



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**“Evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano de un nuevo aditivo híbrido en formulación líquida para aves de corral utilizando nanotecnología”**

Benalcázar López, Cristian Roberto

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Angulo Paredes, Yolanda del Rocio, Ph.D.

12 de febrero 2021

## Hoja de resultados de la herramienta del Urkund



## Urkund Analysis Result

**Analysed Document:** BENALCAZAR\_TESIS\_FINAL.docx (D91420901)  
**Submitted:** 1/8/2021 4:54:00 PM  
**Submitted By:** yrangulo@espe.edu.ec  
**Significance:** 9 %

## Sources included in the report:

BENALCAZAR\_TESIS\_FINAL.docx (D90933819)  
TESIS NANOPARTICULAS 12 JUN.docx (D53777901)  
Tesis carrasquilla Arroyo G biblio.docx (D43991350)  
TESIS BRYAN.docx (D63287637)  
<https://fi-admin.bvsalud.org/document/view/wp6ka>  
<http://200.12.169.19/bitstream/25000/12812/1/T-UCE-0008-BC005-2017.pdf>  
<http://200.12.169.19/bitstream/25000/17347/1/T-UCE-0015-ODO-077.pdf>

## Instances where selected sources appear:

37

Firma:



Firmado electrónicamente por:

YOLANDA DEL  
ROCIO ANGULO  
PAREDES



**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**

**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

### **Certificación**

Certifico que el trabajo de titulación, **“Evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano de un nuevo aditivo híbrido en formulación líquida para aves de corral utilizando nanotecnología”** fue realizado por el señor **Benalcázar López Cristian Roberto** el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 26 de enero del 2021



Firmado electrónicamente por:

**YOLANDA DEL  
ROCIO ANGULO  
PAREDES**

**Angulo Paredes, Yolanda del Rocio**

C.C. 1715032718



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de autoría

Yo, **Benalcázar López, Cristian Roberto**, con C.C.: 1726920588, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Evaluación in vitro del efecto antibacteriano de un nuevo aditivo híbrido en formulación líquida para aves de corral utilizando nanotecnología”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 2 de febrero del 2021

Una firma manuscrita en tinta azul que parece leer "Cristian Roberto Benalcázar López".

**Benalcázar López, Cristian Roberto**

C.C: 1726920588

A:  
Ir:



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de publicación

Yo, **Benalcázar López, Cristian Roberto**, con C.C.: 1726920588, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“Evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano de un nuevo aditivo híbrido en formulación líquida para aves de corral utilizando nanotecnología”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 2 de febrero del 2021

Una firma manuscrita en tinta azul que parece decir 'Cristian Benalcázar'.

**Benalcázar López, Cristian Roberto**

C.C: 1726920588

A  
Ir

## **Dedicatoria**

*Dedico este título de Ingeniero a mi madre y hermana, que con su amor supo guiarme para ser la persona que soy y que gracias a su apoyo incondicional fue posible este logro académico. A mis hermanos, quienes son parte de este proceso de mejoramiento continuo.*

***Benalcázar López Cristian Roberto***

## **Agradecimientos**

*A mi Madre y hermana, por su amor incondicional, por lo que soy y seré, la cual han sido cimiento en mi vida.*

*Quiero agradecer a Ph.D Yolanda Angulo y Luis E. Trujillo, por sus enseñanza, ánimo y, sobre todo, paciencia en todo el proceso. Sus importantes comentarios me impulsaron a agudizar mi pensamiento y llevaron mi trabajo a un nivel superior.*

*A los integrantes del Centro de Nanociencia y Nanotecnología, por toda su ayuda en el laboratorio en especial a Carina Stael. Gracias a todos de corazón.*

*A la Ing. Geovana Arroyo, quienes me enseñaron las bases para elaborar esta investigación.*

*Al Dr. Calvopiña por abrirme las puertas en Laboratorio de microbiología del Hospital de Especialidades Fuerzas Armadas No. 1 para culminar el proyecto.*

## Índice de Contenido

<i>Hoja de resultados de la herramienta del Urkund .....</i>	<i>2</i>
<i>Certificado del director .....</i>	<i>3</i>
<i>Responsabilidad de autoría .....</i>	<i>4</i>
<i>Autorización de publicación .....</i>	<i>5</i>
<i>Dedicatoria .....</i>	<i>6</i>
<i>Agradecimientos .....</i>	<i>7</i>
<i>Índice de Contenido .....</i>	<i>8</i>
<i>Índice de tablas .....</i>	<i>12</i>
<i>Índice de figuras .....</i>	<i>13</i>
<i>Resumen .....</i>	<i>15</i>
<i>Abstract .....</i>	<i>16</i>
<i>Capítulo 1 .....</i>	<i>17</i>
<i>Introducción .....</i>	<i>17</i>
<i>Formulación del Problema .....</i>	<i>17</i>
<i>Justificación e importancia. ....</i>	<i>18</i>
<i>Objetivo general del proyecto.....</i>	<i>20</i>
<i>Objetivo general.....</i>	<i>20</i>
<i>Objetivos específicos .....</i>	<i>20</i>
<i>Capítulo 2 .....</i>	<i>20</i>

<i>Marco referencial</i> .....	20
Bacterias de interés en avicultura. ....	20
<i>Enterobacterias</i> .....	21
Aditivos. ....	22
<i>Prebióticos</i> .....	23
1- <i>Kestosa</i> .....	23
Nanotecnología.....	24
<i>Síntesis verde de las nanopartículas de plata</i> .....	26
Análisis estadístico .....	27
<i>Prueba de Shapiro - Wilks</i> .....	27
Técnicas de Caracterización .....	27
<i>Espectroscopia ultravioleta visible (UV-VIS)</i> .....	27
<i>Dispersión dinámica de la luz (DLS)</i> .....	28
<i>Voltametría cíclica (VC)</i> .....	29
<i>Voltametría diferencial (VD)</i> .....	29
<i>Difracción de Rayos X (DRX)</i> .....	31
<i>Microscopio electrónico de barrido y transmisión (STEM)</i> .....	32
<i>Capítulo 3</i> .....	33
<i>Materiales y métodos</i> .....	33
Materiales y reactivos .....	33
<i>Desarrollo del nuevo aditivo (FOS:AgNPs)</i> .....	33
<i>Caracterización Físicoquímica</i> .....	34
<i>Caracterización Biológica</i> .....	35
<i>Activación de las cepas E. coli (ATCC 25922) y S. aureus (ATCC 25923)</i> .....	35

<i>Siembra de las cepas E. coli (ATCC 25922) y S. aureus (ATCC 25923)</i> .....	36
<i>Colocación de discos</i> .....	36
<i>Incubación</i> .....	36
<i>Medición de los halos de inhibición</i> .....	36
Análisis estadístico .....	37
<i>Diseño Experimental</i> .....	37
<i>Población de estudio y muestra</i> . .....	37
<i>Criterios de inclusión y exclusión</i> .....	38
<i>Definición operacional de variables</i> .....	39
<i>Tratamientos</i> .....	40
<i>Interpretación</i> .....	40
Variables.....	41
<i>Conceptualización de las variables</i> .....	41
Hipótesis.....	42
<i>Hipótesis de investigación, H1</i> .....	42
<i>Hipótesis nula, H0</i> .....	42
Operatividad de las variables.....	42
Capítulo 4 .....	43
<i>Resultados y Discusión</i> .....	43
Análisis de las AgNPs.....	43
Homogeneidad de fructooligosacárido (FOS) .....	46
Análisis de las AgNPs en FOS.....	46
Análisis de voltametría cíclica y diferencial .....	48

	11
Determinación de la morfología y tamaño de las AgNPs.....	51
Análisis de difracción de rayos X. ....	53
Análisis biológico .....	55
Análisis Estadísticos .....	56
<i>Medición de los halos de inhibición</i> .....	60
<i>Capítulo 5</i> .....	62
<i>Conclusiones</i> .....	62
<i>Capítulo 6</i> .....	63
<i>Recomendaciones</i> .....	63
<i>Capítulo 7</i> .....	64
<i>Bibliografía</i> .....	64
<i>ANEXOS</i> .....	74

## Índice de tablas

Tabla 1. <i>Nanopartículas de plata (AgNPs) a diferentes concentraciones incluidas en sistemas el FOS</i> .....	38
Tabla 2. Definición operacional de variables .....	39
Tabla 3. Definición de tratamientos .....	40
Tabla 4. <i>Resumen del tamaño promedio STEM</i> .....	52
Tabla 5. <i>Resumen del tamaño promedio DLS</i> .....	53
Tabla 6. <i>Resultados de halos de inhibición microbiológicos</i> .....	56
Tabla 7. <i>Pruebas de normalidad</i> .....	57
Tabla 8. <i>Comparación entre todas las muestras a las 24 horas</i> .....	58
Tabla 9. <i>Sensibilidad del aditivo para E.coli</i> .....	60
Tabla 10. <i>Sensibilidad del aditivo para S. aureus</i> .....	61

## Índice de figuras

Figura 1. Estructura de la 1-Kestosa ( $\beta$ -D-Fruf-(2 $\rightarrow$ 1)- $\beta$ -D-Fruf-(2 $\rightarrow$ 1)- $\alpha$ -D-Glup). .....	24
Figura 2. Mecanismo de formación de AgNPs. ....	26
Figura 3. <i>Espectro electromagnético</i> . ....	28
Figura 4. <i>Dispersión de luz dinámica de moléculas por sus dimensiones relativas</i> . ....	28
Figura 5. <i>Señal de alteración en (VC)</i> . ....	29
Figura 6. Voltamperograma diferencial de impulsos .....	30
Figura 7. Señales de excitación en voltamperometría diferencial de impulsos. ....	30
Figura 8. Representación gráfica de la Ley de Bragg. ....	31
Figura 9. <i>Esquema de semejanzas en la formación de imagen en el (TEM) y (SEM)</i> . ....	32
Figura 10. <i>Lectura de espectro del extracto geranio (Pelargonium domesticum)</i> . ....	43
Figura 11. Estabilidad absorbancia vs tiempo de AgNPs .....	44
<i>Figura 12. Estabilidad absorbancia vs tiempo de AgNPs</i> .....	44
Figura 13. Estabilidad absorbancia vs tiempo de AgNPs .....	45
Figura 14. Estabilidad absorbancia vs tiempo de AgNPs .....	45
<i>Figura 15 Homogeneidad de 1-Kestosa, fructooligosacárido (FOS)</i> . ....	46
<i>Figura 16. Espectros de absorción de 80 ppm de AgNPs con 0,8 mM de AgNO<sub>3</sub></i> . ....	47
<i>Figura 17. Espectros de absorción de 80 ppm de AgNPs con 1,2 mM de AgNO<sub>3</sub></i> .....	47
Figura 18. Procesos de oxidación y reducción. ....	48
<i>Figura 19. Procesos de oxidación y reducción por voltametría cíclica de 0,8mM a diferentes % de FOS</i> . ....	49
<i>Figura 20. Procesos de oxidación y reducción por voltametría diferencial de 0,8mM a diferentes % de FOS</i> . ....	49

<i>Figura 21. Procesos de oxidación y reducción por voltametría cíclica de 1,2mM a diferentes %FOS.....</i>	<i>50</i>
<i>Figura 22. Procesos de oxidación y reducción por voltametría diferencial de 1,2mM a diferentes %FOS.....</i>	<i>50</i>
<i>Figura 23. Distribución de tamaño de las nanopartículas de plata 0,8mM inducidas con FOS.....</i>	<i>51</i>
<i>Figura 24. Distribución de tamaño de las nanopartículas de plata 1,2mM inducidas con FOS.....</i>	<i>52</i>
<i>Figura 25. Espectros de DRX del FOS las AgNPs con 0,8Mm y 1,2mM de AgNO<sub>3</sub>.....</i>	<i>54</i>
<i>Figura 26. Espectros de difracción de AgNPs con 0,8mM AgNO<sub>3</sub>.....</i>	<i>54</i>
<i>Figura 27. Espectros de difracción de AgNPs con 1,2mM AgNO<sub>3</sub>.....</i>	<i>55</i>
<i>Figura 28. Prueba de Kruskal-Wallis a las 24 horas.....</i>	<i>59</i>

## Resumen

Se evaluó el efecto antibacteriano del nuevo aditivo híbrido compuesto por nanopartículas de plata y fructooligosacáridos en formulación líquida a diferentes concentraciones sobre las cepas de *S. aureus* y *E. coli* mediante un estudio *in vitro*. Para estimar la estabilidad del aditivo se empleó UV-vis verificando su estabilidad en el lapso de 5 meses. La técnica DRX fue realizada para el análisis de estructura del aditivo, mientras las técnicas del STEM y DLS definió que el tamaño promedio de las nanopartículas con una concentración de inicial de 0,8 mM y 1,2 mM de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) de  $52,18 \pm 35,65$  nm y  $51,66 \pm 26,28$  nm vistos en el STEM en cambio con la técnica DLS registra tres veces mayor ese valor y esto se debe a que el DLS no discrimina el recubrimiento orgánico de las nanopartículas. El resultado electroquímico del aditivo determinó el comportamiento redox, que son característicos al fructooligosacárido (FOS) el cual es un prebiótico y en la zona anódica se aprecia una oxidación de la reunión de hidroxilos característica de nanopartículas de plata (AgNPs) que han sido sintetizadas con química verde. Para el análisis microbiológico se utilizaron cepas de *S. aureus* y *E. coli* mostrando un aumentando en el promedio de halo de inhibición conforme incrementa la concentración de FOS en las AgNPs.

### Palabras clave:

- **NANOPARTÍCULAS DE PLATA**
- **FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS**
- **QUÍMICA VERDE**
- **PREBIÓTICO**

### **Abstract**

The antibacterial effect of the new hybrid additive composed of silver nanoparticles and fructooligosaccharides in liquid formulation at different concentrations was evaluated on the *S. aureus* and *E. coli* strains by means of an in vitro study. To evaluate the stability of the additive, UV-vis was used, checking its stability for 5 months. The X-ray diffraction technique (XRD) was used for the analysis of the additive's structure, while electron microscopy (STEM) and dynamic light scattering (DLS) techniques defined that the average size of the nanoparticles with a precursor concentration of 0.8 mM and 1.2 mM of silver nitrate ( $\text{AgNO}_3$ ) of  $52.18 \pm 35.65$  nm and  $51.66 \pm 26.28$  nm seen in the STEM, on the other hand, with the DLS technique it registers three times greater that value and this is because the DLS does not discriminate the organic coating of the nanoparticles. The electrochemical result of the additive determined the redox behavior, which are characteristic of the fructooligosaccharide (FOS) which is a prebiotic and in the anodic zone an oxidation of the hydroxyl assemblies characteristic of silver nanoparticles (AgNPs) that have been synthesized with green chemistry.

