

Universidad Nacional del Litoral

Facultad de Ingeniería Química

Tesis presentada como requisito para optar por el grado académico de
Magíster en Ciencias y Tecnología de los Alimentos



**“CONTROL DEL DESARROLLO DE HONGOS CONTAMINANTES
DE ALIMENTOS MEDIANTE IONES DOSIFICADOS POR
MATERIALES MICROPOROSOS”**

Autor: Lic. Carolina Chiericatti

Director: Dr. Juan Manuel Zamaro

Co-directora: Dra. María de la Luz Zapata de Basilico

*A mi vida...mi Mamá y
a la memoria de mi querido Padre.*

A la Universidad Nacional del Litoral que a través del Programa de Becas de Maestría y Doctorado para docentes de la Universidad Nacional del Litoral fue realizada esta tesis.

Se agradece al Proyecto CAI+D 12/9092 dirigido por la Dra. Maria de la Luz Zapata de Basilico por el apoyo económico recibido.

Al Centro Nacional de Catálisis (CENACA) y al Instituto de Investigaciones en Catálisis y petroquímica (INCAPE), por su colaboración.

A la Cátedra de Introducción a la Biología, por el apoyo para la realización de esta tesis.

A Juan Carlos y Malú quienes me han acompañado en todos los momentos de mi vida, por su amistad, su confianza, por su generosidad y su calidez humana... Mi eterno agradecimiento.!!

Al Dr. Juan Manuel Zamaro por su paciencia, sus conocimientos y su amistad.

A mi Mamá, Sandra y Juanjo por su apoyo, su paciencia, su aliento y su amor!!

A Laura, Elena, Eduardo, Silvina, Verónica, Karen, Hugo y Marta por su apoyo, su amistad, su paciencia y por el aguante... pero por sobre todas las cosas por acompañarme en todo momento...Gracias!!

A Alicia Guibert por su amistad.

A Paula, Magi, Maricel y Alides, mis amigas del alma.!!

A Mirta, Marisa, Guada Pedro, Caro, Bety, Gise, Leo y Naty, Cristina. .Gracias por el apoyo, aliento, y acompañarme siempre.!!

A mis tesinistas: Paula, Melina y Griselda.....Gracias por el aguante.!!

A todosSimplemente Gracias!!

RESUMEN

En esta Tesis se estudió el efecto inhibitorio de Ag y Cu incorporado en matrices microporosas sobre el crecimiento de diferentes hongos, que son problemáticos en las industrias alimenticias de nuestra zona. Se estudiaron las especies fúngicas: *Rhizopus oryzae* Went & Prins. Geerl, *Mucor circinelloides* Tiegh; *Geotrichum candidum* Link: Fr, *Saccharomyces cerevisiae* Meyen *Debaryomyces hansenii* (Zopf) Lodder & Kreger y *Zygosaccharomyces rouxii* (Boutroux) Yarrow. Los Hongos filamentosos fueron aislados de productos lácteos que provocaron alteración en los mismos a baja tensión de oxígeno y las levaduras fueron reactivadas del cepario propio del Laboratorio de Microbiología la F.I.Q.-UNL, las cepas fueron obtenidas a partir de bebidas alcohólicas a base de frutas contenidos en envase de plástico alterados y concentrado de jugo de naranja.

Se evaluó la capacidad antifúngica de dos tipos de materiales microporosos como matrices para la dosificación de iones y/o nanopartículas de Cu y Ag. Uno de los materiales fue mordenita, a la cual se incorporaron especies de Ag mediante intercambio iónico. Paralelamente, se efectuaron ensayos con soluciones de $\text{Ag}(\text{NO}_3)$ y Na-mordenita, para comparar la acción del metal sin la interacción con la estructura de zeolita. El otro material investigado fue una red organometálica conteniendo cobre, denominada HKUST-1, que fue sintetizada y luego evaluada contra los mismos microorganismos. Tras los ensayos microbiológicos, se efectuaron caracterizaciones físico-químicas de los sólidos para investigar las características de acción de dichos materiales. Se empleó microscopía electrónica de barrido (SEM), EPMA, difracción de rayos X (DRX), espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS), reducción a temperatura programada (TPR) y espectroscopía de absorción atómica (AA).

