de las células mediante la integridad de la membrana celular. Las células viables emiten fluorescencia verde debido al fluorocromo Syto 9 (excitación 480 nm / emisión 500 nm), mientras que las no viables emiten fluorescencia color roja, debido al yoduro de propidio (excitación 490 nm / emisión 635 nm).

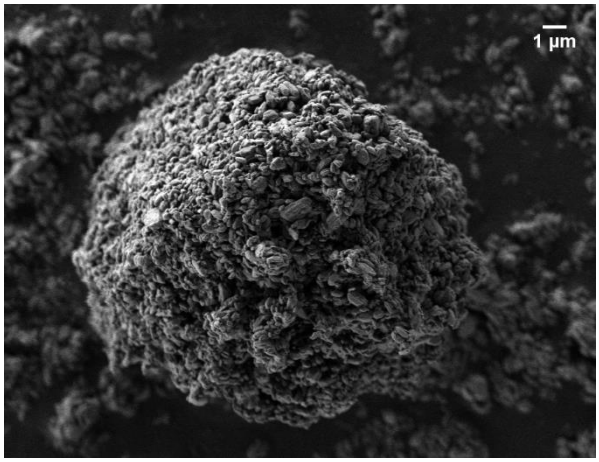
Capítulo 3. Propiedades físico - químicas

3.1. Morfología

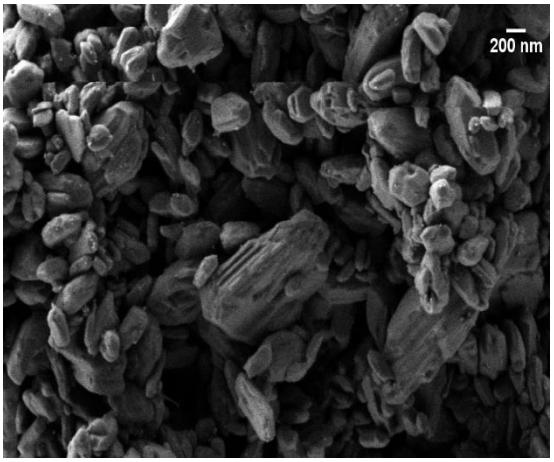
La variación de los ligandos y metales en el diseño de las MOF permiten obtener redes con diferentes estructuras y propiedades fisicoquímicas. Las estructuras dependen del número de coordinación del metal, así como de la naturaleza de los ligandos [18]. A continuación, se presentan los resultados de las caracterizaciones fisicoquímicas de los materiales sintetizados, a partir de plata y de los ligandos descritos en el capítulo anterior.

En la Figura 3.1, Figura 3.2 y Figura 3.3, se presentan las micrografías de los materiales sintetizados, adquiridas a diferentes aumentos con la técnica de MEB. La MOF **AgBDC** (Figura 3.1) tiene partículas que se aglomeran, sin embargo, al realizar un mayor acercamiento (20,000 kX) se observaron partículas con caras poco definidas de 600 nm cuya formación se realizó en forma de capas. En el aumento de 60,000 kX se observan partículas ovaladas con caras poco definidas de tamaños entre 100 y 400 nm. Adicionalmente, en algunas caras se puede observar la adhesión de pequeñas partículas (~ 20 nm) a la superficie.

a)



b)



c)

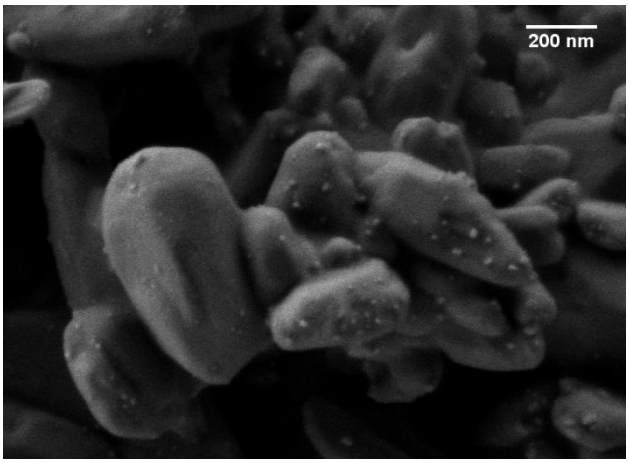
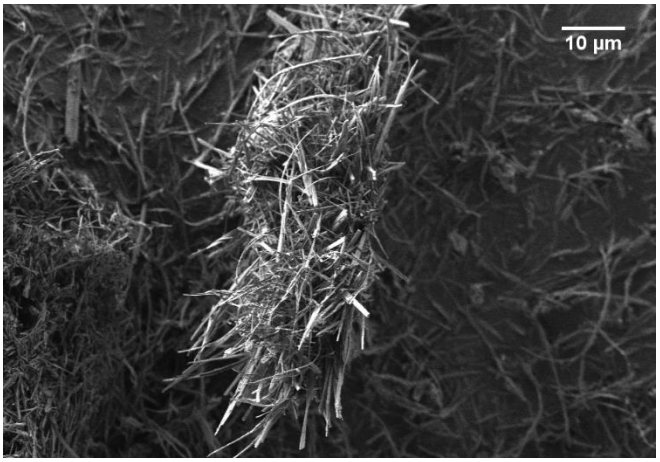


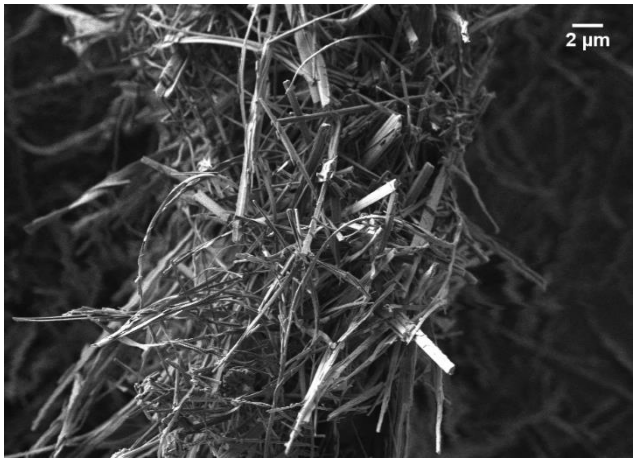
Figura 3.1. Micrografías a distintos aumentos de AgBDC: a) 4,000 kX, b) 20,000 kX y c) 60,000 kX.

En la Figura 3.2 se muestra la MOF **AgNDC**, con el menor aumento se observa una morfología en forma de fibras. En el mayor aumento (15,000 kX) se logra ver que las partículas son varillas con tamaños entre 700 y 4000 nm de largo y entre 100 y 300 nm de ancho; con crecimiento en forma de capas, similar al observado en el material **AgBDC**.

a)



b)



c)

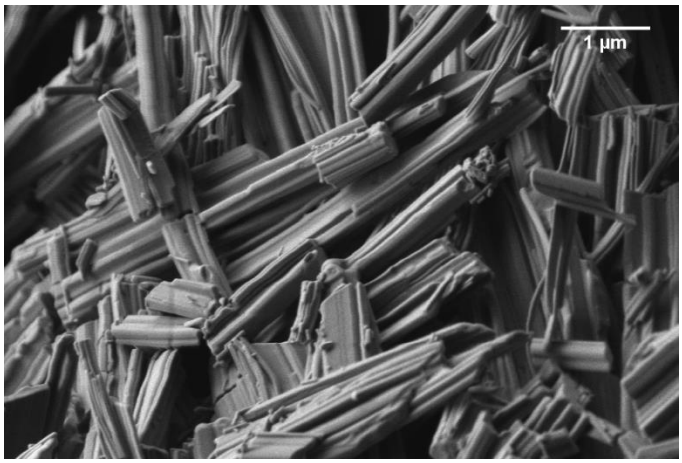
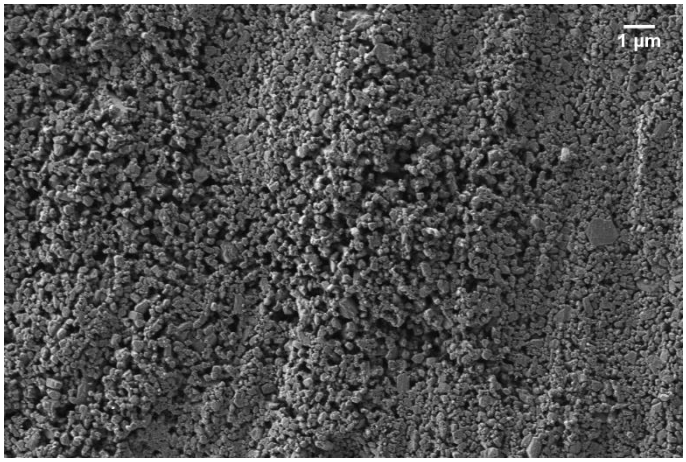


Figura 3.2. Micrografías a distintos aumentos de AgNDC: a) 1,000 kX, b) 2,500 kX y c) 15,000 kX.

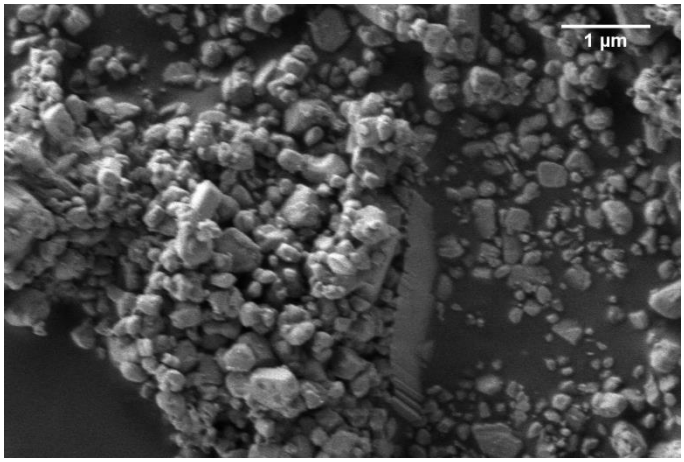
Finalmente, en la Figura 3.3 se aprecia la MOF **AgPDC**, ésta tiene partículas con forma de poliedros irregulares con caras planas bien definidas, las cuales se acomodan formando una capa regular. Los tamaños de estas partículas van de 60 a 350 nm, y muy pocas de 1000 nm.

Conforme a lo anterior, se observó que la MOF con el ligando constituido por dos anillos bencénicos, **AgNDC**, presentó el mayor tamaño de partícula y una morfología diferente en comparación con los otros dos materiales.

a)



b)



c)

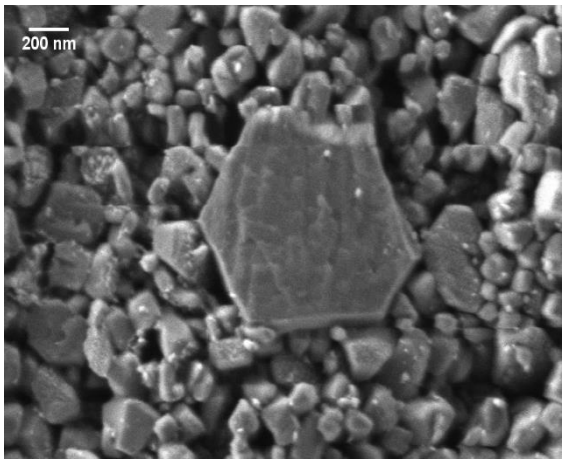


Figura 3.3. Micrografías a distintos aumentos de AgPDC: a) 5,000 kX, b) 15,000 y c) 40,000 kX.

Con la finalidad de determinar la composición química de los materiales, se realizó un análisis químico elemental obtenido por EDS con lo cual se logró cotejar la presencia de Ag, C y O en las tres MOF. En la Tabla 1-1 se presenta una comparación de los valores obtenidos experimentalmente por EDS y los datos teóricos calculados para el contenido de plata en cada material. Como se puede apreciar, los valores teóricos son mayores para los tres materiales, por lo que cabe la posibilidad de que no toda la plata, que se agregó inicialmente, se coordinara con el ligando. La que menos diferencia tiene es la **AgNDC** con -2.62 %, que particularmente es la que tiene un mejor rendimiento de reacción con el 48%. Este dato es seguido por la **AgBDC** con -10.82 % de Ag, la cual tuvo un 43% de

rendimiento de reacción. Mientras que la MOF **AgPDC**, que presenta la mayor diferencia con -19.08 %, la cual se podría atribuir a la complicada formación de esta MOF, obteniendo únicamente un rendimiento en base seca de acuerdo con ATG del 21 % (Capítulo 2).

Tabla 3-1. Contenido de Ag de los materiales **AgBDC**, **AgNDC** y **AgPDC**.

Material	%W Ag teórica	%W Ag experimental	Diferencia %W
AgBDC	56.77	45.95	-10.82
AgNDC	50.17	47.55	-2.62
AgPDC	66.58	47.50	-19.08

3.2. Propiedades estructurales

En los resultados de DRX, ver Figura 3.4, difractograma de la MOF **AgBDC**, mostró las mismas reflexiones que el patrón teórico, como se muestra en la
Figura 3.4a. Sin embargo, cabe mencionar que este material se sintetizó con un procedimiento sencillo a temperatura ambiente en comparación con los reportados [32]. Mientras que para los patrones de **AgNDC** y **AgPDC** se compararon con los patrones de los ligandos. Se observa que los picos de los materiales sintetizados se localizan en diferentes posiciones, que los picos de los difractogramas de los ligandos, lo cual se puede atribuir a que el ligando está reaccionando, dando lugar a la formación de una estructura cristalina diferente, como se observa en la Figura 3.4b-c. De entrada, se puede evidenciar que estos nuevos materiales son cristalinos, y que los patrones corresponden a estructuras no identificadas mediante la comparación con las tarjetas JCPDS. Es decir, los materiales obtenidos son estructuras nuevas, para las cuales es necesario llevar a cabo otras técnicas de caracterización y definir sus parámetros estructurales.