For the microbiological analysis, *S. aureus* and *E. coli* strains were used, showing an increase in the average inhibition halo as the concentration of FOS in the AgNPs increased.

#### **Keywords:**

- **SILVER NANOPARTICLES**
- **FRUCTOOLIGOSACCHARIDES**
- **GREEN CHEMISTRY**
- **PREBIOTIC**

## Capítulo 1

### Introducción

#### Formulación del Problema

En la actualidad, el sector avícola cada vez más exigente en el mercado conduciendo a los productos a buscar nuevas alternativas si quiere continuar en la jugada. Se presentan como datos del costo en producción de alimento balanceado puede alcanzar el 72% mientras que la obtención de pollos de engorde solo llega al 18% del total del costo. En consecuencia, a estos datos es fundamental buscar nuevas alternativas que alcancen a disminuir el costo de producción y aumentar los índices de producción según Chiriboga (2015).

Ardoino (2017) recuerda que a finales de los cuarenta se inició la utilización de antibióticos en la alimentación de los animales, con el objetivo de potencializar la producción. Los efectos fueron positivos, aunque, al pasar el tiempo este uso empezó a ser polemizada por la salud pública por sus implicancias en la resistencia a las bacterias usadas en terapia.

En el año 2010 en nuestro país se describió el primer caso de resistencia en bacterias indicadoras y zoonóticas provenientes de muestras fecales de animales sanos, expone Ministerio de Salud Publica del Ecuador (2018).

El microorganismo sujeto a vigilancia por el Comité de Resistencia Antimicrobiana (RAM) ha informa un alto porcentaje de aislados en los hospitales anotados por el CRN-RAM - INSPI, es *E. coli* (ATCC 25922) mayor del 50%, entre otros anuncian el Ministerio de Salud Publica del Ecuador (2018).

En el año 2015 Ecuador se aceptó al compromiso del Plan de Acción sobre la Resistencia a los Antimicrobianos, con ayuda de la OPS/OMS, inició la elaboración del Plan de Acción Nacional, adaptándolo al contexto de las condiciones propias del país describe OPS (2019).

MSP (2018) expresa que, da una idea de la presencia del problema en el país y la necesidad de acciones dirigidas a la concientización y control de la situación. Estas acciones se ven plasmadas en los reportes de información de resistencia a los antimicrobianos del instituto nacional de investigación en salud pública según MSP (2018).

### **Justificación e importancia.**

Como ya se ha mencionado anteriormente desde inicios del 2006, los investigadores han realizado varios experimentos con el objetivo de encontrar alternativas naturales o artificiales a los antibióticos promotores del crecimiento (APC), ya que los efectos han sido perjudiciales en la alimentación animal.

Según investigaciones realizados por la Federación Europea para la Salud, los antibióticos promotores del crecimiento han sido los aditivos más utilizados en alimentación para animales. La Unión Europea anuncio una aproximación que en los últimos años se consumieron 4,700 toneladas de antibióticos de ellos, 786 toneladas se usaron como aditivos. A pesar de ello la cantidad de antibióticos promotores del crecimiento (APC) empezó a disminuir a partir de su año de prohibición según Dolores M (2002).

La producción de alimentos y compuestos de interés nutricional es un tema de investigación desde décadas anteriores. Varias investigaciones se han realizado con

respecto a oligosacáridos, obteniendo resultados a nivel mundial plantearon una gran importancia en la producción de los prebióticos.

Sangeetha (2005) anuncia que dentro de los prebióticos de gran interés están los fructooligosacáridos (FOS) y tienen una amplia historia de uso en Japón y Europa, en el que están aprobados para su uso en más de 500 productos de alimentos. La demanda ha incrementándose teniendo una prospectiva de crecimiento del 10% anual.

Mutanda (2014) agrega que en los últimos años averiguaciones realizadas en la industria alimenticia, tiene el reto de producir un alto rentabilidad de oligosacáridos de tamaño específico a partir de simples materias primas.

Por otro lado, se ha demostrado que las nanopartículas de plata (AgNPs) se encuentra en auge a nivel industrial, según Olvera (2019). Su actividad antimicrobiana es la primordial para el crecimiento de obras con AgNPs, hoy en día, una extensa clase de productos están vacantes en la feria, anuncia Ávalos (2013).

El resultado de esta investigación es utilizar estos dos compuestos FOS (mejora de la flora gastrointestinal) y AgNPs (antimicrobiano) para desarrollar un nuevo aditivo que contribuya con el progreso de nuevas investigaciones para sustituir materias primas y bajar el precio de la elaboración de mismo aumentando la eficacia y disminuyendo el uso de antibióticos.

## Objetivo general del proyecto

### **Objetivo general.**

Evaluar *in vitro* el efecto antibacteriano de nano partículas de plata en un nuevo aditivo híbrido en formulación líquida para aves de corral.

### **Objetivos específicos**

- Evaluar y caracterizar el efecto de la interacción entre las nanopartículas de plata (AgNPs) y Fructooligosacáridos (FOS) mediante técnicas de espectroscopia (UV-Vis, DLS, DRX, Voltametría cíclica y diferencial) y Microscopio electrónico de barrido y transmisión (STEM).
- Evaluar la capacidad antibacteriana del nuevo aditivo (FOS: AgNPs) en cepas de *S. aureus* (ATCC 25923) y *E. coli* (ATCC 25922).
- Comparar el efecto FOS: AgNPs con un antibiótico tradicional.

## Capítulo 2

### Marco referencial

#### **Bacterias de interés en avicultura.**

Dentro de la industria avicultura se posee diferentes tipos de bacterias que son agentes de enfermedades a nivel primario o secundario en el ser humano; las bacterias que producen enfermedades en las aves comerciales entre las más relevantes se hallan: *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonelosis*, *Tifoidea aviar*, *Infecciones paratíficas*, *Cólera aviar*, *Enteritis necrótica*, *Colangiohepatitis en pollo de engorde*, *Enteritis ulcerativa (enfermedad de la codorniz)*, *Botulismo*, *Espiroquetosis*, reporta Parra (2019).

Las bacterias ya dichas por Puerta & García (2010) anuncian que no son las únicas que se encuentran en las aves, existe la probabilidad de encontrar más bacterias, de las cuales la mayoría se encuentran el grupo de las Enterobacterias.

### ***Enterobacterias.***

Define Puerta & García (2010) como la familia Enterobacteriaceae son Gram negativos, se ubican de forma natural en el gastrointestinal. Es un grupo grande y se consideran patógenos oportunistas afirma Quinn (2011), los principales patógenos son: *Escherichia spp*, *S. aureus* y *Yersinia spp*.

En el desarrollo de este proyecto se centrará en analizar la actividad antibacteriana del nuevo aditivo híbrido en formulación líquida en los patógenos *E. coli* y *S. aureus* por ser las más comunes en de infecciones y su disponibilidad en el Hospital de Especialidades Fuerzas Armadas No. 1 como sepas ATTC.

### ***Escherichia coli (ATCC 25922).***

La Organización American Type Culture Collection ATCC (2019), afirma que la bacteria *E. coli (ATCC 25922)* es una cepa de control CLSI para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. Se utiliza para pruebas de medios, como cepa de control de calidad, pruebas de susceptibilidad en disco. Este producto está diseñado solo para investigación.

### ***Staphylococcus aureus (ATCC 25923)***

La Organización American Type Culture Collection ATCC (2019), afirma que la bacteria *S. aureus (ATCC 25923)* es una cepa de control de calidad para la prueba CAMP, ensayo de concentrado de humo de madera, evaluación de agar MuellerHinton, examen de productos lácteos, prueba de medios, difusión de disco CLSI entre otros. Este producto está diseñado solamente para investigación.

### **Aditivos.**

Una de las materias primas a considerar durante el proceso de elaboración del balanceado son los aditivos. Mendoza, (2016) los define como sustancias, microorganismos o preparados distintos de las materias primas, que se añaden al alimento para influir satisfactoriamente en: las características, rendimientos, bienestar y la salud de los productos de origen animal, mediante su influencia en el perfil de la flora microbiana intestinal.

Menciona de igual forma Dolores & Ranilla (2002) que dentro de los aditivos, los antibióticos son los más utilizados en la alimentación animal e industria avícola. Son utilizados como promotores del crecimiento de los animales (APC). Los APC causan alteraciones en los procesos metabólicos, que da como resultado en el aumento en la eficiencia de utilización y mejoras de aumento de peso, así como gracias a estas modificaciones, los APC contribuyen a un cambio estructural de flora bacteriana, alta absorción de nutrientes y baja producción de amoníaco y aminas tóxicas.

Los antibióticos son medicamentos mayor eficiencia que, desde que se descubrió la penicilina, han constituido la medida terapéutica disminuyendo el porcentaje de mortalidad. Dependiendo de su acción, los antibióticos se clasifican como de bajo espectro o de amplio espectro afectando a grandes y pequeños gérmenes según American Academy of Pediatrics (2020).

Anuncia Gobernado (2007) que los carbapenémicos son antibióticos betalactámicos derivados del género *Streptomyces* para el tratamiento de infecciones, que tienen un amplio espectro lo cual son de gran importancia contra diferentes patógenos.

### **Prebióticos.**

Los prebióticos son compuestos indigestibles, utilizados en alimentación, ayudan el crecimiento para determinados microorganismos beneficiosos del tracto digestivo, brindando bienestar y salud al hospedero, los define Corzo (2015).

La relación de los prebióticos con la iniciación de producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) que disminuye la microbiota patógena y provoca la población beneficiosa de bacterias al bajar el pH intestinal describe Mariño, Núñez, & Barreto (2016).

Dolores & Ranilla (2002) mencionan que, las sustancias empleadas como prebióticos son los oligosacáridos que, logran llegar al tracto posterior de intestino y al no ser digeridos, son descompuestos por las bacterias intestinales. Dentro de los oligosacáridos más empleados de APC son los fructooligosacáridos, los cuales ayudan el crecimiento de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en las aves aumentando así su ritmo de crecimiento.

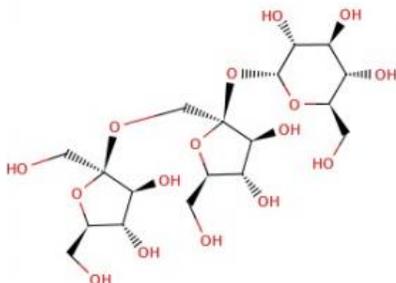
#### **1-Kestosa**

La 1-Kestosa, fructooligosacárido (FOS) con dominio prebiótico, es un polímero de d-fructosa unido por enlaces  $\beta$  (2  $\rightarrow$  1) y finalizado con una molécula de d-glucosa añadida a la fructosa mediante un enlace  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  2) según Guerra, L (2017). Estos enlaces aceptan la hidrólisis de las enzimas digestivas humanas llegando al intestino, ayudando como sustrato para la flora del colon (Claudia L, González Aguirre, 2017).

El FOS contribuye con el crecimiento de bifidobacterias, la circulación intestinal y fortaleciendo el sistema inmune. El efecto bifidogénico se da por la fermentación de los FOS de forma anaerobia, incrementando la población de bacterias benéficas inhibiendo el crecimiento de los organismos patógenos (Perez, 2016).

**Figura 1.**

*Estructura de la 1-Kestosa ( $\beta$ -D-Fruf-(2→1)- $\beta$ -D-Fruf-(2→1)- $\alpha$ -D-Glup).*



*Nota:* Obtenido de Guerra, L (2017).

Define Botero (2014) que naturalmente los FOS se ubican en varios organismos como cianobacterias, algas y en diferentes de plantas. En la naturaleza los FOS se pueden encontrar en el ajo, cebolla, tomate, entre otros.

### **Nanotecnología**

Mahmoud (2012) manifiesta que en los últimos años la nanotecnología se encuentra en desarrollo de algunas tecnologías alimentarias mejorándolas a nivel molecular con mayor calidad de los mismos. Esta tecnología tiene un mayor impacto en la producción, el procesamiento y seguridad de los alimentos.

Entre las nano estructuras se encuentran las nanopartículas y entre ellas se distinguen las nanopartículas de plata (AgNPs) por sus características tanto en: absorción de radiación, reactividad química, coloración y gran conexión superficie/ volumen. Por su amplia clase de aplicaciones se han implementado varios métodos de síntesis de AgNPs (Serrano, 2012).

Por otro lado, las nanopartículas de plata (AgNPs) son consideradas como suplementos flotantes utilizados en los alimentos para aves de corral, teniendo un alto

efecto antimicrobiano y baja toxicidad menciona Mahmoud (2012). Esto ayuda a que sean más resistentes a la desactivación por ácidos gástricos y tienen una baja tasa de absorción a través de la mucosa intestinal, es este estudio se recomienda el uso de nanopartículas como agente antimicrobiano en la industria avícola.

Otros estudios han mostrado que las AgNPs para las enzimas de la cadena respiratoria de las bacterias, altera la membrana y se une a los ácidos nucleicos, para así la replicación celular manifiesta Latorre y Fondevila (2010), que estas nanopartículas de plata tienen propiedades antimicrobianas sobre las bacterias potencialmente patógenas como *E. coli*, *Streptococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*.

Se puede citar varias investigaciones favorables respecto a las nanopartículas de plata como agentes antimicrobianos, como los resultados de (Vázquez, 2014) obtenidos durante el proceso de síntesis electroquímica de AgNPs con copolímeros en bloque tipo pluronic muestran una excelente actividad antimicrobiana cuando se evaluaron frente a *Pseudomonas Aeruginosa*.

(Ledezma, 2014) Sintetizó nanopartículas de plata (AgNPs) como agente reductor extracto de nopal (*Opuntia sp.*) teniendo excelentes resultados en su función antibacteriana y antifúngica, las cuales fueron evaluadas en cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Aspergillus níger*.

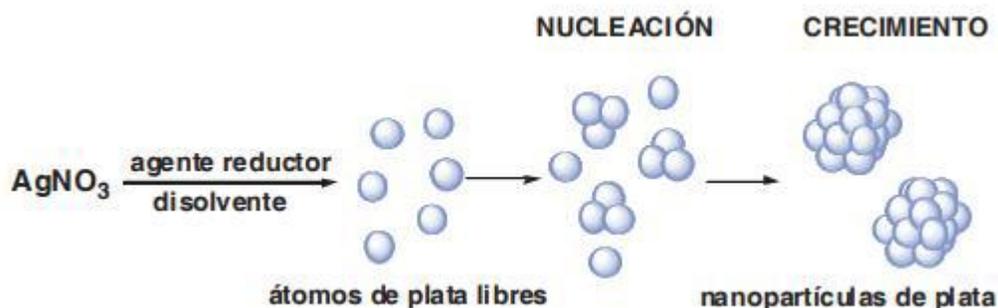
La fabricación de AgNPs puede darse por varios métodos: en solución, en fase gaseosa, sobre un sustrato o ajustada en una matriz. Las estrategias de síntesis se pueden clasificar por: físicos, químicos y mecánicos (Rodolfo, 2012). En este proyecto se centrará en el desarrollo de AgNPs mediante síntesis verde.