Se demuestra que ambos materiales son efectivos como antifúngicos, siendo las levaduras más sensibles que los mohos a la Ag-mordenita. La especie más sensible fue *Saccharomyces cerevisiae* mientras que el moho más resistente fue *Geotrichum candidum*. En el caso del MOF, se determinó que éste ejerce una fuerte actividad inhibitoria frente al crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* y *Geotrichum candidum*. Dicha actividad es debida a la habilidad del MOF de liberar iones a partir de su propia estructura, la cual

se degrada lentamente produciendo Cu(I) extrared en la superficie. De forma similar, el material Ag-mordenita presenta una acción antifúngica muy efectiva debido a una liberación de iones Ag(I) desde la matriz de zeolita, que actúan en forma directa con las paredes de los microorganismos.

Índice de contenidos

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

I.1	HONGOS	1
	I.1.1 Ubicación taxonómica fúngica	1
	I.1.2 Generalidades de los hongos	1
	I.1.2.1 Características generales de los hongos filamentosos	6
	I.1.2.2 Características generales de las levaduras	9
	I.1.3 Hongos dimorficos	11
I.2	IMPORTANCIA DE LA CONTAMINACIÓN FÚNGICA EN LAS INDUSTRIAS ALIMENTICIAS	11
	I.2.1 Estrategias para prevenir la contaminación fúngica	16
I.3	AGENTES ANTIMICROBIANOS: BIOCIDAS	17
	I.3.1 Mecanismos generales de acción antifúngica	20
	I.3.2 Derivados de metales pesados	21
	I.3.2.1 Compuestos de Plata	22
	o Mecanismo de acción de la Plata	23
	I.3.2.2 Compuestos de Cobre	24
I.4	MATERIALES PARA LA DOSIFICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS BIOACTIVAS	27
	I.4.1 Zeolitas	28
	I.4.1.1 Estructura de las zeolitas	29
	I.4.1.2 Propiedades de las zeolitas	31
	I.4.1.3 Mordenita	31

I.4.1.4	Estado del arte sobre metal-zeolitas aplicadas como antimicrobiano	32
I.4.2	Redes órgano-metálicas (MOFs)	34
I.4.2.1	HKUST-1	35
	OBJETIVOS	36
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS		
II.1	TOMA DE MUESTRAS, AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN, CONSERVACIÓN Y REACTIVACIÓN DE CEPAS FÚNGICAS	38
II.1.1	Toma de muestras de hongos filamentosos en industrias lácteas	38
II.1.2	Obtención de aislados de hongos filamentosos	38
II.1.3	Identificación de los hongos filamentosos aislados	38
II.1.4	Conservación de las cepas de hongos filamentosos	39
II.1.5	Reactivación de hongos unicelulares del cepario del Laboratorio de Microbiología de la FIQ.	39
II.2	ENSAYOS CON ANTIFÚNGICOS	40
II.2.1	Determinación de las curvas de crecimiento de las cepas fúngicas	40
II.2.2	Preparación de las suspensión de los microorganismos	40
II.2.2.1	Recuento de esporas en cámara Newbauer y en placa de Petri	41
II.2.2.2	Metodología utilizada en los ensayos de acción antifúngica	41
II.3	ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE Ag-MORDENITA	42
II.3.1	Preparación de Ag-mordenita	42
II.3.2	Evaluación de la capacidad antifúngica con soluciones de AgNO ₃	43

