

Para realizar la prueba de adsorción de mercurio en la zeolita funcionalizada obtenida mediante el Ejemplo 1, se preparó una solución de 500 mL de $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ a una concentración inicial de 800 ppm a la cual se le adicionaron 150 mg de ácido ascórbico (para llevar el Hg^{+2} a Hg^0) y de esta solución se tomaron 250 mL los cuales fueron pasados a través de una columna de 60mL empacada con 20g de la zeolita funcionalizada. Para comparar el efecto de la adsorción, se preparó una segunda columna con zeolita no funcionalizada a través de la cual se filtraron otros 250 mL de la misma solución dopada con Hg.

La cuantificación del Hg^0 retenido por la zeolita se realizó analizando por absorción atómica el filtrado antes y después de pasar por la columna de filtración, encontrando una retención del 70% al contacto inicial con la zeolita funcionalizada, con una captación por gramo de 6,92mg de Hg, en comparación con un 57% de retención en la zeolita no tratada para una captura de 5,66 mg de Hg por gramo empleado. En la FIG. 2 se observa una micrografía de la superficie de la zeolita funcionalizada.

Ejemplo 3. Producción de carbón activado modificado con nanopartículas metálicas

El carbón activado (CA) fue preparado de bagazo de fique mediante combustión en un horno de pirólisis a temperaturas entre 700 y 800 °C entre 1 y 2 horas bajo flujo constante de nitrógeno (0,5 mL/min). Una vez obtenido, el CA fue lavado con agua desionizada y se secó en un horno de tiro forzado a 105°C por 1,5 horas. La fijación se realizó mezclando 0,5 g CA con 5mL de AgNO_3 en concentraciones de 19 y 38 mM (1 y 2%), la mezcla se agitó a 100 rpm durante 1,5 horas. El CA se filtró y se secó en horno a 105°C por dos horas aproximadamente. Posteriormente se realizó la reducción del Ag^{2+} dispuesto en el CA, adicionando 5 mL del extracto verde o agente reductor y agitando a 100rpm durante 12 o 24 horas. El CA funcionalizado se lavó con agua DI y se secó en un horno a 105°C por 4 a 6 horas.

El CA con las AgNO_3 fue caracterizado mediante un microscopio electrónico de barrido SEM JEOL JSM 6490 LV, con magnificación de 30000X (FIG. 3). A su vez se empleó la espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS) para conocer los elementos que se encontraban en la superficie de los sustratos (FIG. 4).

Ejemplo 4. Prueba del material como bactericida

Para comprobar el poder antibacterial del CA funcionalizado en el Ejemplo 3 con AgNP's, se realizó una prueba de zona de inhibición, donde se determinó como variable de respuesta, el halo de inhibición de crecimiento en tres microorganismos: *Escherichia coli* (*E. coli*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) y *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*).

Esta prueba contó con un diseño de experimentos de un factor categórico individual, donde los factores y los niveles se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Variables consideradas en la prueba de inhibición de microorganismos con CA y AgNP's

FACTOR	VARIACIÓN
Tipo de Material	Carbon Activado (CA)
Tipo de Microorganismo	<i>E. coli</i> ; <i>P. aeruginosa</i> ; <i>S. aureus</i>
Concentración de AgNO ₃	19 (1%) y 38 (2%) mM
Tiempo de reducción con extracto verde	12 h; 24 h

Los microorganismos empleados en esta prueba fueron *S. aureus*-cepa ATCC:25923 (Biosafety level (BSL 2), *P. aeruginosa*-cepa ATCC 27853 (BSL 2) y *E. coli*-cepa ATCC 25922 (BSL 1), todos ellos se obtuvieron en el Instituto de Medicina Trópic

El desarrollo de la prueba se basó en la inoculación de los microorganismos en cajas de Petri para posteriormente instalar discos con el sustrato que contienen AgNP's (Sensidiscos) y verificar la inhibición en el crecimiento de las colonias. Los microorganismos se cultivaron a partir de la remoción de las cepas de crioviales a -60°C, las cuales se frotaron sobre la superficie de agar tripticasa soya. Los agares con los microorganismos fueron incubados a 37°C por 24 horas.