### ***Síntesis verde de las nanopartículas de plata***

La síntesis verde de nanopartículas se dan a partir de la reducción de iones de plata se distribuye en dos etapas: crecimiento y nucleación. Figura 2 para la cual son necesarios tres elementos: iniciador metálico, agente reductor y un agente estabilizante. Como precursor metálico el más destacado es el nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ). Los agentes reductores para una síntesis verde los más usados el ácido ascórbico, azúcares, extractos de pigmentos naturales. Dentro de los agentes estabilizantes pueden ser biopolímeros según Monge (2009).

#### **Figura 2.**

*Mecanismo de formación de AgNPs.*



Nota: obtenido de (Monge, 2009)

En este trabajo se utilizó como agente reductor el extracto de la flor de geranio para la biosíntesis de nanopartículas de plata, por los constituyentes presentes en mayor medida de antocianinas, flavonoides, cardenólidos, taninos y fenoles (Madrid, 2017). En este trabajo no fue necesario el uso de un agente estabilizante. Se reprodujo el trabajo realizado por Madrid (2017) en ella utiliza dos concentraciones diferentes de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ).

Dentro de las investigaciones planteadas es analizar *in vitro* la consecuencia antibacteriana de un nuevo aditivo para aves de corral mediante la combinación entre el prebiótico 1-Kestosa, fructooligosacárido (FOS) y las nanopartículas de plata (AgNPs), que al ser suministrada en la dieta de las aves podría mejorar los indicadores de salud y productividad en el sector avícola.

## **Análisis estadístico**

### ***Prueba de Shapiro - Wilks***

En una muestra simple aleatoria de tamaño  $n$ , se desea saber si proviene de una población de distribución normal, es un problema frecuente, por lo que son varias pruebas de inferencia estadísticas que requieren como condición necesaria que la muestra sea normal.

El método consiste en iniciar ordenando la muestra de menor a mayor, resultando el nuevo vector muestral, siendo  $x_j$  el  $j$ -ésimo valor muestral tras la ordenación; se calcula el estadístico de contraste

$$W = \frac{1}{nS^2} \left( \sum_{j=1}^h a_{in} (x_{n-i+1} - x_i) \right)^2$$

El programa SPS regresa tanto el valor del estadístico como su probabilidad crítica (pc), por lo cual da la pauta para rechazar o aceptar la hipótesis nula de normalidad, se presenta por Hipótesis nula según Riotorto (2011).

## **Técnicas de Caracterización**

### ***Espectroscopia ultravioleta visible (UV-VIS).***

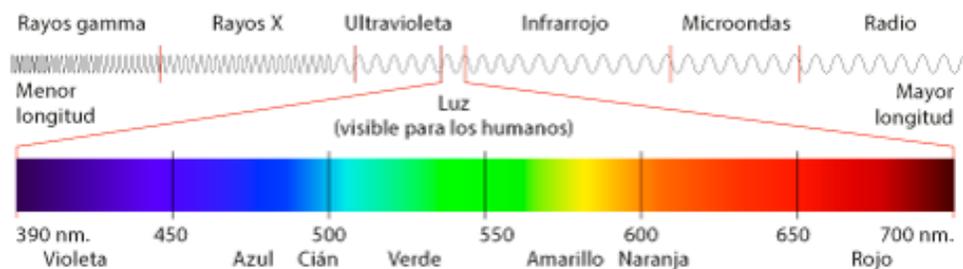
Esta técnica tiene principios de análisis de transmisión de radiación electromagnética establecida por la Ley de Beer Lambert, es directamente proporcional la concentración del

analito en servicio de la longitud de onda, que inicia desde el rango ultravioleta al visible (Nieves & Ruiz, 2018)

Esta técnica sirve para monitorear la síntesis y estabilidad de las nanopartículas (Tran, Nguyen, & Le, 2013).

**Figura 3.**

*Espectro electromagnético*



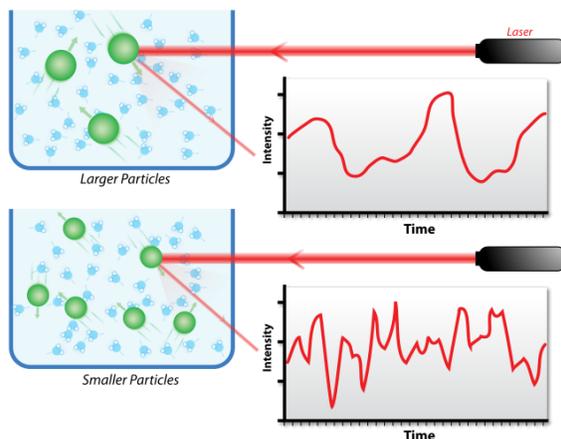
Nota: obtenido de (Díaz A. , 2010)

### ***Dispersión dinámica de la luz (DLS).***

Hace mención a la dispersión cuasi elástica de fotones, la cual sirve para medir el tamaño y repartición de nanopartículas, definiendo el diámetro hidrodinámico en disolución y brindar datos de la situación de agregación según Malvern (2020).

**Figura 4.**

*Dispersión de luz dinámica de moléculas por sus dimensiones relativas*



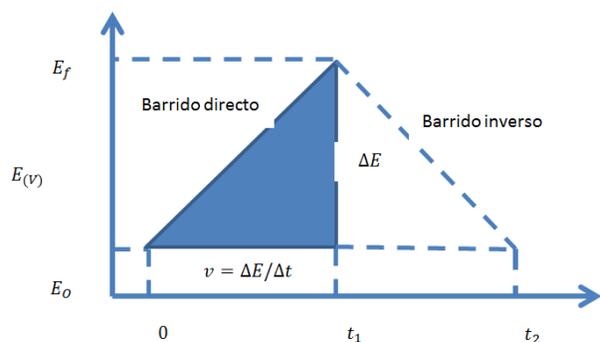
Nota: obtenido de Pimentel & Martín-Martínez (2014).

### ***Voltametría cíclica (VC)***

La variación de potencial que se da en un electrodo estático colocado en disolución emite señales de configuración triangular, como se muestra figura 5. El potencial varía desde  $E_o$  a  $E_f$ , donde el barrido regresa a su valor original  $E_o$ . Este proceso de regreso se llama potenciales de cambio, donde tiene lugar la reducción u oxidación manipulada por difusión de una o más especies, dependiendo el tipo de análisis, la dirección del barrido inicial puede darse de forma negativa o positiva Ortiz & Martínez, (2006).

#### **Figura 5.**

*Señal de alteración en (VC).*



*Nota:* Obtenido de (Ortiz, Martínez, & Hernández, 2006)

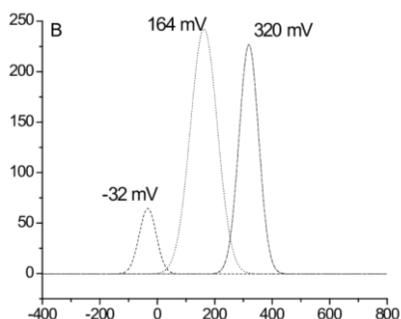
### ***Voltametría diferencial (VD)***

Su fundamento se origina un cambio repentino en el potencial aplicado, originado en un aumento en la corriente faradaica y en la corriente dada por encima de los valores en la rampa de corriente continua, la corriente decae más rápida que la corriente faradaica anuncia (Alves, 2018).

La diferencia entre las intensidades integradas se rastrea originando voltamperograma en forma de pico como se aprecia en la figura 6.

**Figura 6.**

*Voltamperograma diferencial de impulsos*



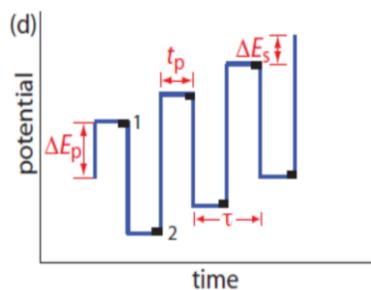
*Nota:* Obtenido de (Alves, 2018)

Las curvas en forma de pico que se observa en voltamperometría diferencial de impulsos, ya sea en reacciones irreversibles como reversibles, se asemejan a la forma teórica. De esta forma se obtiene un área diferencial consistente en un pico de corriente donde su altura es directamente proporcional a la concentración del analito.

DVP inicia superponiendo un impulso de potencial continuo a cada paso de escala potencial, fundamentalmente, al final de cada escalón. Las concentraciones de los analitos en la superficie del electrodo esta determinadas por la escala de potencial, como se puede observar en la figura 7.

**Figura 7.**

*Señales de excitación en voltamperometría diferencial de impulsos*



*Nota:* Obtenido de (López, 2007).

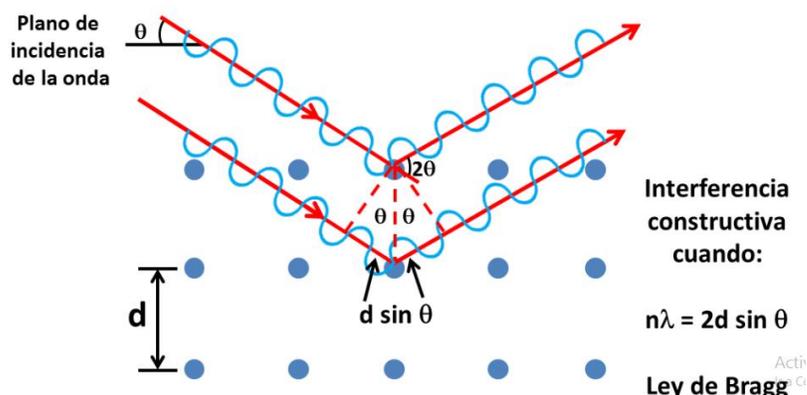
La configuración electrónica y el orden de relleno de los orbitales es fundamental conocimiento en la energía de los orbitales tiene como fundamento el conocimiento de la configuración electrónica y el orden de relleno de orbitales. Para saber si los compuestos pierden o cede moléculas se le conoce como HOMO (orbital Molecular ocupado más alto), en cambio el LUMO (Orbital Molecular vacante más bajo) es donde el compuesto acepta un par de electrones (López, 2007)

### ***Difracción de Rayos X (DRX)***

Está basada en la interacción de la radiación ionizante monocromática en una rendija de grosor comparable a la longitud de onda de la radiación. Los rayos X poseen longitudes de ondas en Angstroms, de igual disposición que las distancias interatómicas de los elementos de las redes cristalinas. Al ser irradiados en encima de la muestra, los rayos x se difractan con ángulos la cual se correlaciona con las distancias interatómicas. El método de Debye-Scherrer se fundamenta en irradiar sobre el analito formada por varios cristales ubicados al azar en todas las direcciones. Para lo cual se aplica la ley de Bragg (Cerquera, Rodríguez, & Ruano, 2017).

**Figura 8.**

*Representación gráfica de la Ley de Bragg.*



Nota: Obtenido de (BRUKER, 2020)

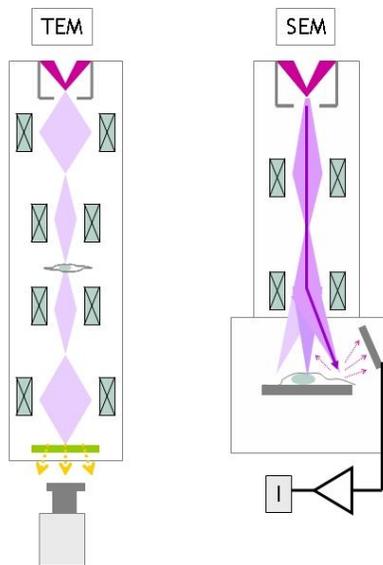
### **Microscopio electrónico de barrido y transmisión (STEM)**

La técnica es la unión de los dos tipos microscópicos tanto del microscópico electrónico de barrido (SEM) y Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM) CONICET (2000).

La técnica STEM desplaza un haz de electrones delgado y enfocar a lo largo del analito. La correlación entre los átomos del analito y el haz de luz se forma un flujo de señales que se interaccionan con la colocación del haz para formar una imagen virtual donde la fuerza de señal en cualquier ubicación del analito es representada por la intensidad en la escala de gris de la semejante localización en la imagen (Pardell, 2020).

#### **Figura 9.**

*Esquema de semejanzas en la formación de imagen en el (TEM) y (SEM)*



Nota: obtenido de (Educación, 2020).

## Capítulo 3

### Materiales y métodos.

#### Materiales y reactivos

La 1-Kestosa, fructooligosacárido (FOS) fueron proporcionado por el Dr. Luis Trujillo que han sido desarrollados y caracterizados en trabajos anteriores como se muestra en la literatura de Ruiz (2018), como parte del proyecto externo ESPE- Innovativa 2016-IN-002 y las nanopartículas de plata (AgNPs) con dos tamaños diferentes de nanopartículas fueron replicado mediante un proceso estandarizado por Madrid (2017). Las cepas bacterianas: Gram negativas: *E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 25923) y el antibiótico erthapenem, de igual manera fueron proporcionados por el Laboratorio de microbiología del Hospital de Especialidades Fuerzas Armadas No. 1. Todos los suministros fueron proporcionados por el Centro de Nanociencia y Nanotecnología.

#### ***Desarrollo del nuevo aditivo (FOS:AgNPs)***

Para el desarrollo del nuevo aditivo se mezcló diferentes concentraciones de 1-Kestosa, fructooligosacárido (FOS) en la matriz de nanopartículas de plata (AgNPs). Para esta mezcla se requirió procesos de sonicación para dispersar uniformemente las nanopartículas en el FOS. Para esto se utilizó un homogenizador de marca Proinsta GE 750 con una amplitud del 50% en un tiempo de 2min con un intervalo de 30 segundos en ON y 30 segundos en OFF, utilizando hielo para evitar el calentamiento y degradación de la solución. Se verificó si el FOS sufre algún cambio fisicoquímico bajo este proceso de sonicación, para su efecto se analizó su espectro de UV-Vis, por el cual, se ocupó una celda de cuarzo de 4mL. En cada celda se vertieran 200uL del compuesto FOS en 3mL de agua destilada. Una vez realizado este ensayo se mezcló cuatro porcentajes (0.06, 0.12, 0.25 y 0.5) % de FOS en dos determinadas concentraciones de AgNO<sub>3</sub> (0,8 y 1,2)

mM, con el fin de obtener la mejor concentración adecuada para el suministro en aves de corral que no sean tóxicas. El nuevo aditivo híbrido fue caracterizado fisicoquímicamente y biológicamente.