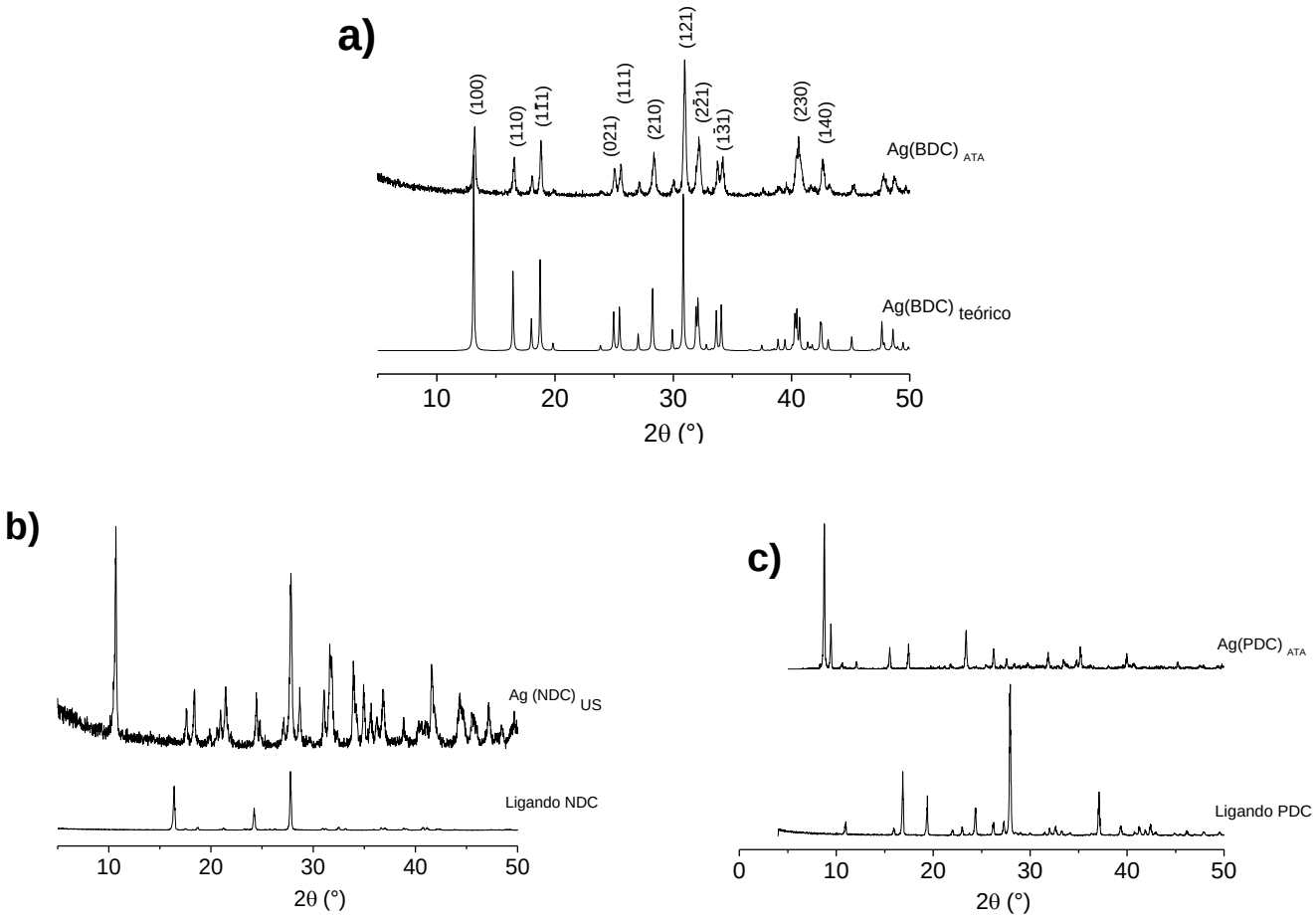


Figura 3.4. Difractogramas de los materiales sintetizados de: a) AgBDC, b) AgNDC y c) AgPDC.

Los tres materiales sintetizados presentaron estructuras cristalinas, de acuerdo con los resultados de DRX, con crecimientos preferenciales en los planos ubicados en las posiciones 2θ [°]: 30.9 para **AgBDC**, 10.7 para **AgNDC** y 8.7 para **AgPDC**, respectivamente. Adicionalmente, se calcularon los tamaños de cristal (D) en los picos de mayor intensidad, usando la ecuación de Scherrer. Los materiales presentaron tamaños máximos de 68.0 (**AgBDC**), 78.0 (**AgNDC**) y 72.0 (**AgPDC**) nm. La obtención de diferentes estructuras y tamaños de cristal es de esperarse ya que los tres materiales tienen distintos ligandos orgánicos, lo que podría generar interacciones que favorezcan no solo el crecimiento sino también el apiñamiento de

los cristales de acuerdo con lo observado en MEB, en donde **AgNDC** es el que presenta mayor tamaño de partícula y cristal en comparación con **AgBDC** y **AgPDC**.

3.3. Propiedades espectroscópicas

En los espectros de infrarrojo, Figura 3.5, las bandas ubicadas entre 1487 y 1693 cm^{-1} se pueden atribuir a las vibraciones de la interacción de los metales con los carboxilatos. Lo cual se explicará más a detalle después de evidenciar los demás grupos funcionales y enlaces presentes en los materiales ya que estas variaciones dan cuenta de los posibles modos de interacción entre estos fragmentos. Las bandas entre 670 y 1228 cm^{-1} corresponden al grupo C-H perteneciente al anillo aromático y la banda que se observa en 3517 cm^{-1} únicamente para **AgPDC**, se puede atribuir al grupo O-H de las moléculas de agua [33, 34].

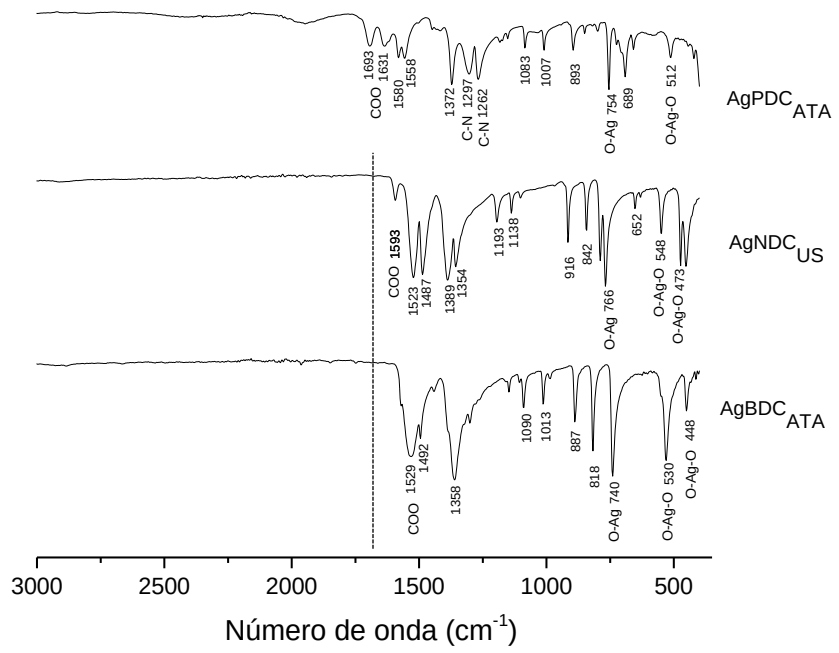


Figura 3.5. Espectros de infrarrojo de los materiales sintetizados AgBDC, AgNDC y AgPDC.

Finalmente, en la literatura se encontró que las bandas localizadas en 758 cm^{-1}, se pueden considerar como las vibraciones de tensión del enlace Ag-O, mientras que

las bandas en 528 y 454 cm^{-1} son las vibraciones de flexión del fragmento O-Ag-O [35]. Para el caso de los materiales del presente trabajo, dichas vibraciones se encuentran ligeramente corridas a 740, 528 y 448 cm^{-1} para **AgBDC**; 756, 548 y 450 cm^{-1} para **AgNDC**; mientras que aparecen en 754 y 512 cm^{-1} para **AgPDC,** claramente evidenciando la interacción de los oxígenos con la plata en los tres materiales sintetizados, y por lo tanto dando evidencias de la interacción entre el ligando y el metal en los tres casos.

Específicamente, se observan en los tres materiales las bandas en 1580 y $1558_{(aniso)}$ cm^{-1} para **AgPDC**, en 1523 y $1487_{(iso)}$ cm^{-1} para **AgNDC**, mientras que aparece en $1492_{(aniso-iso)}$ cm^{-1} para **AgBDC**. Todas ellas pertenecientes al estiramiento asimétrico entre aniso- e iso-bidentado del grupo COO^- que interacciona con tres átomos Ag en función del tipo de ligando [33, 34, 36]. Este modo de coordinación es más débil en comparación con aquel que solo interacciona con dos átomos Ag, independientemente de si es iso- o aniso-bidentado, Figura 3.6, que ejemplifica al sistema difractado como monocristal, **AgBDC**, [32]. En los casos **AgPDC** y **AgNDC**, las estructuras no son conocidas aun, sin embargo, dichas bandas dan cuenta de los posibles modos en los que interaccionan el ligando con el metal.

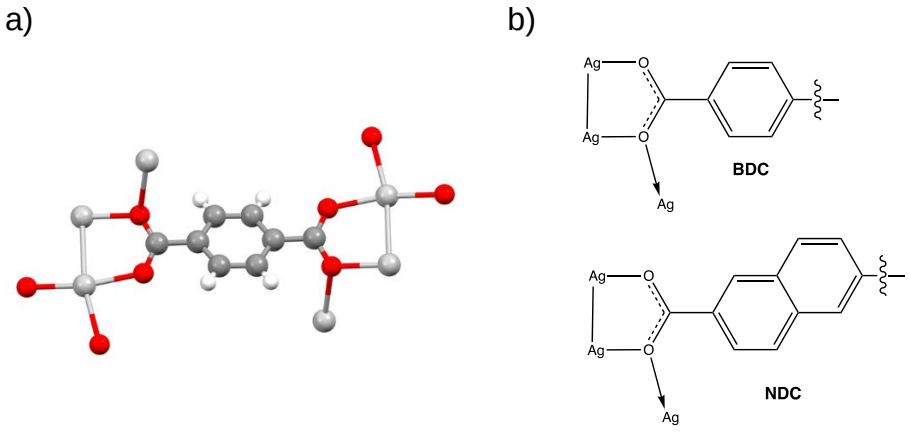


Figura 3.6. a) Sistema difractado como monocristal de AgBDC y b) interacciones de la plata con BDC y NDC.

Mientras que, para **AgPDC** adicionalmente se observan las bandas en 1631 cm^{-1} y 1693 cm^{-1} las cuales se asignan al estiramiento asimétrico anisobidentado del grupo

carboxilato y al éster metálico monodentado de tipo quelato con el nitrógeno de la piridina, respectivamente, ver Figura 3.7 [19, 34].

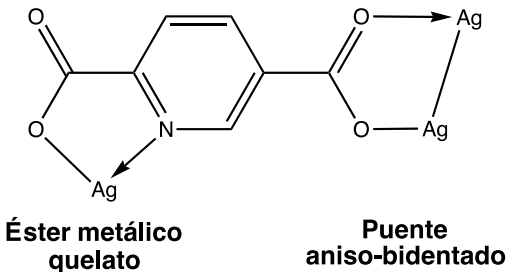


Figura 3.7. Interacciones de la plata con los oxígenos pertenecientes al ligando PDC.

Finalmente, se observa una pequeña banda en 1593 cm^{-1} para el compuesto **AgNDC** la cual cae en el intervalo de carboxilatos puente de tipo anisobidentado, que puede ser un modo de coordinación en mucho menor proporción presente en este material, ver Figura 3.8, [34, 37].

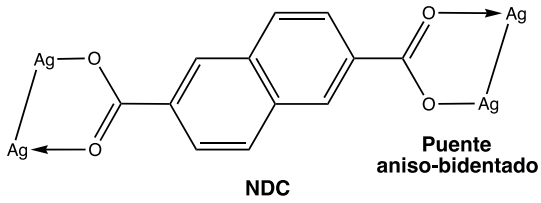


Figura 3.8. Interacciones de la plata con los oxígenos pertenecientes al ligando NDC.

3.4. Estabilidad térmica y propiedades texturales

Las temperaturas de degradación de las MOFs se determinaron por la técnica de ATG. Como se puede observar en la Figura 3.9, **AgBDC** y **AgNDC** presentaron una estabilidad térmica de 330 °C y 350 °C con una pérdida de peso del 42% y 43% respectivamente a esa temperatura. No se observaron pérdidas de peso antes de dicha temperatura que pudieran indicar la presencia de moléculas de solvente o de ligando ocluido en la MOF. La presencia de dichos compuestos se descartó

inicialmente con los espectros de infrarrojo, ya que no se encontraron bandas pertenecientes a los grupos -OH (correspondientes a las moléculas de agua) que regularmente se localizan entre 3000 y 3500 cm^{-1} [33], ni bandas asociadas a ligando libre (de ácidos carboxílicos terminales sin desprotonar, líneas punteadas, Figura 3.5). Mientras que **AgPDC** presentó dos procesos de descomposición: el primero ocurre en 240 °C, y el segundo en 280 °C (el ligando PDC solo tiene un proceso de descomposición en 190°C). Además, se observó una pérdida de peso en 100 °C la cual se puede atribuir a la perdida de moléculas de solvente. De la misma forma, en el espectro de infrarrojo se observó una banda perteneciente a la vibración del grupo -OH. Se puede evidenciar material residual correspondiente a 58 para el material **AgBDC** (teórico=56.7 %, ∆=-1.3 %), 57 para **AgNDC** (teórico 50.17 %, ∆= -6.83 %) y 42 % para **AgPDC** (teórico 66.58 %, ∆= 24.58 %), que se asocia principalmente a partículas de plata y carbón residual. Estos resultados pueden ser debidos a la autoasociación de proporciones mayores de plata en los materiales **AgNDC** y **AgBDC**, como en el caso de la Figura 3.6 del análisis de FTIR, que al final de cuentas es una reacción de desproporción en la que hay más plata de la esperada y menos ligando. El caso del material **AgPDC** es diferente, ya que el valor teórico esperado de Ag es de 66.58 % y solo se consigue agregar 42 % de Ag en el material resultante. Nuevamente, el análisis por FTIR da evidencias del por qué ocurre dicha diferencia, ya que en el caso del ligando PDC, tiene una menor capacidad de interacción con la Ag, consiguiendo enlazar entre 3 y 4 átomos de Ag únicamente, ver Figura 3.7, en comparación con los materiales **AgNDC** y **AgBDC** que consiguen enlazar entre 4 y 6 átomos de Ag. Dependiendo de las condiciones de síntesis lo más seguro y debido a la hidrofilia de la plata, es que los átomos de Ag que no se unen a los ligandos se autoensamblen en nanopartículas de Ag en mayor o menor medida en función del ligando, menor para **AgNDC** y **AgBDC**, y mayor para **AgPDC**. Las cuales no se consiguieron separar junto con los materiales debido a su tamaño y que las 6000 rpm (con un radio de rotor de 100 mm) empleadas en el proceso de centrifugación del protocolo experimental de este trabajo no son suficientes para conseguir la separación, quedando en el sobrenadante [38]. Adicionalmente, debido a lo descrito con anterioridad es muy

probable que los productos de degradación durante el proceso térmico en el TGA sean partículas de Ag, independientemente de que se haya empleado atmósfera con o sin oxígeno [39]. Para corroborar dichas observaciones en la bibliografía, a los remanentes de la muestra de **AgBDC** sometida al proceso de TGA, se les determinó DRX de polvos, ver Figura 3.10, encontrando precisamente la formación de partículas de plata metálica ya que las reflexiones que se presentan corresponden a los picos característicos de la plata metálica (AgNPs), indexados mediante la tarjeta JCPDS (00-0004-0783), no se observan óxidos de plata en esta muestra. De esta manera se propone que tanto para **AgNDC** como para **AgPDC** está ocurriendo algo análogo a **AgBDC**.