Una vez inoculados los microorganismos en los agares Mueller Hinton, se instalaron discos con peso de 7,5 mg y radio de 3mm sobre los cuales se dispusieron aproximadamente 3 mg de CA funcionalizado. Como control negativo, se tomaron pruebas similares con CA sin fijación de nanopartículas y como control positivo los sensidiscos con medicamentos antibacteriales. Estas placas se llevaron a incubación a 37 °C durante 24 horas. Los halos de inhibición fueron determinados a través del software NIS-Elements. Los resultados del diseño experimental fueron consignados en el software estadístico Statgraphics Centurion XVI.II con un intervalo de confianza del 95%.

Tabla 2. Resultados de halos de inhibición de crecimiento de microorganismos por CA funcionalizado con AgNP's

Material	Halo de Inhibición de crecimiento bacteriano (mm)		
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
1% 12 h	9,730	10,823	11,503
1% 24 h	10,230	10,537	11,107
2%, 12 h	12,237	13,667	12,947
2% 24 h	11,403	12,047	12,193
Carbón Activado sin	No aparece	No aparece	No aparece

Material	Halo de Inhibición de crecimiento bacteriano (mm)		
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
AgNPs			
Penicilina (P)	No aparece	No aparece	36,203
Ampicilina (AMP)	22,513	No aparece	40,271
Tetraciclina (TE)	25,094	10,510	-
Gentamicina (CN)	21,729	21,677	-
Eritromicina (E)	13,191	13,279	-

Ejemplo 5. Prueba de filtración de aguas contaminadas con agentes patógenos del material del Ejemplo 4 (CA + AgNP’s).

Se encontró que en todos los casos, el tratamiento con mayor dosis de AgNO₃ dispuesto sobre el material (2% correspondiente a una concentración de 18 mM) y el tiempo de reducción con el extracto verde de 12 h, generó un mayor halo de inhibición con todos los microorganismos ensayados. Es así como este material funcionalizado se empacó en la fabricación de una columna de filtración de 25 mL, empacada con varias dosis de CA + AgNP’s desde 0,034 hasta 1,16 g, y un control negativo con CA sin nanopartículas; a través de las columnas se filtraron 10 mL de agua con E.Coli. Antes y después de la filtración se inoculó el agua en un medio de agar tripticasa soya y se obtuvo el porcentaje de eliminación.

Se encontró que partir de 0,2 g de material el porcentaje de eliminación de los microorganismos fue total logrando una eficiencia del 100% independientemente del factor de dilución utilizado (Tabla 3). Varios autores han discutido como las nanopartículas de plata logran este efecto descontaminante, Matsumura y asociados comentan que los iones de plata interactúan con los grupos funcionales de las bacterias, causando inactivación de las enzimas respiratorias generando daños en su estructura celular (Matsumura, Yoshikata, Kunisaki, & Tsuchido, 2003), sin embargo vale la pena destacar que por el alta área superficial de las AgNPs cuando los microorganismos entran en contacto con las nanopartículas de plata, la membrana celular se ve comprometida ya que se generan pozos, causando mayor permeabilidad y posterior muerte (Sondi & Salopek-Sondi, 2004).

Tabla 3. Eficiencia de CA + AgNPs en filtración de aguas con patógenos en diversos factores de dilución

Masa de la muestra (g)	Factor de Dilución (UFC/mL)	Antes del filtro (UFC/mL)	Después del Filtro (UFC/mL)	% Eficiencia
0,034	10 ⁻⁴	484	296	38,843
0,2	10 ⁻¹	10000000	0	100
0,2	10 ⁻⁵	248	0	100

Masa de la muestra (g)	Factor de Dilución (UFC/mL)	Antes del filtro (UFC/mL)	Después del Filtro (UFC/mL)	% Eficiencia
0,6	10 ⁰	100000000	0	100
0,6	10 ⁻⁴	484	0	100