### ***Caracterización Fisicoquímica***

La 1-Kestosa, fructooligosacárido (FOS), las AgNPs y el aditivo híbrido se analizaron en diferentes técnicas como en el espectrofotómetro UV-VIS SPECORD S600 de marca Analytikjena. Para el efecto se utilizó un volumen de 200  $\mu$ L de la muestra en 3 mL de agua destilada. Tanto el agua destilada como las muestras se filtraron en un tamaño de poro promedio 0,45  $\mu$ m, teniendo en cuenta el material cuidadosamente lavado, para excluir el polvo. Se usó la técnica de DLS LB-550 de marca Horiba, que permitió la obtención de distribuciones cuantitativas de tamaño de las nanopartículas de Ag<sup>0</sup> según B.kumar (2014) y se compararon con los datos de tamaño con el STEM de marca Tecnai, por el cual, se colocó 10  $\mu$ L depositados en una rejilla F/C de Cu y observada en el microscopio a varias medidas, estas imágenes fueron analizadas en el programa ImageJ (FIJI).

El (DRX) se analizó en un difractómetro de marca PANalytical EMPYREAN, en configuración  $\Theta$ -2 $\Theta$  en un tubo de rayos X de cobre a 45 kV y 40 mA. El análisis de difractograma se realizó en un promedio de mediciones entre los ángulos de 5° a 90° ( $\Theta$ -2 $\Theta$ ) utilizando el software High Score Plus. Se aplicó en un sustrato de Silicio Zero como background en el montaron las muestras de nanopartículas a ser analizadas.

Para el análisis de la curva REDOX del nuevo aditivo híbrido y verificar si existe o no interferencia de las AgNPs por parte del FOS, se realizaron mediciones fisicoquímicas de Voltametría cíclica (VC) y Voltametría diferencial (VD) tanto de las AgNPs, FOS y del nuevo aditivo (FOS: AgNPs).

Por otro lado, se analizó las muestras en el SEM, de marca TESCAN modelo MIRA 3 en modo STEM. Antes de su previo análisis se colocó alícuota de 3,5 mL del aditivo, se colocó en rejillas F/C Cu aproximadamente 10UI, para terminar, se introdujo la rejilla en el carrusel para su observación en campo claro, con distancia de trabajo de 5nm, una tensión de 30KV. Todos estos ensayos se realizaron en los Laboratorios del Centro de Nanociencia y Nanotecnología (CENCINAT).

### ***Caracterización Biológica***

El presente estudio constituyó una investigación *in vitro*, el cual se ejecutó en un medio de cultivo que determinó la actividad antimicrobiana del nuevo aditivo (FOS:AgNPs) en varios porcentajes (0.06, 0.12, 0.25 y 0.5) % de FOS, realizadas en cajas Petri con cepas ATCCS de *E. coli* (ATCC 25922) y *S. aureus* (ATCC 25923) previamente activadas y cultivadas por extensión en la cámara de flujo laminar y que a su vez serán comparadas con el antibiótico erthapenem conocidos como control positivo y agua destilada como negativo mediante círculos de inhibición según Durafford anuncia en literaria de Nuñez (2010).

### ***Activación de las cepas E. coli (ATCC 25922) y S. aureus (ATCC 25923)***

Las cepas ATCCS se adquirirán por el Hospital de Especialidades Fuerzas Armadas No.1, el cual brinda el certificado de las bacterias. El análisis se realizó siguiendo la formalidad de Bioseguridad para control de desechos infecciosos.

Las cepas se activaron en la cámara de flujo laminar, inoculando las colonias en Agar Chocolate, dos mililitros de caldo en tubos de estériles hasta una turbidez de 0,5 en la escala de Mc Farland equivalente a  $1 \times 10^8$  UFC por mililitro.

### ***Siembra de las cepas *E. coli* (ATCC 25922) y *S. aureus* (ATCC 25923).***

Se prepararon 16 cajas Petri en medios sólidos de Muller-Hinton, tanto para *E. coli* como *S. aureus*, se realizaron las siembras de las cepas activadas, mediante un hisopo estéril, el cual se lija en zig-zag en ángulo de 60° garantizando la distribución homogénea.

### ***Colocación de discos***

Con una pipeta se colocó 0.1 ml de las conglomeraciones de (0.06, 0.12, 0.25 y 0.5) % FOS incluidas con AgNPs a (0,8 y 1,2) mM de AgNO<sub>3</sub> sobre cuatro discos de papel de aproximadamente 6 mm de diámetro y de espesor 0,2mm cada uno impregnados, un disco con el antibiótico a una concentración de 10ppm con dimensiones 6mm de diámetro y 0,8mm de espesor como control positivo y otro disco con las mismas dimensiones de los utilizados como control negativo en los discos de papel filtro.

### ***Incubación***

Las 16 cajas Petri con agar Müller-Hinton incubadas con bacteria a bajo condiciones adecuadas durante 24 horas.

### ***Medición de los halos de inhibición***

Luego del tiempo de infección determinado se ejecutó las mediciones de círculos de inhibición, se utilizó una regla milimetrada para definir la longitud de los halos, los cuales se evaluó de la actividad antimicrobiana, en la escala por Duraffourd:

1. Nula: (-) inferior o igual a 8 mm
2. Sensibilidad tope: = (+) de 9 a 14 mm
3. Sensibilidad central: = (++) de 15 a 19 mm
4. Extremadamente sensible: = (+++) igual o superior a 20 mm

## **Análisis estadístico**

### ***Diseño Experimental***

Para el estudio se desarrolló a escala de laboratorio, el análisis estadístico se realizó para determinar la sensibilidad de los microorganismos frente al nuevo aditivo (AgNPs-FOS). Se estableció fases de estudio con diseño experimental.

Los datos obtenidos fueron procesados en el programa estadístico (SPSS Versión: 17.0, Origin 8) para en primera instancia se verificó si las muestras surgen de una población con distribución Normal tanto con la prueba de Shapiro - Wilk (menor a 20 datos).

Para el análisis semejante de resultados, las muestras no procedieron de una distribución normal se realizó pruebas no paramétricas (órdenes, signos +,-): Kruskal Wallis, Wilcoxon.

### ***Población de estudio y muestra.***

La población del presente análisis estuvo compuesto por una cantidad de bacterias de *E. coli* y *S. aureus* que forman parte de las cepas identificadas previamente por laboratorio de microbiología, activadas en medios de cultivos de Agar Chocolate.

Las muestras fueron integradas por 16 cajas Petri con Agar Chocolate, donde se sembraron las cepas, posteriormente se colocaron en cada placa 4 discos de papel inducidas con nanopartículas de plata a diferentes concentraciones de FOS, según la siguiente descripción, tanto para 0,8Mm y 1,2Mm de AgNO<sub>3</sub>: el primer disco a AgNO<sub>3</sub>: 0,06% FOS, el segundo a AgNO<sub>3</sub>: 0,12% FOS, el tercer disco a AgNO<sub>3</sub>: 0,25% FOS, el cuarto disco a AgNO<sub>3</sub>: 0,5% FOS. Un quinto disco se usó como control positivo del antibiótico respectivo y el sexto con agua destilada como control negativo, ver tabla 1.

**Tabla 1.**

*Nanopartículas de plata (AgNPs) a diferentes concentraciones incluidas en sistemas el FOS*

FOS (%)	<b>0,06</b>
	0,12
	0,25
	0,50
<b>AgNPs 0,8mM (nm)</b>	
FOS (%)	0,06
	0,12
	0,25
	0,50
<b>AgNPs 1,2mM (nm)</b>	

### ***Criterios de inclusión y exclusión***

#### ***Criterios de inclusión.***

- Las Cepas de *E. coli* y *S. aureus* libres de contaminación.
- AgNPs de concentraciones de  $\text{AgNO}_3$  (0,8 y 1,2) mM de tamaño promedio (5-30) nm a (0.06, 0.12, 0.25 y 0.5) % de FOS.
- Antibiogramas

#### ***Criterios de exclusión.***

- Las Cepas de *E. coli* y *S. aureus* contaminadas en el proceso.
- Nanopartículas de plata de diferentes tamaños a (1, 10, 25 y 40) ppm con FOS.
- Concentraciones de nanopartículas de plata y Antibiogramas diferentes a las expuestas.
- Cajas Petri dañadas.
- Diferentes medios de cultivos.

**Definición operacional de variables**

Tabla 2.

*Definición operacional de variables*

<b>Variable</b>	<b>Definición Operacional</b>	<b>Tipo</b>	<b>Clasificación</b>	<b>Indicadores</b>	<b>Escala de Medición</b>
Concentración nanopartículas plata con FOS	de Mediciones de las partículas con actividad antimicrobiana que producen ruptura de la membrana de los microorganismos.	Independiente	Cuantitativa	Nanopartículas de plata a 80ppm en cuatro diferentes porcentajes de FOS (%): 0.06, 0.12, 0.25	Nominal 1,2,3 y 4
Actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata con FOS sobre <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> .	Facultad de varias sustancias de inhibir el crecimiento del <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> . La actividad antimicrobiana se determinó por la medida en milímetros de los círculos de inhibición según Duraffourd.	Dependiente	Cuantitativa Ordinal	Diámetro de halo de inhibición según la escala establecida por Duraffourd 1. Nula: (-) inferior o igual a 3 mm 2. Sensibilidad tope: = (+) de 4 a 9 mm 3. Sensibilidad central: = (++) de 10 a 14 mm 4. Extremadamente sensible: = (+++) $\geq$ a 15 mm	Ordinal 5, 6, 7, 8
Antibiótico	Medicamentos potentes que combaten las infecciones bacterianas. Actúan matando las bacterias o impidiendo que se reproduzcan.	Interviniente	Cuantitativa	Erthapenem (ETP)	Nominal 1
Agua destilada	cuya composición es una molécula de H <sub>2</sub> O	Interviniente	Cuantitativa	Agua destilada empleada para saturar el papel filtro	Nominal 1

### Tratamientos

Tabla 3.

Definición de tratamientos

Caja No.	Halos de inhibición (mm)							
	AgNPs (0,8-1,2)mM 0,06% FOS	AgNPs (0,8-1,2)mM 0,12% FOS	AgNPs (0,8-1,2)mM 0,25% FOS	AgNPs (0,8-1,2)mM 0,5% FOS	(Control Positivo) Antibiótico	(Control Negativo) Agua destilada	AgNPs 0,8mM (mn)	AgNPs 1,2 mM (mn)
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-
.	-	-	-	-	-	-	-	-
.	-	-	-	-	-	-	-	-
.	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-

### Interpretación

Cada prueba de Hipótesis, se relacionaron el valor de significancia con el valor 0,05 de la siguiente forma:

- Si el nivel de significancia es mayor a 0,05 estaremos de acuerdo  $H_0$  (hipótesis inicial, son iguales).
- Si el nivel de significancia es menor a 0,05 estaremos de acuerdo  $H_a$  (hipótesis alternativa, no son iguales).

El análisis relación de los resultados, se tomaron los dos sucesos:

- Si los resultados surgen de poblaciones con distribución normal por tanto se ejerce pruebas paramétricas (media, desviación estándar): T student, ANOVA.
- Si los resultados NO surgen de poblaciones con distribución normal por lo cual se ejerce pruebas no paramétricas (orden, signos): Mann Whitney, Kruskal Wallis, Wilcoxon.

## **Variables**

### ***Conceptualización de las variables***

#### ***Variables independientes.***

#### ***Concentración de nanopartículas de plata:***

Mediciones de las partículas con impacto antimicrobiano que producen ruptura de la membrana de los microorganismos. Nanopartículas de plata a dos diferentes concentraciones (0,8 y 1,2) mM.

#### ***Variables dependientes.***

#### ***Actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata con FOS:***

Facultad de inhibir el crecimiento de las cepas *E. coli* y *S. aureus*. El impacto antimicrobiano se determinó por la medida en milímetros de los halos de inhibición y según los criterios de Duraffourd.

#### ***Variables intervinientes.***

#### ***Antibióticos:***

Ayudan contra infecciones bacterianas, son de amplio espectro. Es el control positivo.

#### ***Agua destilada:***

Elemento compuesto de una molécula de H<sub>2</sub>O, purificada. Es el control negativo.

## **Hipótesis**

### ***Hipótesis de investigación, H1***

Existe actividad antimicrobiana las AgNPs a diferentes porcentajes de FOS sobre las cepas *E. coli* y *S. aureus* con FOS SIN diferencia significativa respecto a los Antibióticos

Existe actividad antimicrobiana las AgNPs a diferentes porcentajes de FOS sobre las cepas *E. coli* y *S. aureus* con FOS CON diferencia significativa respecto a los Antibióticos

### ***Hipótesis nula, H0***

No existe actividad antimicrobiana las AgNPs a diferentes porcentajes de FOS sobre las cepas *E. coli* y *S. aureus* presentes con AgNPs.

## **Operatividad de las variables**

En el presente trabajo, las variables más importantes a tomar en consideración para la evaluación del aditivo, así como la caracterización del mismo. Variable de respuesta: Halo de inhibición mediante la valoración cualitativa a las 24 horas, de acuerdo a la presencia o ausencia de halos de inhibición o contaminación, si existieran colonias que no corresponden sobre el crecimiento bacteriano de *E. coli* (ATCC 25922) y *S. aureus* (ATCC 25923) medido en milímetros (mm).

## Capítulo 4

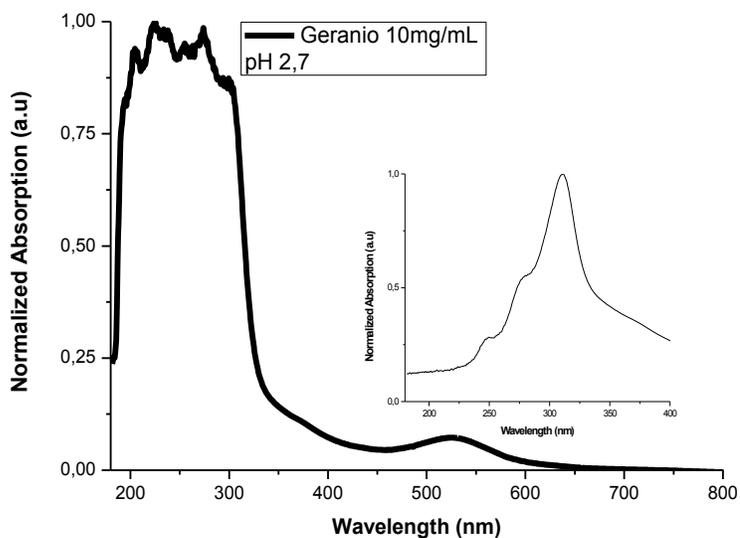
### Resultados y Discusión

#### Análisis de las AgNPs

En la figura 10 se muestra el espectro de absorción del extracto de la flor *Pelargonium domesticum* (geranio) con un pH 2,7, adentro se tiene el espectro de absorción en la región UV.

**Figura 10.**

*Lectura de espectro del extracto geranio (*Pelargonium domesticum*)*



Este resultado muestra una banda característica entre 400 nm a 600 nm proveniente de antocianinas a pH 2,7 como lo registra en la literatura (Kumar, 2014).