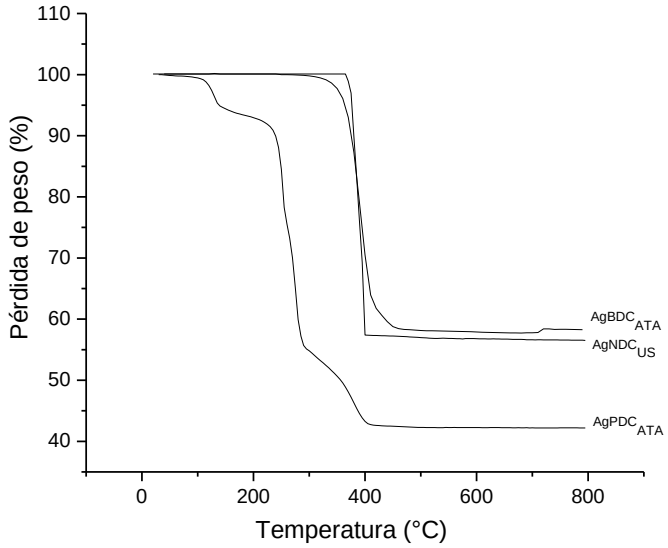


Figura 3.9. Termogramas de los materiales sintetizados AgBDC, AgNDC y AgPDC.

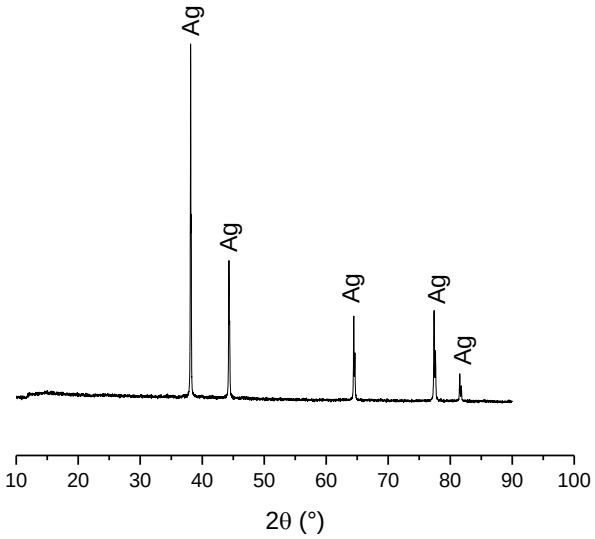


Figura 3.10. Difractograma de los remanentes del material AgBDC después de llevar a cabo ATG.

Adicionalmente, por la técnica de adsorción de nitrógeno se encontró que los sólidos **AgBDC** y **AgNDC** son materiales no porosos, como se muestra en la Figura 3.11 ya que sus isotermas se clasificaron como tipo III (de acuerdo con la IUPAC [40]), además de presentar valores de áreas BET, de 4.94 y 11.51 $m^2 \cdot g^{-1}$, respectivamente. Cabe mencionar, que debido al bajo rendimiento que se obtuvo para la MOF **AgPDC**, no se realizó esta caracterización.

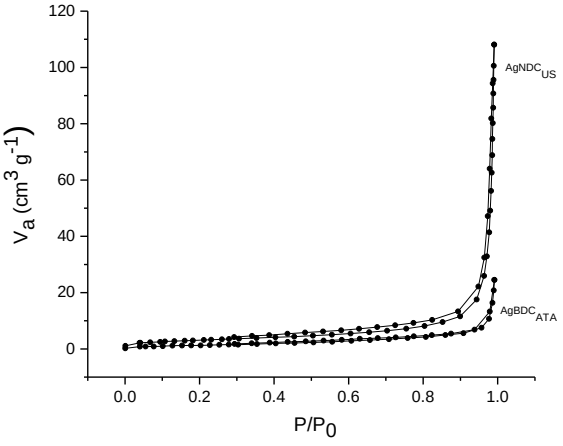
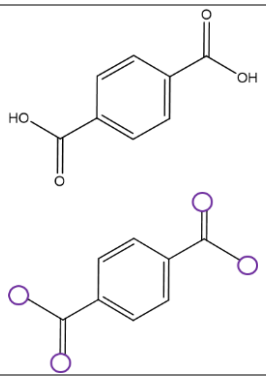
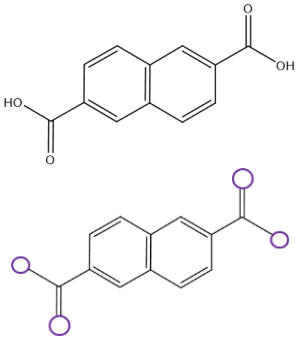
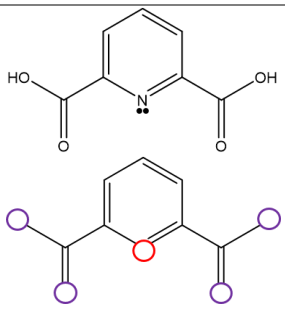


Figura 3.11. Isotermas de los materiales sintetizados AgBDC y AgNDC.

3.5. Comparación de las propiedades fisicoquímicas

El uso de distintos ligandos dió como resultado materiales con diferentes propiedades fisicoquímicas, como se observa en la Tabla 3-2. La morfología de los tres materiales presentó distintas formas, acomodos y tamaños de partículas. Mientras que en DRX se observó que las MOF tienen estructura cristalina, además de tener tamaños de cristal máximo en el orden de nanómetros. Adicionalmente, se encontró que para **AgBDC** y **AgNDC**, solamente hay un proceso de degradación del material. Mientras que, para **AgPDC** se observaron dos procesos de descomposición: el primero perteneciente a las moléculas de agua o solvente (100 ºC) y el segundo a la desintegración del material (240 y 280 ºC). Además, se clasificaron como sólidos no porosos por medio de la adsorción de nitrógeno. De acuerdo con Sun *et. al* la MOF **AgBDC** presentó una geometría 3D constituida por cadenas formadas por las uniones Ag-O, sin embargo, las distancias de las uniones son cortas y muy cercanas entre sí, por lo que se forman cavidades pequeñas dando como resultado materiales macroporosos o no porosos [32]. Finalmente, los materiales presentaron bandas asociadas a las interacciones Ag-O, evidenciando la formación de enlaces entre la plata y los oxígenos de los carboxilatos para la formación de las MOF.

Tabla 3-2. Propiedades fisicoquímicas de las MOF sintetizadas, AgBDC, AgNDC y AgPDC.

Material	Ligando / Sitios activos	Morfología (tamaño en nm)	D (nm)	T_{Deg} (°C)	a_{sBET} (m^2g^{-1})	O-Ag-O (cm^{-1})
AgBDC		Partículas irregulares (100-400)	68.0	330-450	4.94	740,530 y 448
AgNDC		Fibras (varillas) (700-4000 largo y 100-300 ancho)	78.0	350-400	11.51	766, 548 y 450
AgPDC		Poliedros irregulares con caras definidas (60-350)	72.0	100-150; 240-260; 280-400	-	754 y 512

O sitios del oxígeno; O sitios del nitrógeno; D: tamaño de cristal; T_{deg}: temperatura de degradación.

Los cambios descritos anteriormente se podrían asociar con el número de sitios disponibles de cada ligando para coordinarse con la plata, es decir: el ligando **BDC** contiene un anillo bencénico y 4 posibles sitios de unión que son los 4 oxígenos de los dos carboxilatos. El **NDC** cuenta con dos anillos bencénicos y también 4 sitios, debido a los oxígenos de los dos carboxilatos. Mientras que **PDC** cuenta con un anillo y 5 posibles sitios, cuatro oxígenos de los dos carboxilatos y un átomo de nitrógeno que es parte del anillo de piridina. Por lo que la formación y propiedades de las MOF depende de los acomodos de los ligandos con el metal, como se ha documentado en diversas ocasiones [18] y en función de lo observado en FTIR.

Capítulo 4. Estabilidad de los materiales en distintos medios

La estabilidad es fundamental para que las MOF conserven sus propiedades y características, en caso de ser necesario. La estabilidad depende del tipo y naturaleza del ligando y el ion metálico utilizado, la fuerza de coordinación entre metal – ligando, la geometría, las condiciones en las que este expuesta la red, la cantidad de defectos en la estructura, etc. [41].

Estudiar la estabilidad es importante ya que es lo que ha limitado las aplicaciones, en donde se requiera el contacto de estos materiales con medios acuosos [41]. Sin embargo, la degradación de los materiales en los medios podría resultar una estrategia para lograr una liberación gradual de moléculas biológicamente activas o incluso elementos/átomos/iones o fragmentos que conformen la red para lograr una aplicación biológica.

Existen pocos estudios acerca de la estabilidad de las MOF de plata en medios acuosos, por lo que en este proyecto se evaluó la estabilidad de los tres materiales sintetizados (Capítulo 3) en: PBS, DMEM, DMEM + suero de bovino y agua milli-Q. Los ensayos se realizaron a 3 temperaturas diferentes (4 °C, 37 °C y ambiente) con el fin de evaluar si la estabilidad se veía afectada por la temperatura. Sin embargo, debido a que los resultados fueron muy similares entre sí, sólo se presentarán los obtenidos a 37 °C, ya que es la temperatura fisiológica, que simula las condiciones de los fluidos corporales y es la que se utiliza para los ensayos de actividad bacteriana.

Adicionalmente, se evaluó la estabilidad estructural y coloidal en el medio de cultivo NB (medio nutritivo utilizado para el crecimiento de las bacterias).

4.1. Estabilidad estructural

El agua es la base de los medios fisiológicos y de cultivo utilizados en los ensayos biológicos, por lo que se consideró importante iniciar con la evaluación en este medio. En la Figura 4.1, se presentan los difractogramas de los materiales que estuvieron en contacto con agua milli-Q durante 24 h y se comparan con los difractogramas de referencia de cada material. Como se observa en la Figura 4.1b-c, se mantuvo la estructura y cristalinidad de las MOF **AgNDC** y **AgBDC** después de estar en contacto con agua. Mientras que la MOF **AgPDC** (Figura 4.1a), no conservó totalmente la estructura, perdiendo aproximadamente un 20 % de cristalinidad (anexo 1). De acuerdo con las propiedades de los materiales mencionadas en el capítulo 3, la MOF **AgPDC**, presentó menor estabilidad térmica y bajo rendimiento de síntesis, por lo que posiblemente esta MOF presente defectos o una menor coordinación de Ag con el ligando en la estructura que afectan su estabilidad.

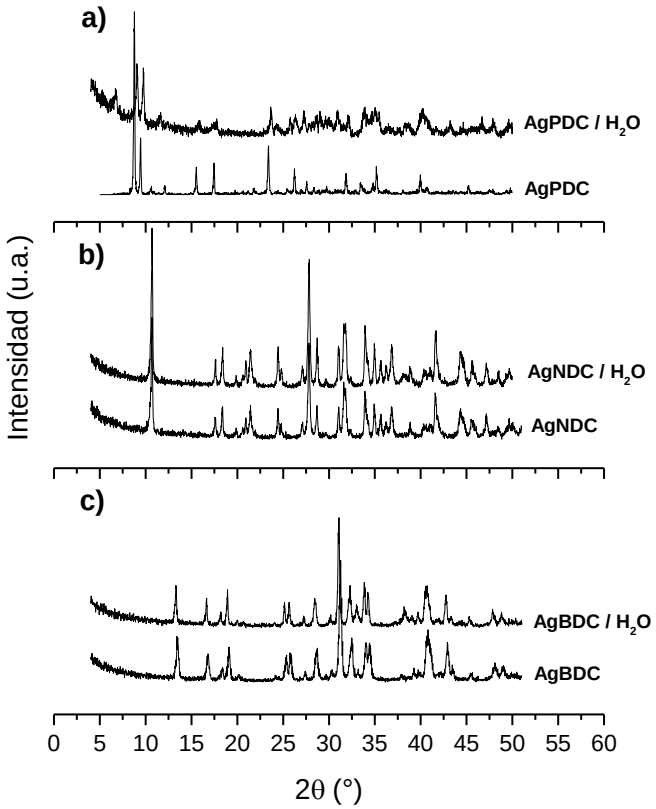


Figura 4.1. Estabilidad estructural en H_2O milli-Q a 37 °C con un tiempo de contacto de 24 h de: a) AgPDC, b) AgNDC y c) AgBDC.

Posteriormente, los materiales fueron evaluados en PBS, DMEM y DMEM + suero de bovino, a 37 °C durante 24 h. En la Figura 4.2 se muestran los patrones de las MOFs después del tiempo de contacto con los medios. Como se puede observar los materiales perdieron su estructura cristalina inicial en todos los medios. Las reflexiones que se presentan corresponden a los picos característicos del cloruro de plata (AgCl), indexados mediante la tarjeta JCPDS (98-006-0414). Los medios son ricos en iones, sin embargo, la afinidad que existe entre la plata y el cloro, la elevada electronegatividad de éste y debido principalmente al principio de ácios y bases duros y blandos de Pearson, el ácido blando que es la plata prefiere reaccionar con la base blanda que es el clururo. Este efecto es tan importante que consiguió la ruptura de la estructura y la formación del compuesto AgCl.