II.3.3	Evaluación de la capacidad antifúngica de Ag-mordenita	43
II.3.4	Ensayos con Na-mordenita	43
II.4	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE UNA RED ORGANOMETÁLICA (MOF) DE COBRE	44
II.4.1	Microorganismos utilizados	44
II.4.2	Preparación del MOF (HKUST-1)	44
II.4.3	Evaluación de la capacidad antimicrobiana del MOF (HKUST-1)	44
II.4.4	Evaluación de la capacidad antimicrobiana del Ácido Trimésico (BTC)	45
II.5	CARACTERIZACIONES FISICOQUIMICA DE LOS MATERIALES	45
II.5.1	Tratamientos efectuados a los materiales ensayados	45
	a) Filtración de los medios de cultivo ensayados con Ag-mordenita y HKUST-1	45
	b) Pruebas de estabilidad química del HKUST-1	45
II.5.2	Técnicas instrumentales de caracterización fisicoquímica	46
	a) Espectroscopía de absorción atómica (AA)	46
	b) Reducción a temperatura programada con H ₂ (H ₂ -TPR)	46
	c) Microscopía electrónica de barrido (SEM)	47
	d) Microanálisis químico elemental de rayos X por sonda de electrones (EPMA)	48
	e) Difracción de rayos X (DRX)	49
	f) Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS)	51
II.6	ESTUDIO ESTADÍSTICOS DE LOS DATOS OBTENIDOS	52

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1 IDENTIFICACIÓN Y REACTIVACIÓN DE LAS CEPAS FÚNGICAS	53
III.1.1 Identificación de las especies fúngicas aisladas	53
III.1.2 Reactivación de levaduras del cepario del Laboratorio de Microbiología de la FIQ	59
III.2 ENSAYOS CON AGENTES ANTIMICROBIANOS	64
III.2.1 Determinación de las curvas de crecimiento de las cepas fúngicas.	64
III.2.2 <i>ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS CON SOLUCIONES DE AgNO₃</i>	69
III.2.2.1 Curvas de desarrollo de hongos filamentosos empleando Ag(I) en solución	69
III.2.2.2 Curvas de desarrollo de levaduras empleando Ag(I) en solución	71
III.2.3 <i>ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS EMPLEANDO Ag-MORDENITA</i>	72
III.2.3.1 Curvas de desarrollo de hongos filamentosos empleando Ag-mordenita	73
III.2.3.2 Curvas de desarrollo de levaduras empleando Ag-mordenita	75
III.2.3.3 Actividad antifúngica de la matriz Na-mordenita	77
III.2.3.4 Caracterizaciones fisicoquímicas de Ag-mordenita	77
a) Espectroscopía de absorción atómica (AA)	77
b) Análisis elemental por sonda de electrones (EPMA)	80
c) Difracción de rayos X (DRX)	81
d) Reducción a temperatura programada con H ₂ (H ₂ -TPR)	83

III.2.3.5 Acción de Ag-mordenita contra los microorganismos	88
III.2.4 <i>ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS EMPLEANDO HKUST-1</i>	91
III.2.4.1 Evaluación de la capacidad antimicrobiana del HKUST-1	91
III.2.4.2 Evaluación de la capacidad antimicrobiana del Ácido Trimésico (BTC)	92
III.2.4.3 Caracterizaciones fisicoquímicas de HKUST-1	92
a) Difracción de rayos X (DRX)	92
b) Espectroscopía de absorción atómica (AA)	94
c) Espectroscopía fotoeléctrica de rayos X (XPS)	94
d) Espectroscopía Laser Raman (LRS)	96
e) Microscopía electrónica de barrido (SEM) y Microanálisis químico elemental de rayos X por sonda de electrones (EPMA)	97
CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES	100
Bibliografía	104
Anexos	115