Espectros de UV-Vis de las AgNPs y su curva de estabilidad en el tiempo para las diferentes concentraciones de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) de 0.8Mm y 1.2Mm son mostradas en las Figuras 11 y 12, respectivamente.

Figura 11.

*Estabilidad absorbancia vs tiempo de AgNPs*

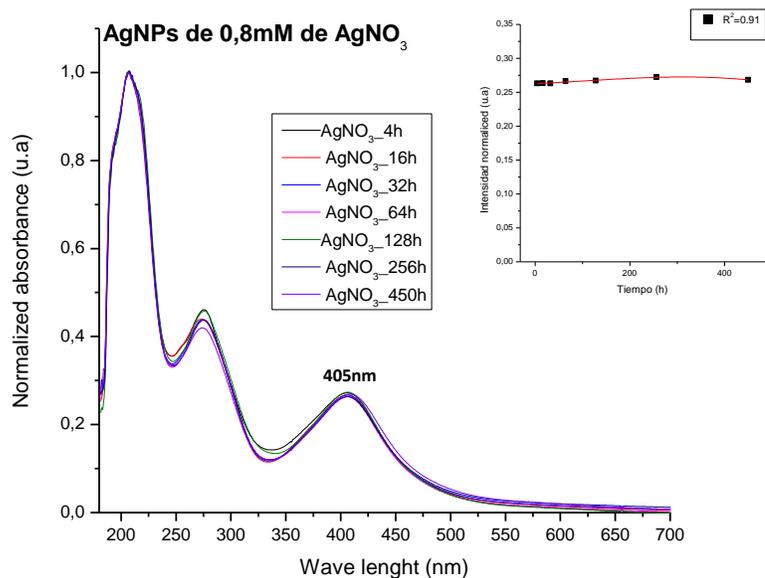
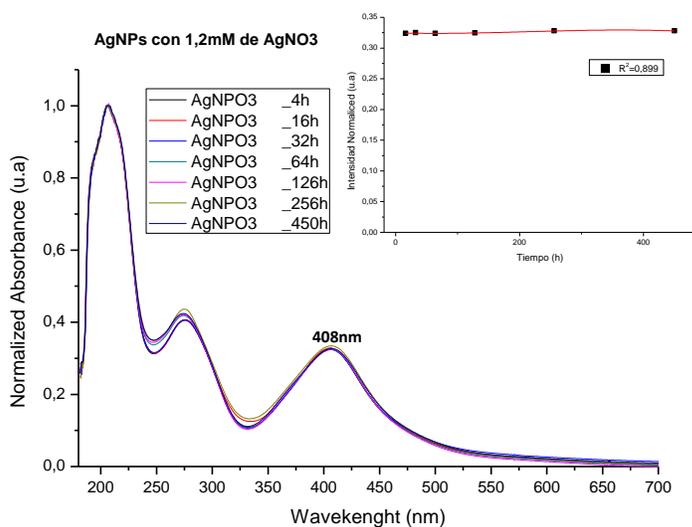


Figura 12.

*Estabilidad absorbancia vs tiempo de AgNPs*

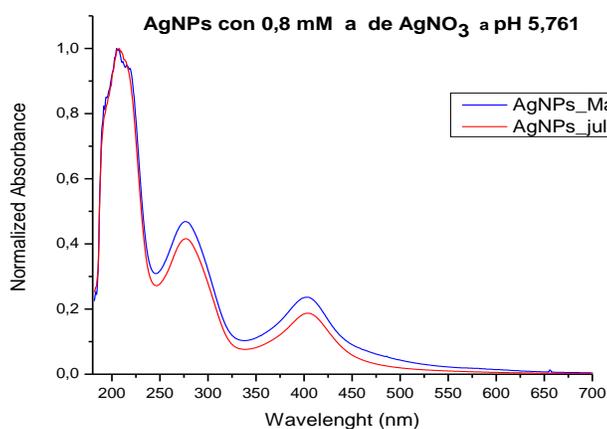


Los resultados muestran que al variar la concentración del AgNO<sub>3</sub> se tiene un máximo de longitud de onda diferente, teniendo para la concentración de 0.8 mM un máximo en 405 nm y en 1.2 mM un máximo en 408nm. Estos resultados muestran que se realizó con éxito la reproducción del proceso de síntesis verde que registra en la Madrid (2017), que fue analizada en un lapso de 450 horas. La estabilidad se mantuvo un mes

luego de haber sido sintetizadas. En la figura 13 y figura 14 se muestran curvas de UV-Vis de las AgNPs analizadas después de 4 meses de síntesis.

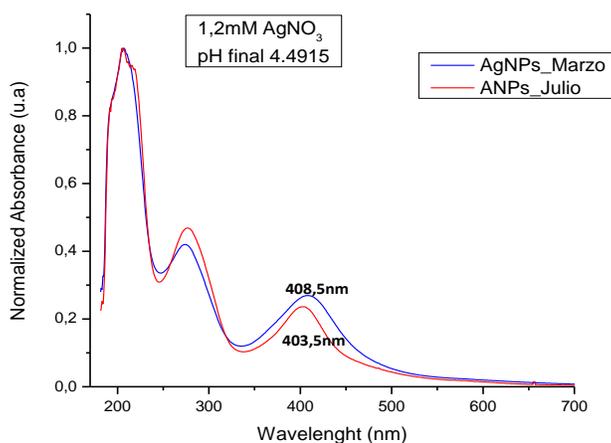
**Figura 13.**

*Estabilidad absorbancia vs tiempo de AgNPs*



**Figura 14.**

*Estabilidad absorbancia vs tiempo de AgNPs*



Se observa que, para las muestras con concentración de 0,8mM de  $\text{AgNO}_3$ , mantuvo su espectro de absorción con su mayor banda en 403 nm, pero disminuyó su intensidad relativa de absorbancia, en el caso del espectro UV-Vis con 1,2mM de  $\text{AgNO}_3$  hubo un corrimiento en el azul de 5nm de la banda característica de las AgNPs y una disminución de su intensidad, esto puede ser que el proceso de síntesis aún seguía y por eso el

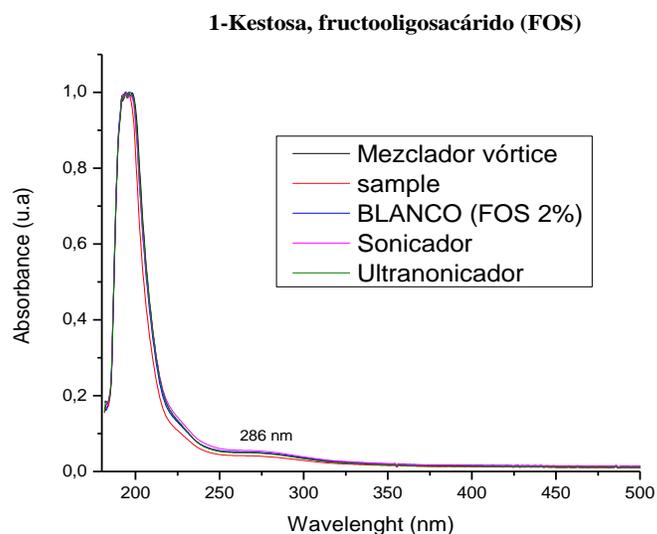
aumento de energía en la solución de AgNPs con 1,2 mM de  $\text{AgNO}_3$ . La disminución de las ondas en las dos concentraciones puede ocasionar la agregación de nanopartículas y como producto su precipitación, por lo que el agregado mantiene en el fondo de la celda y no absorbe el haz de luz.

### Homogeneidad de fructooligosacárido (FOS)

En la Figura 15 muestra el espectro de absorción del FOS con diferentes tipos de procesos de mezclado en agua.

**Figura 15**

*Homogeneidad de 1-Kestosa, fructooligosacárido (FOS).*



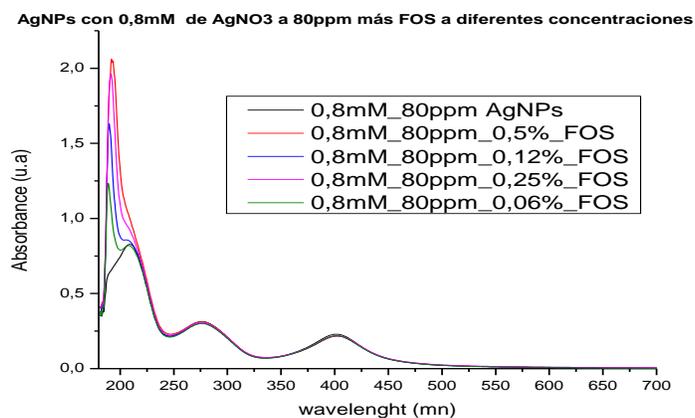
El estudio muestra una banda característica en 286 nm y que la estructura del FOS no tiende a romperse a pesar de pasar por diferentes procesos de mezcla. Por lo que para el estudio de la mezcla entre el FOS y las AgNPs se utilizó el proceso de sonicación.

### Análisis de las AgNPs en FOS

En las Figuras 16 y 17 se muestra espectros de UV-Vis del aditivo híbrido (AgNPs + FOS) con 80 ppm de AgNPs y diferentes concentraciones del FOS.

**Figura 16.**

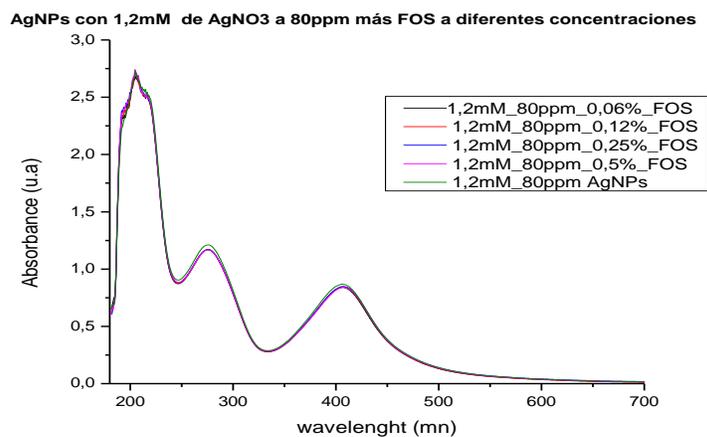
*Espectros de absorción de 80 ppm de AgNPs con 0,8 mM de  $AgNO_3$*



*Nota:* \*Espectros de absorción de 80 ppm de AgNPs con 0,8 mM de  $AgNO_3$  y a diferentes porcentajes de FOS.

**Figura 17.**

*Espectros de absorción de 80 ppm de AgNPs con 1,2 mM de  $AgNO_3$*



*Nota:* Espectros de absorción de 80 ppm de AgNPs con 1,2 mM de  $AgNO_3$  y a diferentes porcentajes de FOS.

La estabilidad de las AgNPs con concentración de 0,8 mM de  $AgNO_3$  se mantuvo en 403 nm luego de haber sido inducido con FOS a diferentes concentraciones, con una

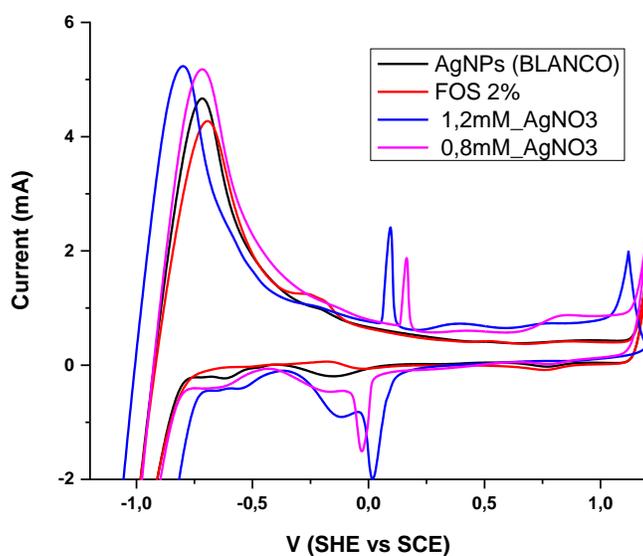
diferencia de absorbancia de 0,0106 U.a, de igual manera para las AgNPs con 1,2 Mm de  $\text{AgNO}_3$  con una diferencia de absorbancia de 0,017 U.a

### **Análisis de Voltametría cíclica y diferencial**

En la Figura 18 se muestran curvas de I vs V de las AgNPs con diferente concentración de  $\text{AgNO}_3$  y del compuesto FOS.

**Figura 18.**

*Procesos de oxidación y reducción.*

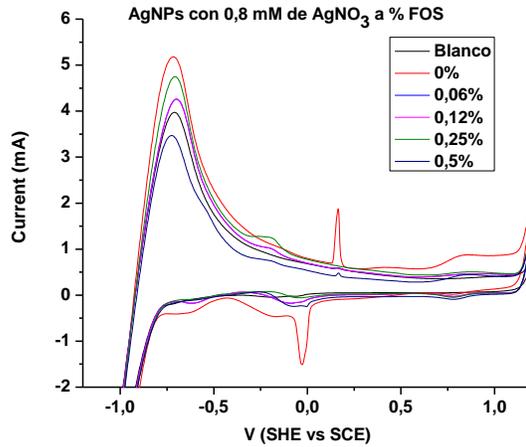


*Nota:* Análisis de voltamperometría cíclica.

En la Figura 19 muestran las curvas de Voltametría cíclica y en la Figura 20 las curvas de Voltametría diferencial de las AgNPs con 0,8 mM de  $\text{AgNO}_3$  a diferentes porcentajes de FOS.

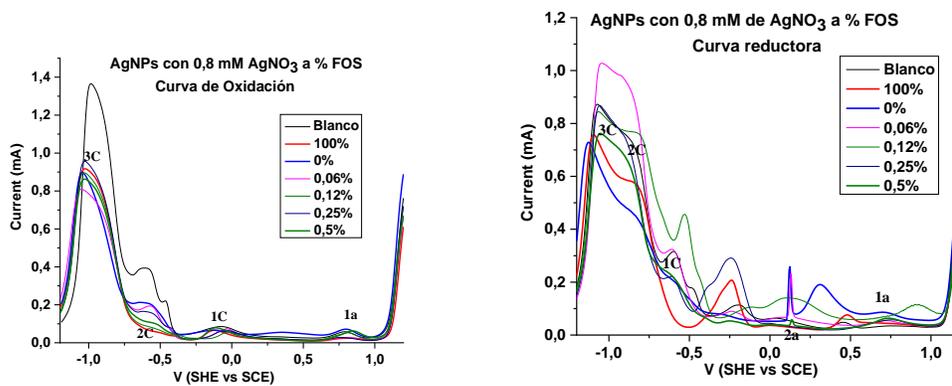
**Figura 19.**

Procesos de oxidación y reducción por voltametría cíclica de 0,8mM a diferentes % de FOS.