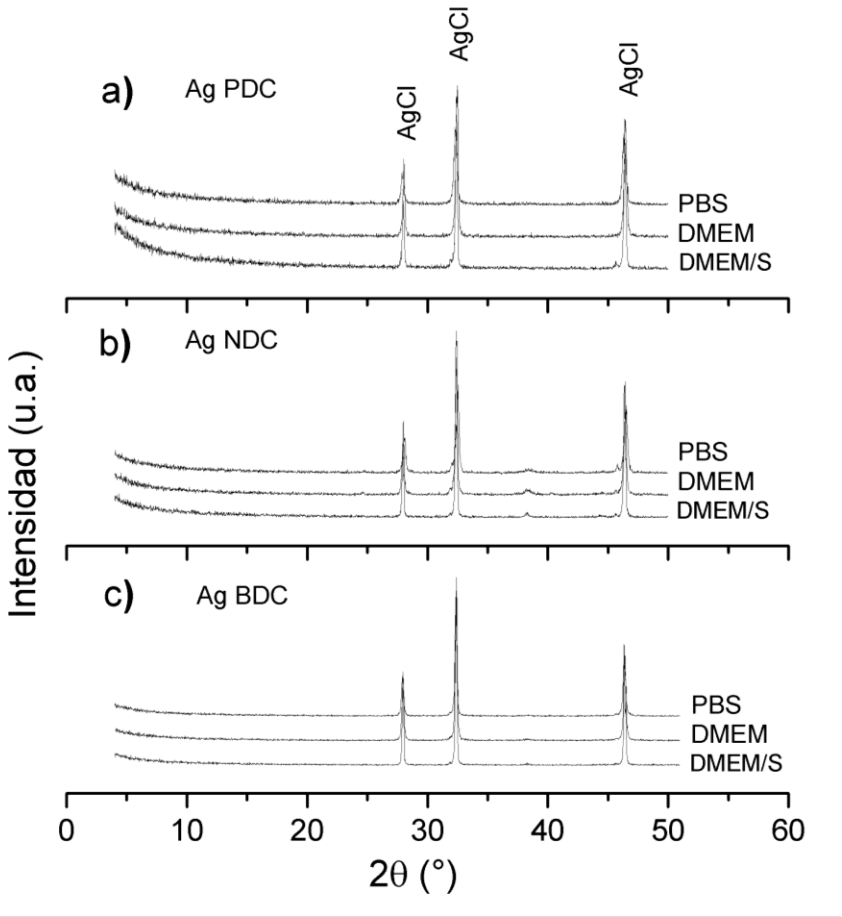


Figura 4.2. Estabilidad estructural en PBS, DMEM y DMEM + suero de bovino a 37 °C con un tiempo de contacto de 24 h de: a) AgPDC, b) AgNDC y c) AgBDC.

Las tres MOFs sintetizadas presentaron estructura cristalina, sin embargo, la estructura y parámetros cristalográficos de la MOF **AgBDC** se encuentran muy bien descritos en la literatura, por lo que se seleccionó para la evaluación de la viabilidad bacteriana. Se inicio con la evaluación de estabilidad estructural y coloidal en agua milli-Q y medio de cultivo NB.

En la Figura 4.3 se presentan los difractogramas de la MOF **AgBDC** antes y después de estar en contacto con los medios NB con cloro (NB $_{c/Cl}$) y NB sin cloro (NB $_{s/Cl}$). Como se puede observar en el difractograma **AgBDC** / NB $_{c/Cl}$, la estructura se pierde y se forma AgCl como en los casos descritos anteriormente. Mientras que las reflexiones de **AgBDC** / NB $_{s/Cl}$ son las mismas que la referencia, por lo que la estructura se mantiene en este medio.

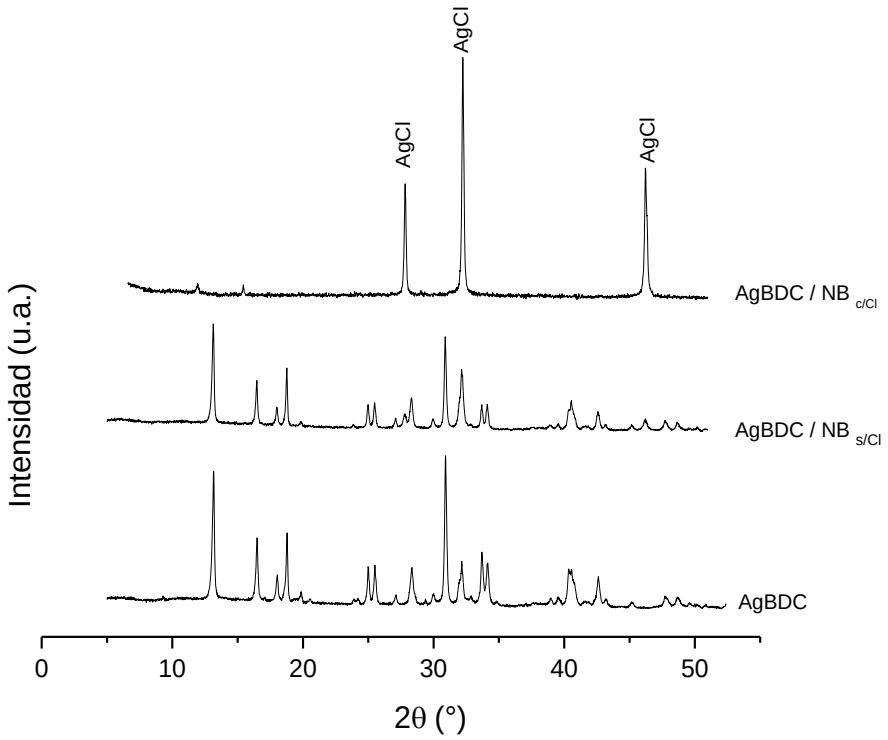


Figura 4.3. Estabilidad estructural en medio de cultivo a 37 °C con un tiempo de contacto de 18 h de AgBDC en medio NB sin cloro y AgBDC en NB con cloro.

4.2. Estabilidad coloidal

Algunos ensayos de viabilidad se realizan en suspensión, de acuerdo con la ISO 22196, por lo que se evalúo el comportamiento coloidal de la MOF **AgBDC** durante el tiempo. Debido a que los valores se mantuvieron en intervalos constantes durante el tiempo, en la Tabla 4-1 se muestra el resumen de los tamaños de partícula, los índices de polidispersidad (PDI) y los potenciales ζ de la MOF en H_2O milli-Q y en medio $NB_{s/Cl}$ utilizando dos concentraciones. De acuerdo con los criterios del potencial ζ [$(-\infty \rightarrow -30)$ y $(30 \rightarrow \infty)$ estables, y $(-30 \rightarrow 30)$ inestable] y PDI [(PDI>0.30) sistema polidisperso y (PDI<0.30) sistema monodisperso], se considera que los valores obtenidos pertenecen a un sistema polidisperso (PDI>0.30) y estable coloidalmente (ζ-potencial ≤ -30) en ambos medios y concentraciones. Sin embargo, los tamaños de partícula se ven afectados por la concentración, es decir, para 100 $mg \cdot L^{-1}$ se tienen tamaños entre 45 - 60 nm y para 2000 $mg \cdot L^{-1}$ los tamaños se

encuentran entre 250 - 300 nm para el caso del agua. Esto podría atribuirse a la aglomeración/floculación de las partículas al aumentar la concentración. Mientras que en el medio $NB_{s/Cl}$ se tienen tamaños entre 100 - 150 nm para 2000 $mg \cdot L^{-1}$, y dos poblaciones para 100 $mg \cdot L^{-1}$: la primera con tamaños entre 100 - 200 nm (con una frecuencia de 96%) y la segunda entre 400 - 500 nm (con una frecuencia de 4%). Las partículas entre 100 y 150 nm son las que predominan en este medio, y las partículas más grandes podrían considerarse agregados. Por lo que, cuando se incrementa la concentración de MOF, la presencia de proteínas, sales y iones en el medio de cultivo previene la agregación de las partículas, sirviendo como surfactantes y estabilizadores a altas concentraciones.

Tabla 4-1. Parámetros coloidales de la MOF AgBDC dispersada en dos medios a 37 °C.

Medio	Concentración ($mg \cdot L^{-1}$)	Tamaño partícula (nm)	Índice de polidispersidad	ζ-potencial (mV)
H_2O milli-Q	100	45-60	0.45 ± 0.01	-45 ± 3
	2000	250-300	0.30 ± 0.03	-50 ± 1
$NB_{s/Cl}$	100	100-200 400-500	0.48 ± 0.02	-35 ± 1
	2000	100-150	0.45 ± 0.01	-30 ± 1

4.3. Comparación de los materiales en diferentes medios

Las MOFs **AgBDC** y **AgNDC** presentaron estabilidad en medio acuoso (H_2O milli-Q), ya que mantuvieron su estructura y cristalinidad. Mientras que **AgPDC** conservó la estructura, pero perdió cristalinidad. Sin embargo, los tres materiales fueron inestables en los medios fisiológicos PBS, DMEM y DMEM + suero de bovino. El material estructurado se degrada rápidamente en presencia de cloruros dando lugar a la formación del AgCl.

La MOF **AgBDC** es estable en el medio de cultivo NB que no contiene cloruros, en la Figura 4.4, se ejemplifica lo que ocurre con la MOF en los distintos medios.

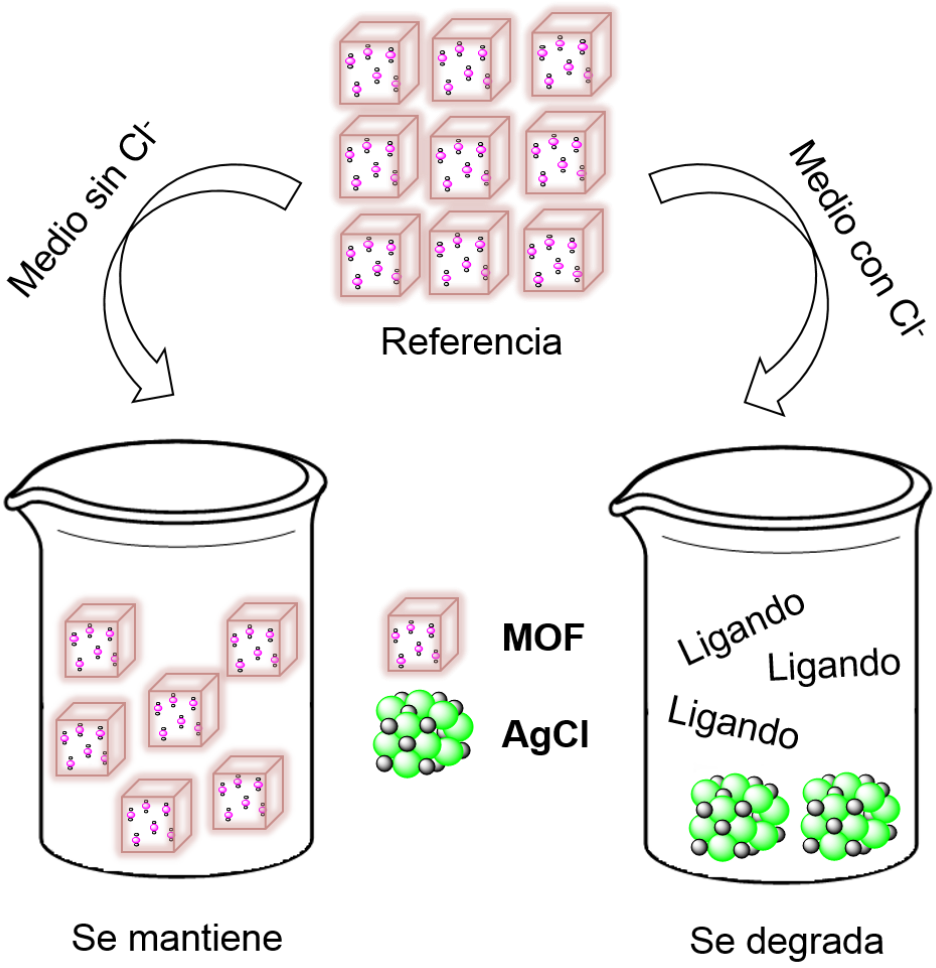


Figura 4.4. Representación de la estabilidad de la MOF AgBDC en medio NB $_{C/Cl}$ y NB $_{s/Cl}$.

Finalmente, la MOF **AgBDC** presentó estabilidad coloidal independientemente del medio y la concentración. Sin embargo, el aumento de la concentración favoreció la agregación de las partículas en agua. Por lo contrario, el medio $NB_{s/Cl}$ previno la aglomeración de las partículas y particularmente esto se observa a altas concentraciones, lo que podría deberse a la protección que le brindan las proteínas, iones y sales presentes en los medios, a la MOF, actuando tal vez como surfactantes y estabilizadores iónicos a la vez.

Capítulo 5. Actividad bactericida

Continuando con el estudio de la MOF **AgBDC**, se evalúo la actividad bactericida sobre las bacterias *S. aureus* y *E. coli* mediante ensayos en suspensión y en recubrimiento, tal cual se explicará a continuación.

5.1. Ensayo en suspensión

5.1.1. Staphylococcus aureus

Debido a que el material **AgBDC** no es soluble en agua, se considera que dicho compuesto se mantiene en suspensión durante la prueba, lo que se determinó a través de las pruebas de estabilidad coloidal del capítulo 4. En la Figura 5.1 se presenta el conteo de colonias para la bacteria *S. aureus* en presencia de distintas concentraciones de MOF **AgBDC** (1, 2.5, 5, 10 y 20 $mg \cdot L^{-1}$) en suspensión, comparadas con un control (0 $mg \cdot L^{-1}$) y los precursores de la MOF, en este caso $AgNO_3$ y **BDC** para la máxima concentración utilizada (20 $mg \cdot L^{-1}$). Como se puede observar, el aumento de las concentraciones no afectó el crecimiento de la bacteria, incluso en 20 $mg \cdot L^{-1}$ el crecimiento fue del 100% tanto para la MOF, como para los precursores. Esto indica que, el material en suspensión tiene baja actividad ante esta bacteria con las concentraciones probadas, al igual que los precursores.