**Figura 20.**

Procesos de oxidación y reducción por Voltametría diferencial de 0,8mM a diferentes % de FOS.

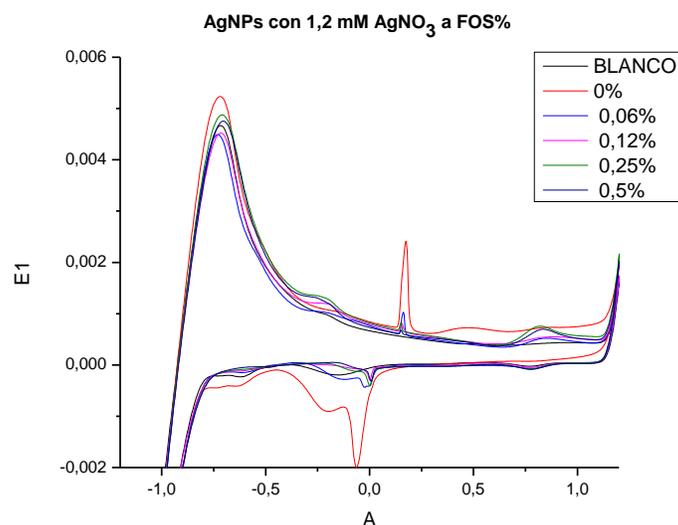


Nota: Voltametría diferencial de 0,8 mM AgNPs con un potencial de +1.2 a -1.2 V

En la Figura 21 muestran las curvas de Voltametría cíclica y en la Figura 22 las curvas de Voltametría diferencial de las AgNPs con 1,2 mM de  $\text{AgNO}_3$  a diferentes % de FOS.

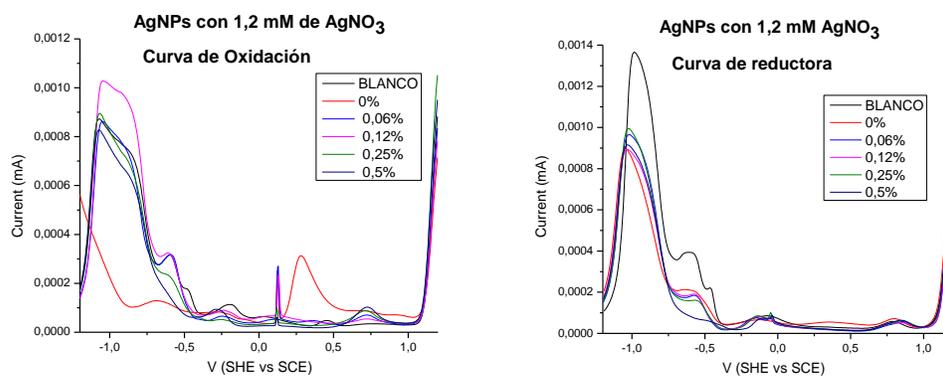
**Figura 21.**

*Procesos de oxidación y reducción por Voltametría cíclica de 1,2mM a diferentes %FOS.*



**Figura 22.**

*Procesos de oxidación y reducción por Voltametría diferencial de 1,2mM a diferentes %FOS.*



*Nota:* Voltametría diferencial de 1,2mM AgNPs con un potencial de +1.2 a -1.2 V.

El comportamiento electroquímico del aditivo híbrido estudiado está profundamente influenciado por la naturaleza química de sus sustituyentes tanto de  $\text{AgNO}_3$  a

concentraciones de (0,8 y 1,2) mM con FOS que dependiendo su concentración presenta actividad antioxidante según Ojwach (2020). Aportar información sobre el comportamiento redox del aditivo. El aditivo híbrido realizado con  $\text{AgNO}_3$  de 0,8mM se reduce más fácil que el hecho a 1,2mM de  $\text{AgNO}_3$  y esta información se refleja con las técnicas VC y VD observando con más detalle en las curvas de VD es probable que el efecto estérico sobrepase el efecto electrónico y, en consecuencia,  $\text{AgNO}_3$  de 1,2mM se oxida más difícilmente que  $\text{AgNO}_3$  de 0,8mM. Estas posibles interacciones fueron evidenciadas por los esquemas redox elaborado por el aditivo investigado.

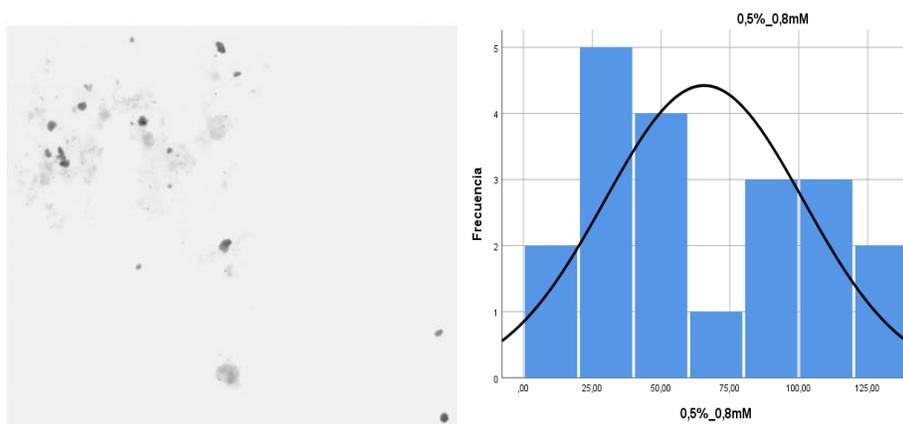
Más detalles de los valores de oxidación y reducción se encuentran en el anexo A.

### **Determinación de la morfología y tamaño de las AgNPs.**

En las Figuras 23 y 24 se muestran micrográficas de STEM y el espectro de tamaño de nanopartículas analizadas con el programa FIJI.

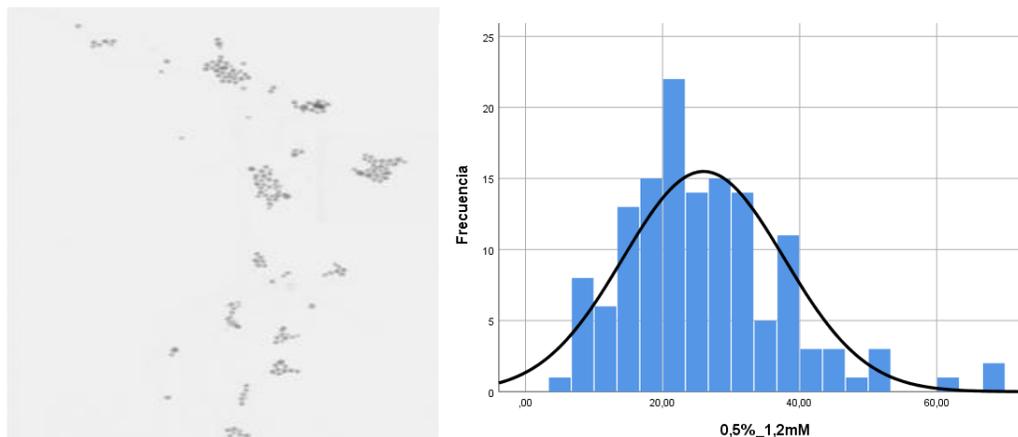
#### **Figura 23.**

*Distribución de tamaño de las nanopartículas de plata 0,8mM inducidas con FOS.*



**Figura 24.**

*Distribución de tamaño de las nanopartículas de plata 1,2mM inducidas con FOS*



Las micrografías muestran en 76% de nanopartículas esféricas y un 24% asimétricas. Los histogramas de distribución de tamaños muestran tamaños de  $52,18 \pm 35,65$  nm y  $51,66 \pm 26,28$  nm para las muestras de AgNPs con 0,8 mM y 1,2 mM de  $\text{AgNO}_3$ , respectivamente. Estos resultados corroboran que se logró reproducir las AgNPs con forma esférica y tamaños deseados para este trabajo. En la Tabla 4 se muestra los valores de la distribución de tamaños obtenida por la técnica TEM del aditivo con diferentes concentraciones de  $\text{AgNO}_3$ : FOS. En la tabla 5 mostraron un diámetro promedio hidrodinámico para 0,8 mM y 1,2 mM de  $\text{AgNO}_3$  inducidas con FOS de  $91,3 \pm 1,15$  nm y  $100,3 \pm 1,53$  nm, respectivamente.

**Tabla 4.**

*Resumen del tamaño promedio STEM*

concentración		1,2mM	0,8mM	Promedio	
				1,2mM	0,8mM
Control	Dilución	$16,43 \pm 6,73$	$16,06 \pm 10,73$	6,73	16,43
FOS %	0,06	$125,05 \pm 60,61$	$62,62 \pm 33,55$	51,66±26,28	52,18±35,65
	0,12	$25,58 \pm 14,10$	$41,68 \pm 26,31$		
	0,25	$30,07 \pm 18,85$	$38,84 \pm 46,68$		
	0,5	$25,97 \pm 11,57$	$65,61 \pm 36,08$		

Tabla 5.

Resumen del tamaño promedio DLS

concentración	1,2mM	0,8mM	Promedio	
			1,2mM	0,8mM
<b>Dilución Control</b>	33,3±11,1	14,5±6,4	41,16±12,43	14,13±5,83
	45,6±14,2	13,4±4,7		
	44,6±12,0	14,5±6,4		
<b>80ppm</b>	102±1,5	56,2±1,1	100,3±1,53	91.3±1,15
	100,9±1,6	98,8±1,1		
	99,2±1,5	118,9±1,2		

Los resultados que se aprecian en las dos técnicas el tamaño de AgNPs incrementan cuando se induce el FOS. Esto se debe a que el polímero recubre a las NPs evitando su interacción, aumentando con ello su tamaño total (Ardanii, 2017).

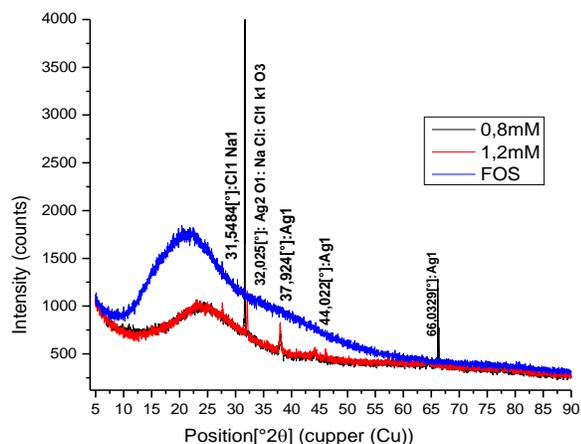
Además, se observa que las dimensiones de las AgNPs obtenidas mediante la técnica del STEM los tamaños casi dos veces inferiores a los tamaños brindados por DLS. Esta disconformidad entre técnicas se ha anunciado en la literatura (Bolaño, 2019), efecto que se puede dar por la polidiversidad de las NPs o por dispersión de luz que bifurca en diferentes direcciones ya que las NPs se encuentran en movimiento aleatorio y sus posiciones varían, haciendo que la medición de tamaño se altere (Pimentel, 2014).

### **Análisis de difracción de rayos X.**

En la figura 25, se muestran los espectros de difracción de rayos X de las AgNPs con las diferentes concentraciones de  $\text{AgNO}_3$ .

Figura 25.

*Espectros de DRX del FOS las AgNPs con 0,8mM y 1,2mM de AgNO<sub>3</sub>*

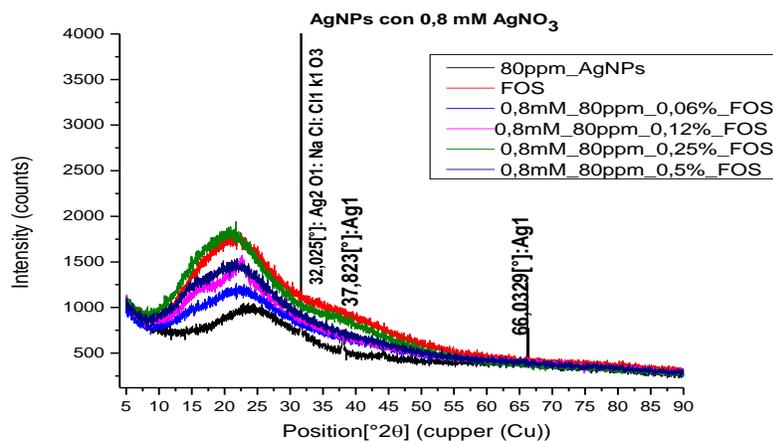


Los resultados muestran los ángulos  $2\theta$  en  $37,924^\circ$  y  $44,022^\circ$  que corresponde a los planos característicos de  $Ag^0$  en (111) y (200) respectivamente. Además, se observa la existencia un pico en  $31.4282^\circ$  que corresponde al NaCl, y en  $32.025^\circ$  que corresponden a KCl y  $Ag_2O$ , que son impurezas de las nanopartículas (Edison, 2012). En el espectro de DRX del FOS se observa una banda ancha que es peculiar de los compuestos orgánicos y sin presencia de impurezas en ella.

En las Figuras 26 y 27 se muestran espectros de difracción de rayos X del aditivo híbrido con diferentes concentraciones de FOS y de los diferentes controles (FOS y AgNPs).

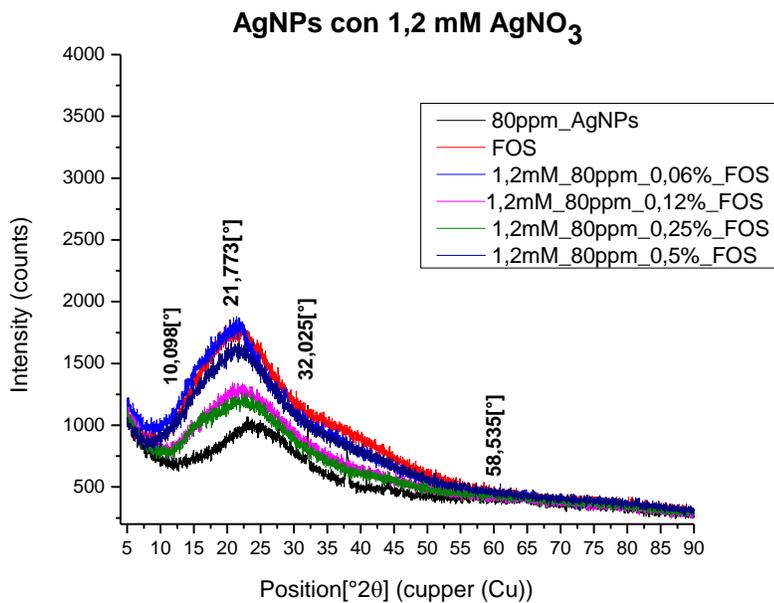
Figura 26.

*Espectros de difracción de AgNPs con 0,8mM AgNO<sub>3</sub>*



**Figura 27.**

*Espectros de difracción de AgNPs con 1,2mM AgNO<sub>3</sub>*



Estos resultados muestran poca o nula información de la presencia de Ag<sup>0</sup>, esto es probable que al mezclar el FOS con las AgNPs la resolución del equipo no permite visualizar la presencia de la plata cero y lo que se observa es la banda característica del compuesto FOS.

### **Análisis biológico**

La tabla 5 muestra los resultados obtenidos en la medición de los halos de inhibición por triplicado y por el factor de relación con respecto al volumen entre el antibiótico y el aditivo en una relación (1:4) respectivamente.

Tabla 6.

## Resultados de halos de inhibición microbiológicos

	N° CAJA	<i>E. coli</i>				<i>S. aureus</i>			
		1	2	3	4	5	6	7	8
AgNPs 0,8mM (mn)	FOS (%)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
N° CAJA		9	10	11	12	13	14	15	16
Halos de inhibición (mm)	Control (mm)	26	32	29	25	27	31	25	28
		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
AgNPs 1,2mM (mn)	FOS (%)	7	14	7	7	7	7	7	0,1
		10,5	21	14	10,5	14	10,5	10,5	0,1
		14	24,5	17,5	17,5	17,5	21	14	0,1
		17,5	35	24,5	21	31,5	24,5	21	0,1
Halos de inhibición (mm)	Control (mm)	34	29	28	32	29	26	35	26
		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
AgNPs 0,8mM (mn)		35	31,5	28	24,5	35	31,5	28	24,5
		24,5	28	31,5	35	24,5	28	31,5	35
AgNPs 1,2mM (mn)		21	17,5	24,5	28	21	17,5	24,5	28
		28	24,5	17,5	21	28	24,5	17,5	21

Estos resultados muestran los halos de inhibición de las nanopartículas de plata con inclusión de FOS, los cuales mantienen sus propiedades antibacterianas a mayor concentración de  $\text{AgNO}_3$ .

## Análisis Estadísticos

- En primera apelación se confirmó que los resultados obtenidos surgen de una población con distribución Normal, tanto con la prueba de Shapiro - Wilk (menor a veinte datos), según la tabla 6, Con cada hipótesis, se comparó el valor de significancia de 0,05 a 95% de confiabilidad, de la siguiente forma:
- Si el nivel de significancia es mayor a 0,05 se aprueba  $H_0$  (hipótesis inicial, son iguales).
- Si el nivel de significancia es menor a 0,05 se aprueba  $H_a$  (hipótesis alterna, no son iguales).

Para el análisis de similitud, se tomó en cuenta dos casos:

- Si las muestras surgen de poblaciones con distribución normal se ejecuta pruebas paramétricas (desviación estándar, media): T student, ANOVA.
- Si las muestras NO surgen de poblaciones con distribución normal se ejecuta pruebas no paramétricas (orden, signos): Kruskal Wallis.

**Tabla 7.**

*Pruebas de normalidad*

Pruebas de normalidad			
	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
E_AgNPs_12mM_0,06%_FOS	0,546	16	0,000
E_AgNPs_12mM_0,12%_FOS	0,723	16	0,000
E_AgNPs_12mM_0,25%_FOS	0,777	16	0,001
E_AgNPs_0,5%_FOS	0,808	16	0,003
E_Erthapenem_12mM	0,823	16	0,006
E_Agua_destilada_12mM	.	16	.
A_AgNPs_12mM_0,06%_FOS	0,546	16	0,000
A_AgNPs_12mM_0,12%_FOS	0,730	16	0,000
A_AgNPs_12mM_0,25%_FOS	0,773	16	0,001
A_AgNPs_0,5%_FOS	0,639	16	0,000
A_Erthapenem_12mM	0,723	16	0,000
A_Agua_destilada_12mM	.	16	.
AgNPs	0,868	16	0,025
AgNPs_80ppm	0,868	16	0,025

\*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

En la prueba de Normalidad todos los resultados tienen un nivel de significancia inferior a 0,05 por lo cual se aprueba  $H_a$ , donde los resultados NO surgen de poblaciones con distribución normal, por tanto, para la similitud de agrupaciones se ejecuta pruebas no paramétricas: Kruskal Wallis.

### Análisis por tiempo de incubación comparativo

En la tabla 7 se muestra el detalle estadístico descriptivo por los halos de inhibición al incubar las muestras en un lapso de 24 horas.

**Tabla 8.**

*Comparación entre todas las muestras a las 24 horas.*

<b>Estadísticos descriptivos</b>	<b>Media</b>	<b>Desv. Desviación</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
A_AgNPs_12mM_0,06%_FOS	5,275	3,0858	0,1	7,0
A_AgNPs_12mM_0,12%_FOS	8,775	5,3792	0,1	14,0
A_AgNPs_12mM_0,25%_FOS	13,150	8,1906	0,1	21,0
A_AgNPs_0,5%_FOS	19,275	12,0820	0,1	31,5
A_Erthapenem_12mM	31,250	3,8902	27,0	35,0
A_Agua_destilada_12mM	0,100	0,0000	0,1	0,1
AgNPs	29,750	4,0415	24,5	35,0
AgNPs_80ppm	22,750	4,0415	17,5	28,0
E_AgNPs_12mM_0,06%_FOS	8,750	3,1305	7,0	14,0
E_AgNPs_12mM_0,12%_FOS	14,000	4,4272	10,5	21,0
E_AgNPs_12mM_0,25%_FOS	18,375	3,9391	14,0	24,5
E_AgNPs_0,5%_FOS	24,500	6,7626	17,5	35,0
E_Erthapenem_12mM	30,75	2,4631	28,0	34,0
E_Agua_destilada_12mM	0,100	0,0000	0,1	0,1

Con los resultados mostrados se puede concluir que existe un aumento el promedio de halo de inhibición conforme aumenta la concentración del aditivo; además el gold estándar tiene el mayor promedio y el control negativo que es el agua destilada obtiene el menor promedio.

En consecuencia, se determinó que tienen el mismo efecto inhibitorio y mayor valor de inhibición el Erthapenem.

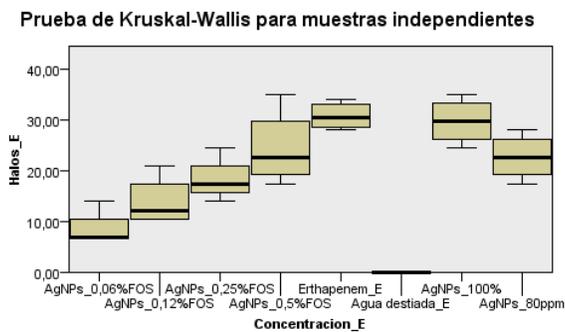
Para destacar estas diferencias entre las concentraciones del nuevo aditivo híbrido son representativas, se procesa las pruebas no paramétricas de Kruskal Wallis las cuales se parecían en las figuras 28a y 28b que se considerará como relación la interpretación:

- Si el nivel de significancia es mayor de 0,05 se aprueba  $H_0$  (Hipótesis inicial, son iguales).
- Si el nivel de significación es menor de 0,05 se aprueba  $H_0$  (Hipótesis alterna, No son iguales).

**Figura 28.**

*Prueba de Kruskal-Wallis a las 24 horas*

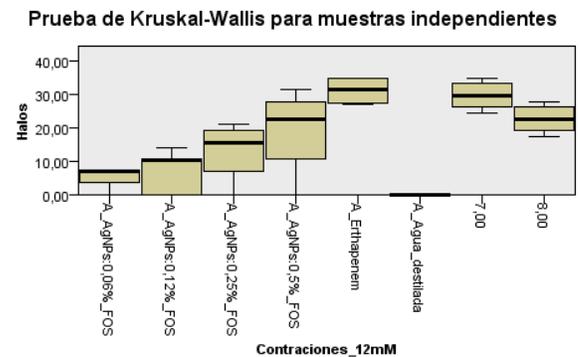
a)



N total	128
Estadístico de contraste	106,845
Grados de libertad	7
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,000

1. Las estadísticas de prueba se ajustan para empates.

b)



N total	125
Estadístico de contraste	94,085
Grados de libertad	7
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,000

1. Las estadísticas de prueba se ajustan para empates.

Como se observa en las figuras 28a y 28b, la Prueba de Kruskal-Wallis, el nivel de significancia es menor a 0,05, por lo cual, se aprueba la  $H_a$ , que se aprueba que hay diferencias a la tendencia central, por tanto, NO todas las medianas son parecidas.

Finalmente, se observa que no se tienen valores atípicos (extremos) en ninguna de las muestras, por lo cual, NO es necesario sacar datos extremos para mejorar los resultados.

### **Medición de los halos de inhibición**

En las tablas 13 y 14 se muestra la estadística en vínculo a los niveles de sensibilidad considerando como referencia la escala de Duraffourd:

1. **Nula:** (-) menor o igual a 7 mm
2. **Sensibilidad tope:** = (+) de 8 a 13 mm
3. **Sensibilidad central:** = (++) de 14 a 18 mm
4. **Extremadamente sensible:** = (+++) igual o mayor a 19 mm.

**Tabla 9.**

*Sensibilidad del aditivo para E.coli*

Sensibilidad	E AgNPs 12mM								Erthapene m		Agua destilada		Total	
	0,06%_FOS		0,12%_FOS		0,25%_FOS		0,5%_FOS		cant	%	cant	%	Cant	%
	cant	%	cant	%	cant	%	cant	%						
<b>Nula</b>	4	20	4	20	4	20	4	20			16	100	32	33,33
<b>Sensibilidad tope</b>	12	80	8	60	5	25	0	0	0	0	0	0	25	26,04
<b>Sensibilidad central</b>	0	0	4	20	3	15	0	0	0	0	0	0	7	7,291
<b>extremadamente sensible</b>	0	0	0	0	4	20	12	80	16	100	0	0	32	33,33
<b>Total</b>	16	100	16	100	16	100	16	100	16	100	16	100	96	100%

Tabla 10.

Sensibilidad del aditivo para *S. aureus*

Sensibilidad	A_AgNPs_12mM								Erthapenem		Agua destilada		Total	
	0,06%_FOS		0,12%_FOS		0,25%_FOS		0,5%_FOS		cant	%	cant	%	Cant	%
	cant	%	cant	%	cant	%	cant	%	cant	%	cant	%	Cant	%
Nula	16	100	4	25	4	25	4	25	0	0	16	100	44	45,84
Sensibilidad tope	0	0	12	75	0	0	0	0	0	0	0	0	12	12,5
Sensibilidad central	0	0	0	0	8	50	8	50	0	0	0	0	16	16,67
extremadamente sensible	0	0	0	0	4	25	4	25	16	100	0	0	24	25
<b>Total</b>	16	100	16	100	16	100	16	100	16	100	16	100	96	100%

## Capítulo 5

### Conclusiones

El estudio permitió la utilización de 1-Kestosa, fructooligosacárido (FOS) a cuatro porcentajes y dos concentraciones diferentes de  $\text{AgNO}_3$  para la formación de las nanopartículas de plata (AgNPs) para obtener una preparación líquida presentando una banda de absorción característica de las  $\text{AgNO}_3$  entre 450 a 550 nm, lo cual nos indica que el aditivo conservó sus propiedades fisicoquímicas en la inclusión con el efecto prebiótico del FOS.

El ensayo con DLS mostró el triple de tamaño promedio del nuevo aditivo híbrido en formulación líquida a concentraciones de (0,8 y 1,2) Mm de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) en comparación a los registrados con la técnica STEM de  $52,18 \pm 35,65$  nm y  $51,66 \pm 26,28$  nm, respectivamente y mostraba una buena homogeneidad y dispersión.

El resultado electroquímico del aditivo estudiado está influenciado por la naturaleza química de sus componentes, por lo cual un análisis detallado de las formas y alturas de los picos aporta información sobre el comportamiento oxidación-reducción.

El aditivo híbrido en formulación líquida a concentración de  $\text{AgNO}_3$  de 0,8 mM a diferentes porcentajes de FOS la sensibilidad tanto de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* fue totalmente nula, en cambio el aditivo con 1,2 mM de  $\text{AgNO}_3$  mostró mayor actividad antimicrobiana con el 0,5% FOS presentaron con medias de  $24,5 \pm 3,9$  mm para *E. coli* y  $19,275 \pm 12,08$  mm para *S. aureus*, existiendo diferencia significativa respecto al erthapenem según la escala de Durafford.

Presentó una sensibilidad para *Escherichia coli* de (20%) de cajas nula y un (80%) sumamente sensible, mientras *Staphylococcus aureus* con un (25%) de sensibilidad de cajas nula, (50%) de sensibilidad media y un (25%) resultando ser sumamente sensible.

## Capítulo 6

### Recomendaciones

Realizar pruebas a máximas concentraciones de AgNPs de plata para definir su efecto antimicrobiano consiguiendo de esta forma un alto impacto inhibitorio.

Ejecutar análisis toxicológicos del aditivo a nivel celular tanto *intro* como *in vivo*.

Probar *in vivo* el aditivo en pollos de diferentes edades expuestos a infecciones bacterianas.

Probar en otras especies como camarón el cual se afecta también por diferentes enfermedades bacterianas.

Al ser un producto novedoso no existente en el país se recomienda su protección industrial.

## Capítulo 7

### Bibliografía

- Ardoino, S. M. (2017). Antimicrobianos como promotores de crecimiento (AGP) en alimentos balanceados para aves: uso, resistencia bacteriana, nuevas alternativas y opciones de reemplazo / Antimicrobial as growth promoters (AGP) in poultry balanced feed: use, bacterial resistanc. *ciencia veterinaria*. Recuperado el 25 de Octubre de 2020, de <https://cerac.unlpam.edu.ar/index.php/veterinaria/article/view/2733>.
- Ardoino, S., Toso, R., M.S.1, T., Álvarez1, H., Mariani2, E., Cachau2, P., y otros. (2017). Antimicrobianos como promotores de crecimiento (AGP) en alimentos balanceados para aves: uso, resistencia bacteriana, nuevas alternativas y opciones de reemplazo. Recuperado el 10 de Septiembre de 2019, de <https://cerac.unlpam.edu.ar/index.php/veterinaria/article/view/2733>.
- ATCC. (2019). *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach (ATCC® 25923™) Recuperado el 22 de Diciembre de 2019, de <https://www.atcc.org/Products/All/25923.aspx>.
- American Academy of Pediatrics. (2020). Healthy children (CB, Google traductor, trad). España.
- Ardanii. (2017). Enhancement of the stability of silver nanoparticles synthesized using aqueous extract of *Diospyros discolor* Willd. leaves using polyvinyl alcohol. IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng. 188.