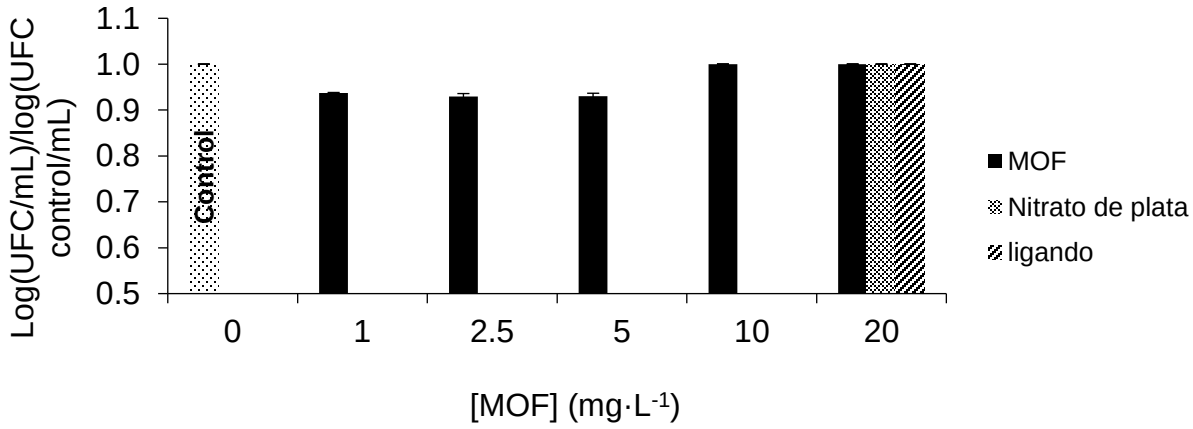


Figura 5.1. Conteo de colonias de *S. aureus* en presencia de diferentes concentraciones de MOF AgBDC, $AgNO_3$ y ligando.

5.1.2. Escherichia coli

En la Figura 5.2 se muestra el conteo de colonias respecto a la concentración de MOF en suspensión (1, 2.5, 5, 10 y 20 $mg \cdot L^{-1}$), comparadas con el control, $AgNO_3$ y **BDC**. A diferencia de *S. aureus*, el crecimiento de *E. coli* disminuye conforme va aumentando la concentración, encontrando que con 20 $mg \cdot L^{-1}$ de MOF se obtuvo un 81% de crecimiento y 82.1% para $AgNO_3$. Se puede apreciar, que el comportamiento de la MOF sigue la tendencia de la inhibición del nitrato de plata, mientras que el ligando presentó baja actividad, ya que en la concentración más alta (20 $mg \cdot L^{-1}$) hubo un crecimiento del 92 %.

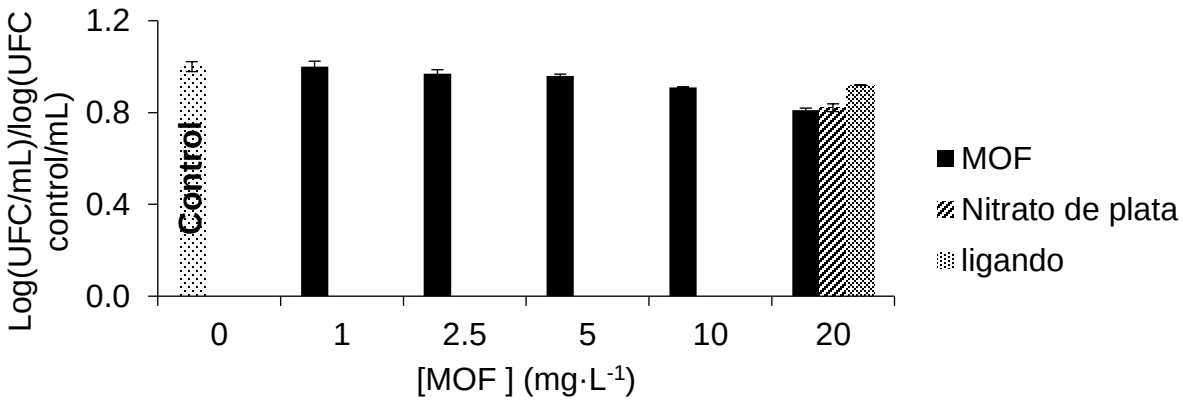


Figura 5.2. Conteo de colonias de *E. coli* en presencia de distintas concentraciones de MOF AgBDC, $AgNO_3$ y ligando.

Debido a que se observaron mayores efectos en *E. coli* que en *S. aureus*, se decidió realizar un estudio más profundo para *E. coli*, por lo que se aumentaron las concentraciones de MOF.

En la Figura 5.3 se presenta el conteo de colonias de *E. coli* en presencia de 50, 100 y 200 $mg \cdot L^{-1}$ de MOF, comparadas con $AgNO_3$ y **BDC**. Como se observa el crecimiento disminuye al aumentar la concentración de MOF y $AgNO_3$, determinando que la dosis letal media (LDS_{50} [=] $mg \cdot L^{-1}$) se encuentra entre 50 y 100 para **AgBDC** y entre 20 y 50 para $AgNO_3$, respectivamente. Adicionalmente, el ligando **BDC** presentó mayor actividad en comparación a las concentraciones utilizadas anteriormente, obteniendo 83.6 % de crecimiento a 200 $mg \cdot L^{-1}$.

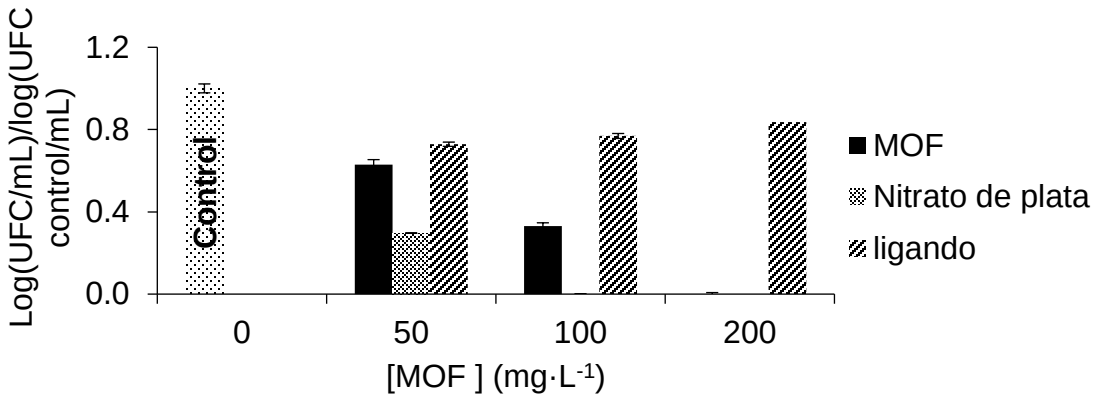


Figura 5.3. Conteo de colonias de *E. coli* en presencia de distintas concentraciones de MOF AgBDC, $AgNO_3$ y ligando.

Para complementar los resultados anteriores, la viabilidad bacteriana también se determinó utilizando diacetato de fluoresceína (FDA). Este es un compuesto no fluorescente el cual se hidroliza por diferentes enzimas extracelulares (proteasas, lipasas, esterasas) de células funcionales. El producto de la reacción es la fluoresceína un compuesto fluorescente (color verde), el cual se puede detectar midiendo la intensidad de la fluorescencia en un fluorómetro. En la Figura 5.4 se presenta la actividad enzimática detectada para *E. coli* a diferentes concentraciones del sobrenadante. El nivel de estrés que provoca la MOF **AgBDC** y el $AgNO_3$ en las concentraciones 50, 100 y 200 $mg \cdot L^{-1}$ es similar. Lo que puede significar que las bacterias presentes en la suspensión sobrenadante sufren estrés debido a la presencia del material, el cual altera el metabolismo y la dañan, independientemente del tipo de compuesto. Sin embargo, en 100 y 200 $mg \cdot L^{-1}$ éstas se podrían considerar bacterias viables, pero no cultivables (BVNC), es decir son bacterias vivas con actividad metabólica pero no logran proliferar en el hábitat usual debido al daño, razón por la cual no se observa crecimiento en la gráfica de la Figura 5.3. Adicionalmente, se puede apreciar que, a pesar de que el ligando presentó baja inhibición, éste provocó estrés y alteración en la bacteria. Los efectos anteriores evidencian la actividad bactericida de la MOF.

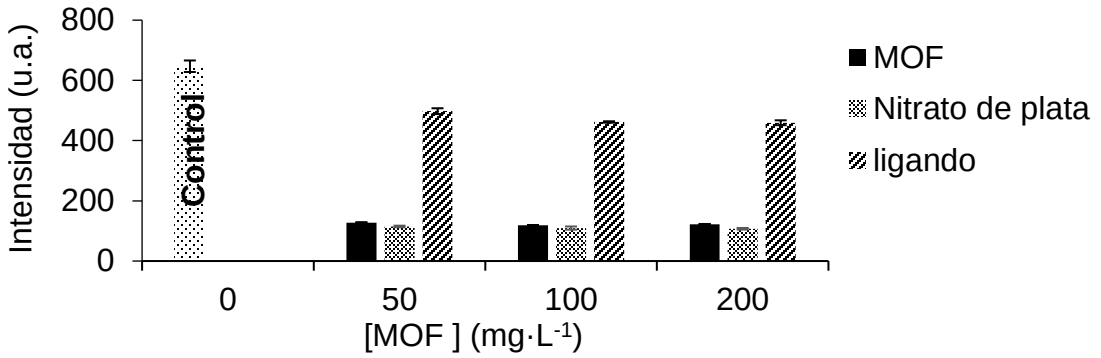


Figura 5.4. Actividad enzimática de *E. coli* en presencia de distintas concentraciones de MOF AgBDC, $AgNO_3$ y ligando.

5.2. Ensayos en recubrimiento

La MOF **AgBDC** al estar en suspensión presentó actividad bactericida sobre *E. coli* en las concentraciones más altas, por lo que se decidió probar su efecto en forma de recubrimiento. Inicialmente, se evaluó la estabilidad estructural de las películas en el medio $NB_{s/Cl}$, con el fin de evaluar el comportamiento durante el tiempo. En el análisis de resultados se determinó, que el tamaño de partícula varió en función del tiempo, oscilando significativamente.

Durante las primeras 20 h el tamaño (nm) máximo fue de 20.3 y el mínimo fue de 17.5, a 48 h el tamaño disminuyó hasta 12 nm. A 96 h (4 días) bajó a 6.4, para finalmente estabilizarse en 4.7 a 168 h (7 días), ver Figura 5.5. y el índice de polidispersidad también se mantuvo estable entre 0.45 y 0.55 (u.a.) durante 7 días de medición.

De forma contrastante, el potencial-ζ (mV), durante las primeras 20 h osciló entre -8.6 y -24.2, a 48 h el potencial se mantuvo en -21.4. A 96 h (4 días) subió (se desestabilizó) a -15.6 nm, para finalmente mantenerse en -13.9 a 168 h (7 días), ver Figura 5.5.

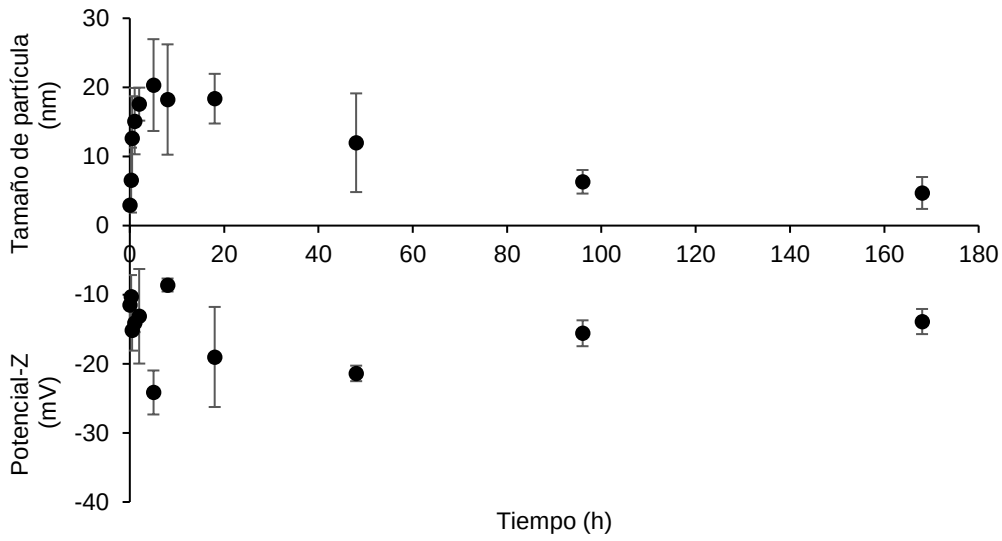


Figura 5.5. Tamaño y potencial- Z durante el tiempo del recubrimiento de MOF AgBDC en medio NB $_{s/Cl}$.

Tanto el tamaño (nm), como el potencial-ζ (mV) determinado a tiempos largos, tienden a ser los obtenidos experimentalmente para nanopartículas de Ag [42]. Esto puede ocurrir debido a que también se ha determinado experimentalmente que cuando se tienen precursores de plata con ligandos orgánicos como en la MOF **AgBDC**, inorgánicos como en $AgNO_3$, medios de cultivo diversos o inclusive con microorganismos como *Escherichia hermannii*, *Citrobacter sedlakii* y *Pseudomonas putida* [42-45], se propician condiciones redox adecuadas para (bio)sintetizar AgNPs. En el presente trabajo es muy probable que, en las condiciones experimentales empleadas, a partir de la MOF **AgBDC** también se haya llegado a la obtención de AgNPs, solo que, empleando un precursor de plata estructurado a través de una MOF, con una cinética para este proceso como la que se evidencia en la Figura 5.5.

De acuerdo con los resultados anteriores, se pudo concluir, que muy probablemente exista transformación de **AgBDC** a AgNPs, sin desprendimiento de la película, ya que desde el tiempo cero los valores se mantuvieron constantes.

En las pruebas de viabilidad bacteriana se evalúo: el sobrenadante para determinar el crecimiento en suspensión, y el recubrimiento. En la Figura 5.6a se presenta el

conteo de colonias de la suspensión y el recubrimiento (película), comparados con los controles. Como se puede observar, el crecimiento bacteriano se vió afectado en ambas partes, debido a la presencia de AgNPs en la suspensión, obtenidas a partir de la MOF **AgBDC** al estar en contacto con el medio de cultivo y al recubrimiento de **AgBDC**.

En la Figura 5.6b se muestra la densidad óptica del sobrenadante comparado con el control. Se obtuvo un valor de absorbancia muy pequeña (~0.042 u.a.) para la suspensión del recubrimiento de MOF, lo que quiere decir, que había pocas bacterias vivas en ese medio. Además, se calculó el porcentaje de inhibición con respecto al control, obteniendo un 94 %.

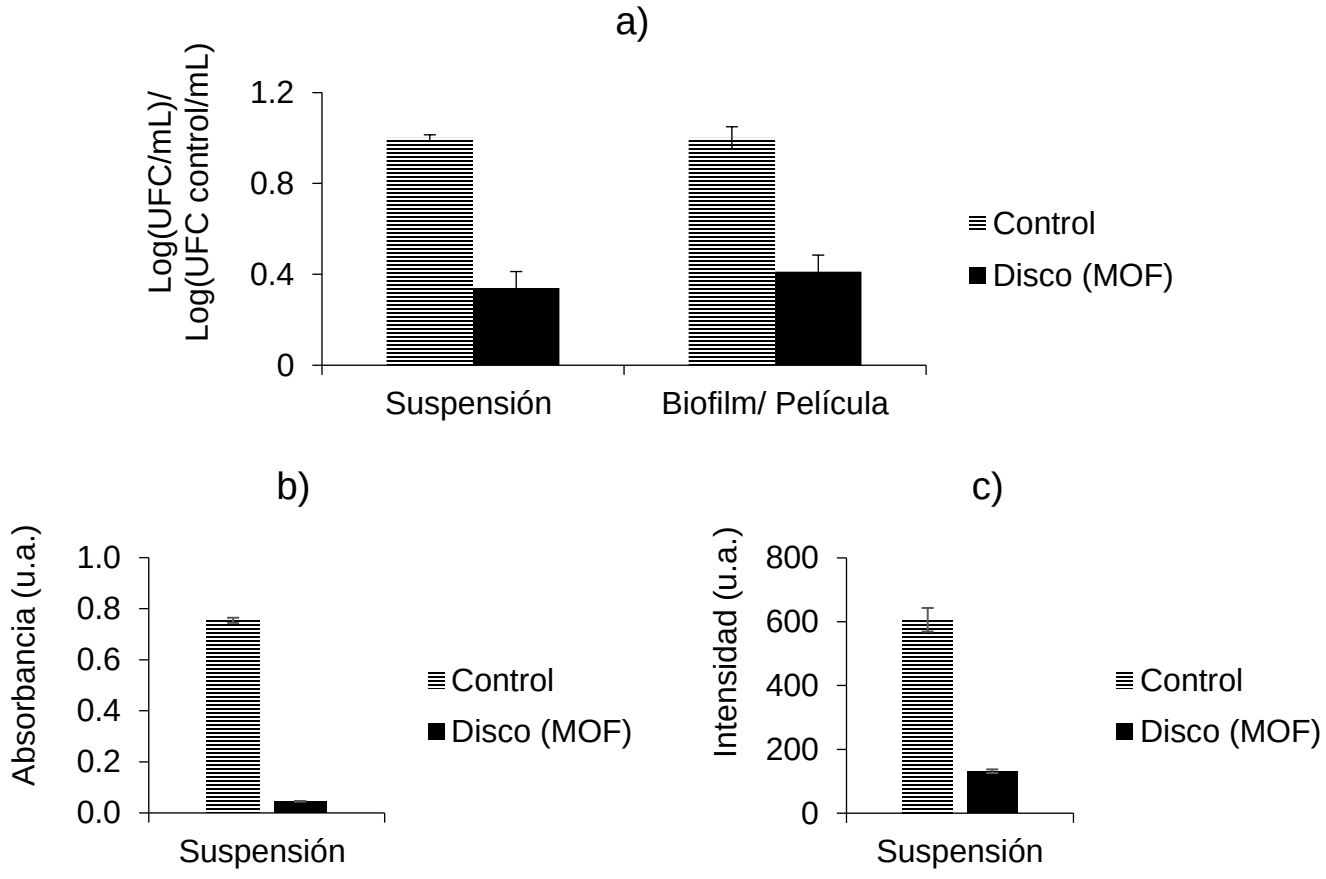


Figura 5.6. Viabilidad bacteriana de *E. coli* en presencia de un recubrimiento de MOF AgBDC después de 18 h, a) conteo de colonias, b) densidad óptica y c) actividad enzimática.

Adicionalmente, la intensidad medida cuando está presente el recubrimiento, es menor en comparación con el control (Figura 5.6c), lo que comprueba el resultado anterior, ya que se puede atribuir a las pocas bacterias vivas en la suspensión las cuales están estresadas al estar en contacto con un agente dañino.

En la Figura 5.7 se presentan las micrografías obtenidas de MEB y CLSM, del recubrimiento de MOF comparado con el biofilm formado después de 18 h. Como se puede observar el biofilm (control) tiene apariencia de mucosidad y está formado por la aglomeración de las bacterias. Mientras que en la micrografía del recubrimiento de la MOF sobre el disco se identificaron algunas bacterias. Cabe mencionar que se realizó una exploración por todo el recubrimiento, con el fin de evaluar que la presencia de bacterias era muy baja. Por lo que, el recubrimiento de MOF inhibe el crecimiento bacteriano.

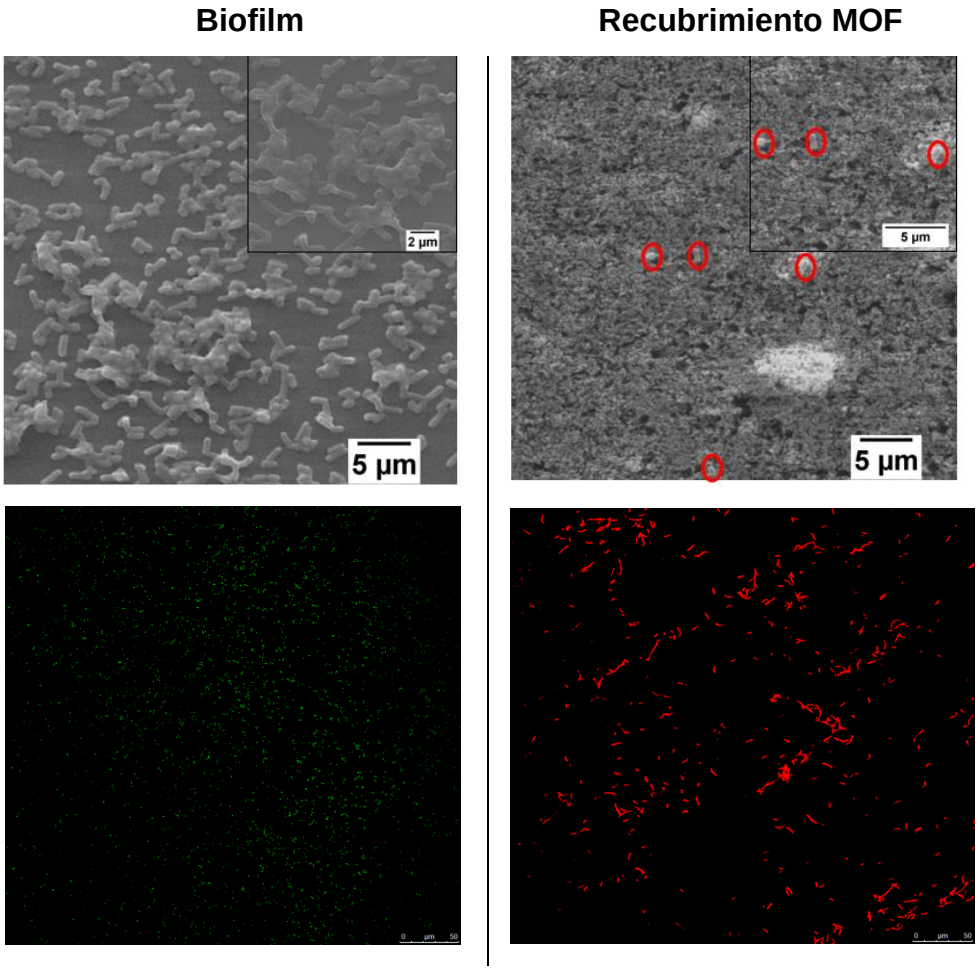


Figura 5.7. Micrografías del MEB y CLSM del biofilm y el recubrimiento del MOF AgBDC después de 18 h de contacto.

Adicionalmente se complementa el resultado con la observación por microscopía confocal, en donde en el biofilm se aprecian puntos de color verde, Figura 5.7 izq., lo que representa a las bacterias vivas, mientras que en el recubrimiento los puntos rojos se deben a las bacterias muertas, Figura 5.7 der., evidenciando la actividad de la MOF en forma de recubrimiento ante *E. coli*.

Con la finalidad de evaluar si el efecto de inhibición era prolongado, se aumentaron los días de contacto con la bacteria. En la Figura 5.8a se presenta el conteo de colonias tanto para la suspensión como para los recubrimientos. Como se observa, la inhibición es similar después de 18 h y de 7 días de contacto, tanto para la suspensión como para el recubrimiento, por lo que la actividad bactericida ocurrió durante las primeras horas del experimento y se mantuvo.

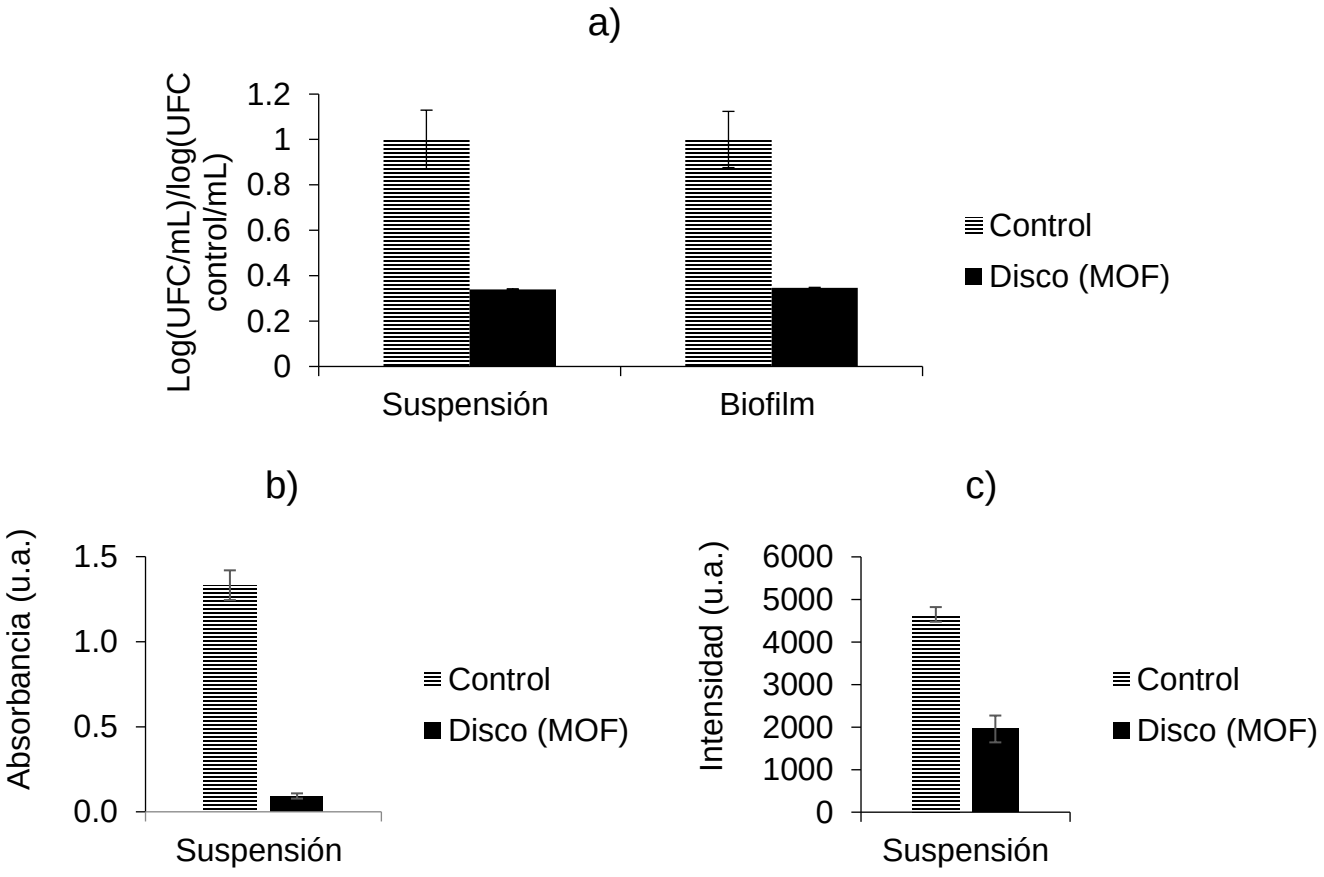


Figura 5.8. Viabilidad bacteriana de *E. coli* en presencia de un recubrimiento de MOF AgBDC después de 7 días, a) conteo de colonias, b) densidad óptica y c) actividad enzimática.

En la densidad óptica también se conservaron las absorbancias pequeñas después de 7 días como se observa en la Figura 5.8b, manteniendo un 93 % de inhibición. En la actividad enzimática, se observó menor actividad en presencia de la película, comprobando la baja población bacteriana, como se observa en la Figura 5.8c.

Adicionalmente, para evaluar visualmente la inhibición de la película, se presenta la fotografía del ensayo después de 7 días de contacto (Figura 5.9). Los pozos del lado izquierdo pertenecen a los controles, estos son muy turbios, lo que significa que hay un alto crecimiento bacteriano. Mientras que, los pozos del lado derecho contienen los discos con los recubrimientos, y se puede apreciar que no presentan turbidez.