- B.kumar, C. (2014). Potosynthesis and biological activity of silver nanoparticles using Passiflora tripartita fruit extracts. *Advanced Materials Letters*. (CB, Google traductor, trad). Ecuador.
- Kumar, B. (2014). *Bioinorganic Chemistry and Applications*. 1-7.
- Botero, L. (2014). Producción y caracterización de la enzima recombinante fructosiltransferasa de *Aspergillus oryzae* en *Pichia pastoris* GS115 (Tesis de Grado). *Pontificia Universidad Javeriana* Recuperado el 10 de Septiembre de 2019, de <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/16666/BoteroRuteLinaMarcela2015.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Bolaño. (2019). crecimiento y caracterización de películas finas de muestras híbridas obtenidas mediante la síntesis de nanopartículas de plata.
- Cao, H., & Karasawa, Y. (2005). Effects of Green Tea Polyphenols and Fructooligosaccharides in Semi-purified Diets on Broilers Performance and Caecal Microflora and Their Metabolites. (CB, Google traductor, trad). pag 85-89. *Asian-Aust.*
- Corzo, N. (2015). Prebióticos; concepto, propiedades y efectos beneficiosos. Recuperado el 14 de Octubre de 2019, <http://www.aulamedica.es/nh/pdf/8715.pdf>.
- Chiriboga, P. (2015). Evaluación de tres balanceados energéticos-proteicos comerciales y dos aditivos alimentarios en la alimentación de pollos parrilleros. *Tumbaco, pichincha (tesis de grado)*.
- Díaz, M. P. (2013). SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA BIOLÓGICAMENTE ASISTIDA CON OPUNTIA SP. Y SU INCORPORACIÓN EN MEMBRANAS POLIMÉRICAS NANOFIBROSAS. Saltillo, Coahuila.

- Dolores, M., & Ranilla, M. (2002). Los aditivos antibióticos promotores del crecimiento de los animales: situación actual y posibles alternativas. *Producción Animal*.
- Ecuador, M. d. (2018). INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA REPORTE DE DATOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS EN ECUADOR 2014-2018. Recuperado el 19 de Septiembre de 2019, de *Ministerio de Salud Publica del Ecuador*, [https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2019/08/gaceta\\_ram2018.pdf](https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2019/08/gaceta_ram2018.pdf).
- García, Y., Mercedes, G., López, R., Bocourt, Z., & Rodríguez, L. (2012). Los prebióticos en la alimentación de animales monogástricos. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 46(3), 231-236.
- Gauthier, R., Bodin, C., & Fernández, A. (2011). Alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento para pollos (3ª ed.). Madrid, España, *La alternativa avicola*, 19-23.
- Guerra, L. (2017 ). Evaluación de la producción de fructooligosacáridos a partir de células inmovilizadas de *Pichia pastoris* productoras de una fructosiltransferasa. Recuperado el 08 de Noviembre de 2020, de <http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/handle/21000/12924>.
- Gobernado, M. (2007). Ertapenem. Recuperado el 08 de Noviembre de 2020, de [https://seq.es/wp-content/uploads/2008/08/gobernado\\_revision.pdf](https://seq.es/wp-content/uploads/2008/08/gobernado_revision.pdf).
- Latorre, M., & Fondevila, M. (2010). Nanopartículas de plata como aditivo en alimentación animal. *Alimentación animal*. Recuperado el 14 de Octubre de 2019, de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3331312>.
- Madrid, A. (2017). Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata a partir de varios extractos pigmentados de dos plantas para su aplicación en celdas solares

híbridas. Recuperado el 21 de Enero de 2020, de <http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/handle/21000/294/browse?value=Madrid+Sani%2C+Alison+Tatiana&type=author>.

Mahmoud, T. (2012). Silver Nanoparticles in Poultry Production. *Journal of Advanced Veterinary*. (CB, Google traductor, trad). *Egipto*.

Recuperado el 14 de Octubre de 2019, de [https://www.researchgate.net/publication/309900728\\_Silver\\_Nanoparticles\\_in\\_Poultry\\_Production](https://www.researchgate.net/publication/309900728_Silver_Nanoparticles_in_Poultry_Production)

Mariño, A., Núñez, M., & Barreto, J. (2016). Microbiota, probióticos, prebióticos y simbióticos. Recuperado el 10 de Octubre de 2019, de <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=68527>

Mendoza, N. (2016). Fundamentos de los alimentos peletizados en la nutrición animal. *Dominios de las Ciencias*, 2(4). Recuperado el 10 de Septiembre de 2019, de <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/5802877.pdf>

Monge. (2009). Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades.

MSP. (2018). Resistencia Antimicrobiana (RAM). *Comité de Resistencia Antimicrobiana (RAM) se reunió en Quito*, Recuperado el 18 de Octubre de 2019, de <https://www.salud.gob.ec/comite-de-resistencia-antimicrobiana-ram-se-reunio-en-quito/>.

NÚÑEZ, N. V. (2010). nanopartículas de plata como microbicidas: actividad y mecanismos de acción contra la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (vih) y diferentes bacterias resistentes a antibióticos. Recuperado el 19 de Octubre de 2019, de <http://cdigital.dgb.uanl.mx/te/1080190951.PDF>.

- Olvera, A. S. (27 de 09 de 2019). *ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA PROTEIN-CORONA*. Recuperado el 12 de Septiembre de 2019, de [http://congresos.cio.mx/15\\_enc\\_mujer/cd\\_congreso/archivos/resumenes/S4/S4-MCS29.pdf](http://congresos.cio.mx/15_enc_mujer/cd_congreso/archivos/resumenes/S4/S4-MCS29.pdf)
- OMS. (2018). Resistencia a los antibióticos. Recuperado el 20 de Octubre de 2019, de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>.
- OPS, E. (2019). AGROCALIDAD prohíbe el uso del antibiótico colistina para uso o consumo animal. *Agencia de regulación y control fito y zosanitario – Agrocalidad*, Recuperado el 2 de Octubre de 2019, de [https://www.paho.org/ecu/index.php?option=com\\_content&view=article&id=2154:agrocalidad-prohibe-el-uso-del-antibiotico-colistina-para-uso-o-consumo-animal&Itemid=360](https://www.paho.org/ecu/index.php?option=com_content&view=article&id=2154:agrocalidad-prohibe-el-uso-del-antibiotico-colistina-para-uso-o-consumo-animal&Itemid=360).
- Trujillo, L. (2016). Enzima productora de fructoligosacaridos, prebiótico de alta demanda para alimentación animal o industria láctea y sus derivados, recuperado el 8 de Noviembre de 2020, [http://www.espe-innovativa.edu.ec/wp-content/pdf/importaciones/produccion\\_enzimas/Terminos%20de%20referencia.pdf](http://www.espe-innovativa.edu.ec/wp-content/pdf/importaciones/produccion_enzimas/Terminos%20de%20referencia.pdf).
- Villarreal-Prieto, J. M. (2015). Evaluación de la actividad de los agentes antimicrobianos ante el desafío de la resistencia bacteriana. *mexicana de ciencias farmacéuticas*. Recuperado el 10 de Septiembre de 2019, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1870-01952015000200007](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952015000200007).
- Ortíz, R., Martínez, Y., & Hernández, R. (2006). Técnicas electroanalíticas, Parte II, Voltamperometría. Mérida: Universidad de los Andes.

- Pardell, X. (6 de 09 de 2020). *Apuntes de Electromedicina*. Recuperado el 2020, de Microscopía electrónica de STEM: <https://www.pardell.es/microscopia-electronica-de--stem-.html>
- Parra, P. (2019). Estudio retrospectivo de los principales agentes bacterianos aislados en aves comerciales y determinación de perfiles de resistencia de *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* desde el 2013 al 2018.
- Perez, L. (2016). Elaboración de helado dietético a partir de jarabe de yacón (*Smallanthus sonchifolius*) con características prebióticas. *High Andean*, 77–82.
- Pimentel, & M.-M. (2014). Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas.
- Quinn, P. J. (2011). *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*, 2nd Edition. [wiley.com/en-us/Veterinary+Microbiology+and+Microbial+Disease%2C+2nd+Edition-p-9781405158237](http://wiley.com/en-us/Veterinary+Microbiology+and+Microbial+Disease%2C+2nd+Edition-p-9781405158237).
- Rocha, C. (2015). RESISTENCIA EMERGENTE A LOS ANTIBIÓTICOS: UNA AMENAZA GLOBAL Y UN PROBLEMA CRÍTICO EN EL CUIDADO DE LA SALUD. [https://www.scielosp.org/article/ssm/content/raw/?resource\\_ssm\\_path=/media/assets/rpmesp/v32n1/a20v32n1.pdf](https://www.scielosp.org/article/ssm/content/raw/?resource_ssm_path=/media/assets/rpmesp/v32n1/a20v32n1.pdf).
- Rodolfo, Z. (2012). Metodologías para la síntesis de nanopartículas. <http://mundonano.unam.mx/ojs/index.php/nano/article/download/45167/40717>.
- Ruiz, P. (2018). Elaboracion y caracterizacion nutricional de un alimento concentrado a base de maiz-soya con inclusion del fos y nanoparticulas de plara para mejor su desempeño. 19.

- Sánchez, C. (2017). *IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DEL COMPLEJO Burkholderia cepacia, BACTERIA PRODUCTORA DE ANTIBIÓTICOS, MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL*. Quito: Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito.
- Sánchez, M. (2017). SÍNTESIS ECOLÓGICA Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA. [http://sappi.ipn.mx/cgpi/archivos\\_anexo/20070793\\_5375.pdf](http://sappi.ipn.mx/cgpi/archivos_anexo/20070793_5375.pdf).
- Santos. (2015). Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides that stimulate the gut microbiota. (CB, Google traductor, Trad). Pag 48-62. Madrid Spain.
- Serrano, O. (2012). Síntesis verde de nanopartículas de plata y óxido de cobre sobre fibras de fique. 89.
- Takabait, F., Mahtout, L., Pérez, L., Carrasco, B., & Sánchez, P. (2016). Obtención de nanopartículas de carbonato de calcio a partir de precursores inorgánicos y sacarosa como aditivo con potencial utilización como biomaterial. Preparation of calcium carbonate as nanoparticles from inorganic precursors and sucrose as additive. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, 179-184.
- Tran, Q., Nguyen, V., & Le, A. (2013). Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology* (CB, Google traductor, Trad). pag 1-20. Madrid Spain.
- Wang, X. (2017). La reactividad similar a la lacasa de los nanomateriales de óxido de manganeso para la conversión de contaminantes: análisis de velocidad y voltamperometría cíclica. <https://www.nature.com/articles/s41598-017-07913-2>.
- Alves, M. (05 de 2018). *Metodologías analíticas para la determinación y especiación de As en aguas y suelos*. Recuperado el 22 de 9 de 2020, de Técnicas

electroquímicas para la determinación y especiación de arsénico en aguas:

<https://paginas.fe.up.pt/~cigar/html/documents/CapMonografia2.pdf>

Ardoino, S. M. (2017). Antimicrobianos como promotores de crecimiento (AGP) en alimentos balanceados para aves: uso, resistencia bacteriana, nuevas alternativas y opciones de reemplazo / Antimicrobial as growth promoters (AGP) in poultry balanced feed: use, bacterial resistanc. *ciencia veterinaria*, <https://cerac.unlpam.edu.ar/index.php/veterinaria/article/view/2733>.

Arroyo, G. V. (2018). síntesis y caracterización de nanopartículas de plata a partir del extracto de fruto de geranio (*Pelargonium domesticum*)

Avila, C., & Benavides, D. (2013). Estudio de factibilidad para la elaboración de alimentos balanceados para pollos broilers (Tesis de Grado). *Universidad Central del Ecuador-Facultad de Ciencias Economicas*.

Beltrán, M. (2009). Utilización de mananos oligosacáridos en cría y acabado de pollos de ceba como promotor de crecimiento (Título de Grado). *Escuela Superior Politécnica del Chimborazo*.

Castro, M. (2015). Uso de aditivos en la alimentación de animales monogás. <https://www.redalyc.org/pdf/1930/193017842007.pdf>.

Cerquera, A., Rodríguez, C., & Ruano, D. (2017). Análisis mineralógico, químico y porosimétrico de los agregados pétreos de una cantera perteneciente a la formación geológica de la sabána en el municipio de Soach-Cundinamarca. Bogotá: Universidad Católica de Colombia.

Chandran, P. (2006). Síntesis de nanotriángulos de oro y nanopartículas de plata utilizando extracto de planta de Aloe vera. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16599579/>.

CONICET. (2000). *Centro Científico Tecnológico Rosario CONICET*. Recuperado el 2020, de Microscopio electrónico de transmisión con unidad de barrido (STEM): <https://www.rosario-conicet.gov.ar/equipamiento/microscopio-electronico-de-transmision-con-unidad-de-barrido-stem>

Ecuador, M. d. (2018). INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA REPORTE DE DATOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS EN ECUADOR 2014-2018. *Ministerio de Salud Pública del Ecuador*, [https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2019/08/gaceta\\_ram2018.pdf](https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2019/08/gaceta_ram2018.pdf).

Edison. (2012). Instant green synthesis of silver nanoparticles using terminalia chebula fruit extract and evaluation of their catalytic on reduction of methylene blue. (CB, Google traductor, Trad).

[http://sappi.ipn.mx/cgpi/archivos\\_anexo/20070793\\_5375.pdf](http://sappi.ipn.mx/cgpi/archivos_anexo/20070793_5375.pdf).

Eptember. (Septiembre de 2012). *UV/VIS/IR SPECTROSCOPY ANALYSIS OF NANOPARTICLES*. (CB, Google traductor, Trad).

López, E. (2007). Estudio computaciona de la estructura y propiedades moleculares de híbridos de fullereno-oligofenilenovinileno. Chihuahua: Centro de Investigación en Materiales Avanzados, S.C.

Nieves Abril Díaz & J. Antonio Bárcena Ruiz. (2018). *Espectrofometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas*. Obtenido de

[https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/08\\_ESPECTROFOTOMETRIA.pdf](https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/08_ESPECTROFOTOMETRIA.pdf)

Olveira, F., & Gonzales, M. (2007). Probióticos y prebióticos en la práctica clínica. *Nutricion hospitalaria*, 22(2), 26-34.

Ojwach, J. (2020). Fructooligosacáridos sintetizados por fructosiltransferasa de un coprófilo autóctono *Aspergillus niger* cepa XOBP48 exhibe actividad antioxidante. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2212619820300292>

Riotorto, M. R. (2011). Prueba de Shapiro-Wilks, obtenido de [http://riotorto.users.sourceforge.net/R/noparam\\_shapiro/](http://riotorto.users.sourceforge.net/R/noparam_shapiro/).

Monge. (2009). Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades.

Rodolfo, Z. (2012). Metodologías para la síntesis de nanopartículas. <http://mundonano.unam.mx/ojs/index.php/nano/article/download/45167/40717>.

Serrano, O. (2012). Síntesis verde de nanopartículas de plata y óxido de cobre sobre fibras de fique. 89.

**ANEXOS**