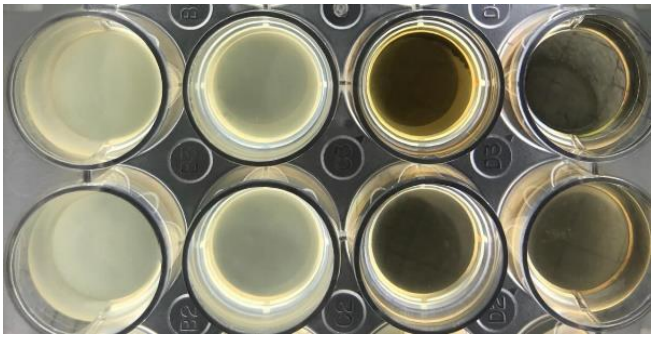


Figura 5.9. Fotografía del ensayo de actividad de la película de MOF y el control sobre *E. coli,* después de 7 días.

En la Figura 5.10 se presentan las micrografías obtenidas por MEB y CLSM, del recubrimiento de MOF comparado con el biofilm formado después de 7 días. En este caso, las micrografías obtenidas por CLSM las bacterias fueron teñidas con el kit Live/ Dead y con el fluorocomo calcofluor (color azul) para evaluar la viabilidad. Se aprecia del lado izquierdo la formación del biofilm después de 7 días, el cual contiene más población bacteriana aglomerada, en comparación con el de 18 h. Mientras que, del lado derecho se presenta el recubrimiento en donde no se encontró presencia elevada de bacterias, debido a su inhibición, nuevamente evidenciando el efecto marcado de actividad bactericida en este recubrimiento.

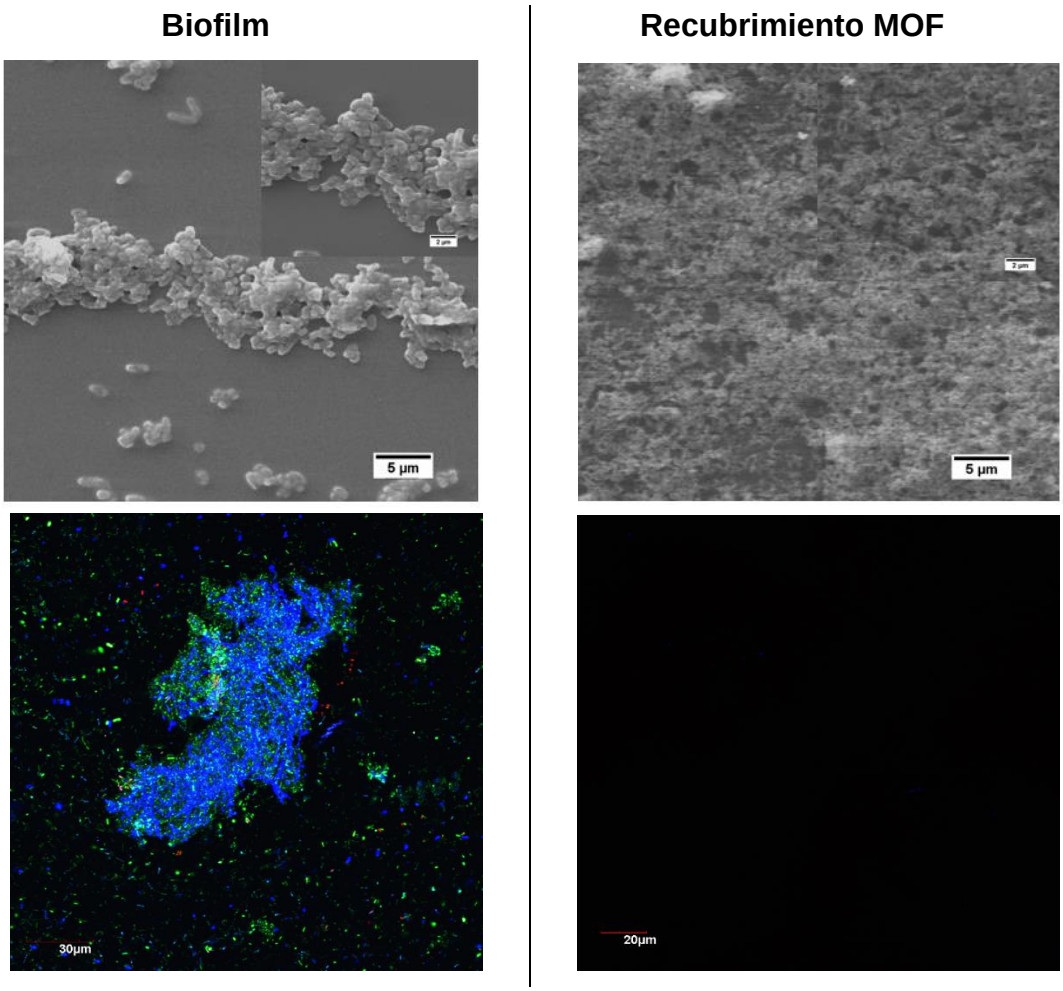


Figura 5.10. Micrografías de MEB de biofilm formado por *E. coli* y recubrimiento de MOF AgBDC, después de un contacto de 7 días.

5.3. Actividad bactericida diferencial entre gram-positivas / gram-negativas debido a MOF AgBDC

La MOF **AgBDC** presentó mayor actividad bactericida sobre las bacterias gram-negativas (*E. coli*) en comparación con las gram-positivas (*S. aureus*), cuando se encuentra a una concentración de 20 mg·L^{-1} de MOF en suspensión. *S. aureus* es una de las bacterias más fuertes, resistentes y puede adaptarse rápidamente manteniendo un estado latente hasta lograr proliferar [9], por lo que se considera que al aumentar la concentración de MOF se podría favorecer la inhibición. En la Figura 5.11 se ejemplifica la posible interacción y daños de las bacterias con la MOF. Es probable que *S. aureus* no haya sido afectada ya que la MOF no logró penetrar la pared celular debido al sistema de defensa de la bacteria. Tal como lo estudiaron Feng *et al*. por medio de cambios morfológicos encontraron que *S. aureus* presentó un mejor sistema de defensa y que la capa gruesa de petidoglicanos le brinda protección ante iones o compuestos de plata, en comparación con *E. coli* [11]. Mientras que *E. coli* presentó mayor inhibición con la MOF **AgBDC** y podría estar sufriendo daños metabólicos debido a la penetración en la pared celular, de la misma manera que algunos investigadores describen el posible mecanismo de la acción de la plata [10, 11, 14, 15].

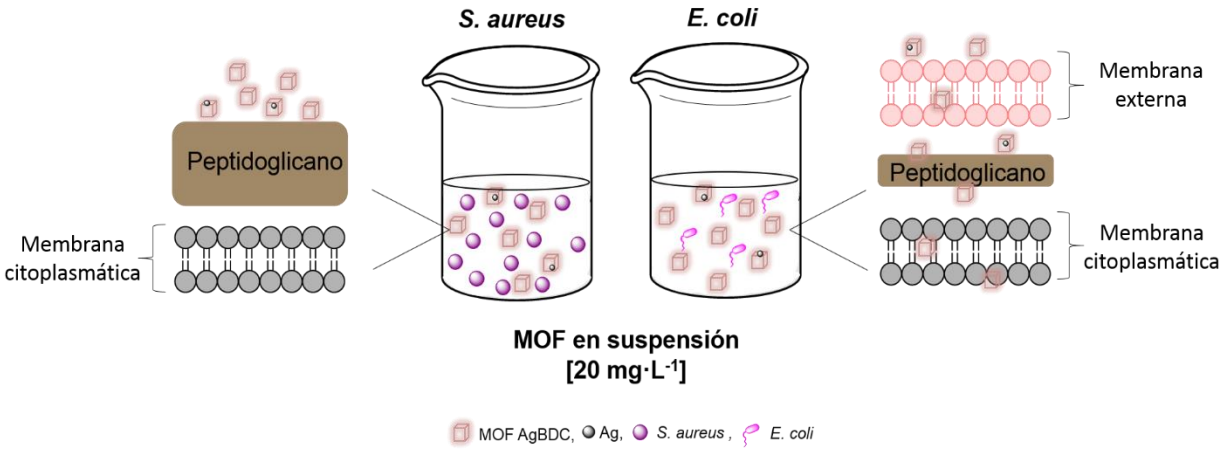


Figura 5.11. Representación de la acción bactericida de la MOF AgBDC/AgNPs en suspensión sobre *S. aureus* y *E. coli*.

La actividad bactericida de la MOF **AgBDC** en suspensión sobre *E. coli* aumentó conforme incrementó la concentración, siguiendo el mismo comportamiento que el nitrato de plata, y con una dosis letal media (LDS_{50} [=] $mg \cdot L^{-1}$) entre 50 y 100 para **AgBDC** y entre 20 y 50 para $AgNO_3$.

De acuerdo con lo analizado en el Capítulo 4 el sistema **AgBDC** en suspensión no experimenta cambios coloidales, por lo que la dispersión del material y la concentración, se consideran factores que favorecen la actividad.

5.4. Actividad bactericida de MOF AgBDC: suspensión vs recubrimiento

La inhibición sobre *E. coli*, es más alta cuando se forman películas de MOF, que cuando se encuentra en suspensión. Esto se puede atribuir a que al formar una película el material se acomoda y compacta de tal manera que favorece la estabilidad de la estructura y la adherencia del recubrimiento sobre la matriz, previniendo el desprendimiento o degradación rápida del material [46]. Además, al formar un recubrimiento el material podría tener una mayor área de contacto con las bacterias, que cuando se encuentra en suspensión, por lo que la inhibición aumenta y favorece el efecto prolongado (7 días), como se ilustra en la Figura 5.12. Adicionalmente, de acuerdo con los experimentos en recubrimiento del DLS, se determinó que probablemente estos sistemas se transformen de manera redox en presencia del medio $NB_{s/Cl}$ de **AgBDC** a AgNP, dando como resultado una mezcla de ambas fases y a su vez potencializando la actividad bactericida. A pesar de que, en ambos casos probablemente exista la formación de AgNP, al estar en suspensión las nanopartículas podrían estar adheridas a la MOF ya que los tamaños de partículas más pequeños obtenidos en DLS se encuentran entre 100-200 nm. Mientras que el tamaño de partículas en el sobrenadante para el caso del recubrimiento fue de 4.7 nm, atribuyéndolo a tamaños reportados de las AgNP. Dicha diferencia podría influir en el aumento de la actividad del recubrimiento.

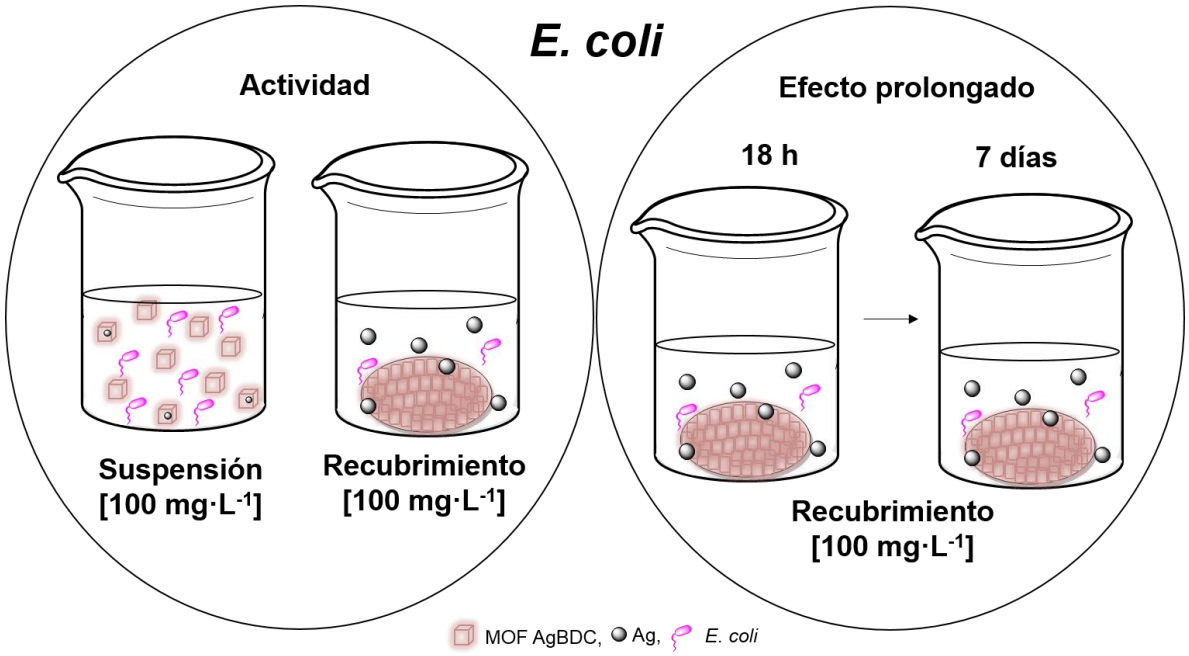


Figura 5.12. Representación de la actividad bactericida de la MOF AgBDC/ AgNP en suspensión y en recubrimiento sobre E. coli y su efecto prolongado.

Conclusiones generales

En este proyecto se sintetizaron tres redes metal orgánicas de plata a partir de los ligandos: ácido benceno-1,4-dicarboxílico (**BDC**), ácido 2,6 naftaleno dicarboxílico (**NDC**) y ácido 2,6-piridindicarboxílico (**PDC**) en rendimientos de moderados a bajos en función del ligando orgánico empleado, que van de 43, 48 y 21 % respectivamente.

Los materiales presentaron estructura cristalina y tamaños de cristal en el orden de nanómetros, con diferentes propiedades fisicoquímicas, debido a la variación de los ligandos.

En FT-IR los tres materiales presentaron bandas ubicadas entre 1487 y 1693 cm^{-1}, pertenecientes al estiramiento asimétrico entre aniso- e iso-bidentado del grupo COO^- que en general interacciona con tres átomos de Ag. Adicionalmente, se encontraron bandas pertenecientes a las interacciones entre Ag-O, evidenciando la coordinación y formación de las redes.

Específicamente, para **AgPDC** se encontraron bandas adicionales (1631 y 1693 cm^{-1}) correspondientes al estiramiento asimetrico anisobidentado del grupo carboxilato y al éster metálico. Finalmente, para **AgNDC** se localizó una pequeña banda en 1593 cm^{-1} referente a un puente anisobidentado.

Las MOF **AgBDC** y **AgNDC** presentaron estabilidad térmica de 330 y 350 °C respectivamente, mientras que **AgPDC** presentó tres procesos de degradación, el primero en 100 °C, el segundo en 240 °C y el tercero en 280 °C. Adicionalmente se determinó que la plata incorporada en los materiales al ser tratada térmicamente en el ATG da lugar a nanopartículas de plata.

Las MOF **AgBDC** y **AgNDC** son estables en medio acuoso, sin embargo, **AgPDC** pierde cristalinidad. De cualquier manera, los materiales son inestables en los medios que contenían cloro, promoviendo la formación del cloruro de plata por un efecto de ácidos y bases duros y blandos.

La MOF **AgBDC** presentó estabilidad coloidal en agua y medio de cultivo NB sin cloro. Sin embargo, la concentración se considera un factor que afecta la aglomeración de las partículas en suspensión. Dicha MOF presentó actividad bactericida, en suspensión (20 $mg \cdot L^{-1}$), sobre la bacteria *E. coli*, con la misma tendencia que el nitrato de plata, es decir, el aumento de concentración favorece la inhibición.

La dosis letal media (LDS_{50} [=] $mg \cdot L^{-1}$) se encuentra entre 50 y 100 para **AgBDC** y entre 20 y 50 para $AgNO_3$ sobre *E. coli.* Además, se observó que la actividad bactericida es mayor cuando el material se encuentra en forma de película o recubrimiento comparada con la suspensión.

La película se considera un sistema híbrido de tipo **AgBDC**/AgNP, debido a las reacciones redox que propician la formación de AgNP a partir de la MOF **AgBDC** en presencia del medio de cultivo. Dicho sistema favoreció la actividad bactericida presentando efecto inmediato y prolongado. Sin embargo, no es trivial determinar el por qué ocurren dichas diferencias con los resultados actuales.

Una conclusión muy importante es que la MOF **AgBDC** se considera un sistema con alto potencial para aplicaciones biológicas, debido a su comportamiento como agente bactericida al instante y persistente, el cual le brinda la plata al estar estructurada y además se comienza a comprender su mecanismo de acción.

Referencias

[1] T. Simon-Yarza, S. Rojas, P. Horcajada, C. Serre, The Situation of Metal-Organic Frameworks in Biomedicine, in: P. Ducheyne (Ed.) Comprehensive Biomaterials II, Elsevier, Oxford, 2017, pp. 719-749.

[2] S. Loera-Serna, L.L. Núñez, J. Flores, R. López-Simeon, H.I. Beltrán, An alkaline one-pot metathesis reaction to give a [$Cu_{3(}BTC)_2$] MOF at r.t., with free Cu coordination sites and enhanced hydrogen uptake properties, RSC Advances, 3 (2013) 10962-10972.

[3] X. Lu, J. Ye, D. Zhang, R. Xie, R.F. Bogale, Y. Sun, L. Zhao, Q. Zhao, G. Ning, Silver carboxylate metal–organic frameworks with highly antibacterial activity and biocompatibility, Journal of Inorganic Biochemistry, 138 (2014) 114-121.

[4] W.H. Organization, Resistencia a los antibióticos, World Health Organization, Web, 2018.

[5] Coutiño Rodríguez Elda Maria del Rocío, P.G.R. Anaís, Los compuestos de plata y la salud, Altepepaktli : salud de la comunidad, 3 (2007) 29-38.

[6] S. Prabhu, E.K. Poulose, Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects, International Nano Letters, 2 (2012) 32.

[7] M.T. Madigan, Brock. Biologia de los microorganismos, Pearson Educación, Madrid, 2015.

[8] P.R. Murray, K.S. Rosenthal, M.A. Pfaller, Microbiologia Médica, Elsevier, Barcelona, 2017.

[9] A. Pumarola, Microbiologia y parasitologia medica, Salvat, España, 1990.

[10] M. Rai, A. Yadav, A. Gade, Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials, Biotechnology Advances, 27 (2009) 76-83.

[11] Q. Feng, J. Wu, G.-Q. Chen, F.-Z. Cui, T. N. Kim, J. O. Kim, A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions onEscherichia coli andStaphylococcus aureus, 52 (2000) 662-668.

[12] I. Sondi, B. Salopek-Sondi, Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria, Journal of Colloid and Interface Science, 275 (2004) 177-182.

[13] A.R. Shahverdi, A. Fakhimi, H.R. Shahverdi, S. Minaian, Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against

Staphylococcus aureus and Escherichia coli, Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 3 (2007) 168-171.

[14] G. Wyszogrodzka, B. Marszałek, B. Gil, P. Dorożyński, Metal-organic frameworks: mechanisms of antibacterial action and potential applications, Drug Discovery Today, 21 (2016) 1009-1018.

[15] L.J. Wilkinson, R. White, J.K. Chipman, Silver and nanoparticles of silver in wound dressings: A review of efficacy and safety, 20 (2011) 543-549.

[16] M.L. López, S. Loera, Redes metalorgánicas: materiales que respiran Materiales Avanzados, 18 (20120) 27-33.

[17] S. Loera-Serna, M.A. Oliver-Tolentino, M. de Lourdes López-Núñez, A. Santana-Cruz, A. Guzmán-Vargas, R. Cabrera-Sierra, H.I. Beltrán, J. Flores, Electrochemical behavior of $[Cu_3(BTC)_2]$ metal–organic framework: The effect of the method of synthesis, Journal of Alloys and Compounds, 540 (2012) 113-120.

[18] K.K. Gangu, S. Maddila, S.B. Jonnalagadda, A review on synthesis, crystal structure and functionality of naphthalenedicarboxylate ligated metal-organic frameworks, Inorganica Chimica Acta, 466 (2017) 308-323.

[19] S.K. Papageorgiou, E.P. Kouvelos, E.P. Favvas, A.A. Sapalidis, G.E. Romanos, F.K. Katsaros, Metal–carboxylate interactions in metal–alginate complexes studied with FTIR spectroscopy, Carbohydrate Research, 345 (2010) 469-473.

[20] N. Stock, S. Biswas, Synthesis of Metal-Organic Frameworks (MOFs): Routes to Various MOF Topologies, Morphologies, and Composites, Chemical Reviews, 112 (2012) 933-969.

[21] K.K. Gangu, S. Maddila, S.B. Mukkamala, S.B. Jonnalagadda, A review on contemporary Metal–Organic Framework materials, Inorganica Chimica Acta, 446 (2016) 61-74.

[22] M. Ipohorski, P. Bozzano, Microscopia electrónica de barrido en la caracterización de materiales, Ciencia e Investigación 63 (2013) 43-53.

[23] D.A. Skoog, F.J. Holler, S.R. Crouch, S. Cervantes González, M.B. Anzures, Principios de análisis instrumental, Cengage Learning, México, 2018.

[24] M. Martinez, Análisis de parámetros microestructurales: tamaño de cristalita y microdeformación de compuestos tipo Hidrotalcita de cobalto, Instituto Politécnico Nacional, México, 2012.

[25] K. Sing, The use of nitrogen adsorption for the characterisation of porous materials, 2001.

[26] C. Wilninsun, Quimica Inorganica Avanzada, Limusa, México 1988.

[27] C.E. Housecroft, A.G. Sharpe, P. Gil Ruiz, J.I. Álvarez Galindo, Química Inorgánica, Pearson Educación, Madrid, 2006.

[28] X.-Q. Wu, G.-X. Wen, Y.-P. Wu, W.-W. Dong, J. Zhao, D.-S. Li, A novel 3D Ag(I)-MOF: Surfactant-directed syntheses and catalytic degradation of o/m/p-Nitrophenol, Journal of Solid State Chemistry, 242 (2016) 243-247.

[29] H. Guo, Y. Zhang, Z. Zheng, H. Lin, Y. Zhang, Facile one-pot fabrication of Ag@MOF(Ag) nanocomposites for highly selective detection of 2,4,6-trinitrophenol in aqueous phase, Talanta, 170 (2017) 146-151.

[30] I. Ghiuță, D. Cristea, C. Croitoru, J. Kost, R. Wenkert, I. Vyrides, A. Anayiotos, D. Munteanu, Characterization and antimicrobial activity of silver nanoparticles, biosynthesized using Bacillus species, Applied Surface Science, 438 (2018) 66-73.

[31] K. Martín-Betancor, S. Aguado, I. Rodea-Palomares, M. Tamayo-Belda, F. Leganés, R. Rosal, F. Fernández-Piñas, Co, Zn and Ag-MOFs evaluation as biocidal materials towards photosynthetic organisms, Science of The Total Environment, 595 (2017) 547-555.

[32] D. Sun, R. Cao, W. Bi, J. Weng, M. Hong, Y. Liang, Syntheses and characterizations of a series of silver-carboxylate polymers, Inorganica Chimica Acta, 357 (2004) 991-1001.

[33] J. Coates, Interpretation of infrared spectra, a practical approach, Encyclopedia of analytical chemistry, 12 (2000) 10815-10837.

[34] R.M. Silverstein, D.J. Kiemle, F.X. Webster, D.L. Bryce, Spectrometric identification of organic compounds, John Wiley & Sons, New York, 2015.

[35] H. Guo, Y. Zhang, Z. Zheng, H. Lin, Y. Zhang, Facile one-pot fabrication of Ag@ MOF (Ag) nanocomposites for highly selective detection of 2, 4, 6-trinitrophenol in aqueous phase, Talanta, 170 (2017) 146-151.

[36] Z.-J. Zhang, H.-Y. Liu, S.-Y. Zhang, W. Shi, P. Cheng, A rare 2D coordination polymer of graphite-like structure extended by infinite silver–oxygen–silver bonds, Inorganic Chemistry Communications, 12 (2009) 223-226.

[37] S.-M. Fang, M. Hu, Q. Zhang, M. Du, C.-S. Liu, Ag(i) and Zn(ii) coordination polymers with a bulky naphthalene-based dicarboxyl tecton and different 4,4′-bipyridyl-like bridging co-ligands: structural regulation and properties, Dalton Transactions, 40 (2011) 4527-4541.

[38] J.D. Robertson, L. Rizzello, M. Avila-Olias, J. Gaitzsch, C. Contini, M.S. Magoń, S.A. Renshaw, G. Battaglia, Purification of Nanoparticles by Size and Shape, Scientific Reports, 6 (2016) 27494.

[39] C.-A. Lu, P. Lin, H.-C. Lin, S.-F. Wang, Characterization of the Low-Curing-Temperature Silver Paste with Silver 2-Ethylhexanoate Addition, Japanese Journal of Applied Physics, 46 (2007) 251-255.

[40] S. Lowell, J.E. Shields, M.A. Thomas, Characterization of porous solids and powders surface area, pore size and density, Springer, Dordrecht, 2011.

[41] S. Yuan, L. Feng, K. Wang, J. Pang, M. Bosch, C. Lollar, Y. Sun, J. Qin, X. Yang, P. Zhang, Q. Wang, L. Zou, Y. Zhang, L. Zhang, Y. Fang, J. Li, H.-C. Zhou, Stable Metal–Organic Frameworks: Design, Synthesis, and Applications, Advanced Materials, 30 (2018) 1704303.

[42] A.T.M. Saeb, A.S. Alshammari, H. Al-Brahim, K.A. Al-Rubeaan, Production of Silver Nanoparticles with Strong and Stable Antimicrobial Activity against Highly Pathogenic and Multidrug Resistant Bacteria, The Scientific World Journal, 2014 (2014) 9.

[43] K. Luo, S. Jung, K.-H. Park, Y.-R. Kim, Microbial Biosynthesis of Silver Nanoparticles in Different Culture Media, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 66 (2018) 957-962.

[44] Q. Sun, X. Cai, J. Li, M. Zheng, Z. Chen, C.-P. Yu, Green synthesis of silver nanoparticles using tea leaf extract and evaluation of their stability and antibacterial activity, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 444 (2014) 226-231.

[45] H. M.J., M. M.S., Study of morphology and Zeta Potential for the Silver Nanoparticles, International Journal of Scientific and Engineering Research, 5 (2014).

[46] S. Yang, Q. Zou, T. Wang, L. Zhang, Effects of GO and MOF@GO on the permeation and antifouling properties of cellulose acetate ultrafiltration membrane, Journal of Membrane Science, 569 (2019) 48-59.

Anexo A

El porcentaje de cristalinidad que perdió **AgPDC** en la evaluación de la estabilidad de la estructura en H_2O milli-Q se utilizaron las ecuaciones descritas a continuación:

$$Intensidad\ total\ (I_T) = \sum I_{cristalina} + \sum I_{amorfa}$$

$$\%Cristalinidad = \frac{\sum I_{cristalina}}{\sum I_T}$$

Para la suma de las intensidades se seleccionaron 10 picos de la parte cristalina y 10 puntos de la línea base (parte amorfa) como se muestra en la figura A1, para ambos difractogramas.

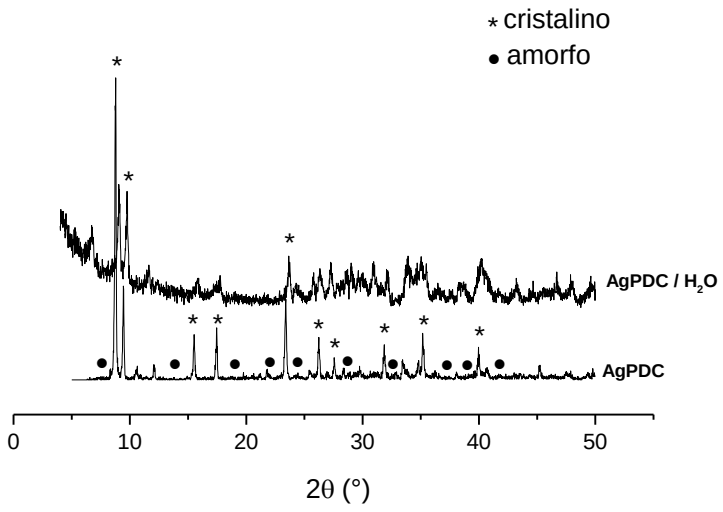


Figura A.1. Difractograma de la estabilidad estructural de AgPDC en contacto con H_2O durante 24 h.