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1	Estructura intracelular de una célula fúngica	7
Fig. 2	Crecimiento apical: ultraestructura de la hifa	8
Fig. 3	Estructura de la pared celular de una levadura	10
Fig. 4	Micrografía electrónica de una célula de levadura típica en brotación.	10
Fig. 5	Estructura de representación de la unidad básica de las zeolitas	29
Fig. 6	Comparación de los tamaños de poros de diferentes estructuras de zeolitas	30
Fig. 7	Estructura tridimensional de canales de mordenita	32
Fig. 8	Esquema de conectividad en HKUST-1	35
Fig. 9	Colonias en MEA , 7 días a 25°C de <i>Rhizopus oryzae</i>	54
Fig. 10a.	Esporangióforo de <i>Rhizopus oryzae</i> (lente objetivo 10x)	54
Fig. 10b.	Columela colapsada y esporangiosporos de <i>Rhizopus oryzae</i> (lente objetivo 40x)	55
Fig. 11	Colonias en MEA, 7 días a 25°C de <i>Mucor circinelloides</i>	56
Fig. 12	a-b Esporangios y esporangiosporos de <i>Mucor circinelloides</i> (lente objetivo 10x y 40x), c- Esporangios de <i>Mucor circinelloides</i> (lente objetivo 10x)	57
Fig. 13	Colonias en MEA, 7 días a 25°C de <i>Geotrichum candidum</i>	59
Fig. 14	Arthroconidias de <i>Geotrichum candidum</i> (lente objetivo a-40x, b-10x)	59
Fig. 15	Células vegetativas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (lente objetivo a-40x, b- 45 x)	61
Fig. 16	Células vegetativas de <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> (lente objetivo 45 x)	62

Fig. 17	Células vegetativas de <i>Debaryomyces hansenii</i> (lente objetivo a-40x, b-45x, c-10x)	64
Fig. 18	Curva que relaciona la concentración de Ag en solución y el contenido de Ag y Na logrado en la zeolita intercambiada, determinado por AA	79
Fig. 19	Espectros EPMA de sólidos de Ag-mordenita conteniendo diferentes cantidades de plata	81
Fig. 20	Patrones de difracción de rayos X de Na-mordenita y de Ag(14)mordenita.	82
Fig. 21	Patrón de reducción H ₂ -TPR de muestras de Ag-mordenita con diferentes contenidos de plata	84
Fig. 22	Localización de los sitios α , β y γ en la red de mordenita.	85
Fig. 23	a) Consumos parciales de H ₂ en cada región de TPR, respecto de la [Ag] en la zeolita; b) Carga % p/p de Ag en zeolita según AA y consumo de H ₂ determinado por TPR, respecto a la [Ag] en la solución de intercambio.	87
Fig. 24	Patrones de difracción de rayos X	94
Fig. 25	Análisis espectroscópico por XPS de muestras frescas y usadas de HKUST-1. Espectros procesados en la región Cu2p.	95
Fig. 26	Espectros Laser Raman de muestras frescas y usadas de HKUST-1	96
Fig. 27	Imágenes SEM de HKUST-1.	98
Fig. 28	Análisis EPMA efectuado en una pequeña área seleccionada sobre <i>S. cerevisiae</i> luego del ensayo con HKUST-1	98

INDICE DE GRÁFICAS

Graf. 1	Curva de crecimiento de <i>Debaryomyces hansenii</i>	65
Graf. 2	Curva de crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	65
Graf. 3	Curva de crecimiento de <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	66
Graf. 4	Curva de crecimiento de <i>Geotrichum candidum</i>	66
Graf. 5	Curva de crecimiento de <i>Rhizopus oryzae</i>	67
Graf. 6	Curva de crecimiento de <i>Mucor circinelloides</i>	68
Graf. 7	Curvas de desarrollo de hongos filamentosos empleando distintas concentraciones de [Ag] en solución	70
Graf. 8	Curvas de desarrollo de levaduras tratadas con distintas concentraciones de Ag (I) en solución	71
Graf. 9	Curvas de desarrollo de hongos filamentosos empleando Ag(6)Z	73
Graf. 10	Curvas de desarrollo de levaduras empleando Ag(6)Z	75
Graf. 11	Curvas de desarrollo de los microorganismos empleando HKUST-1	91

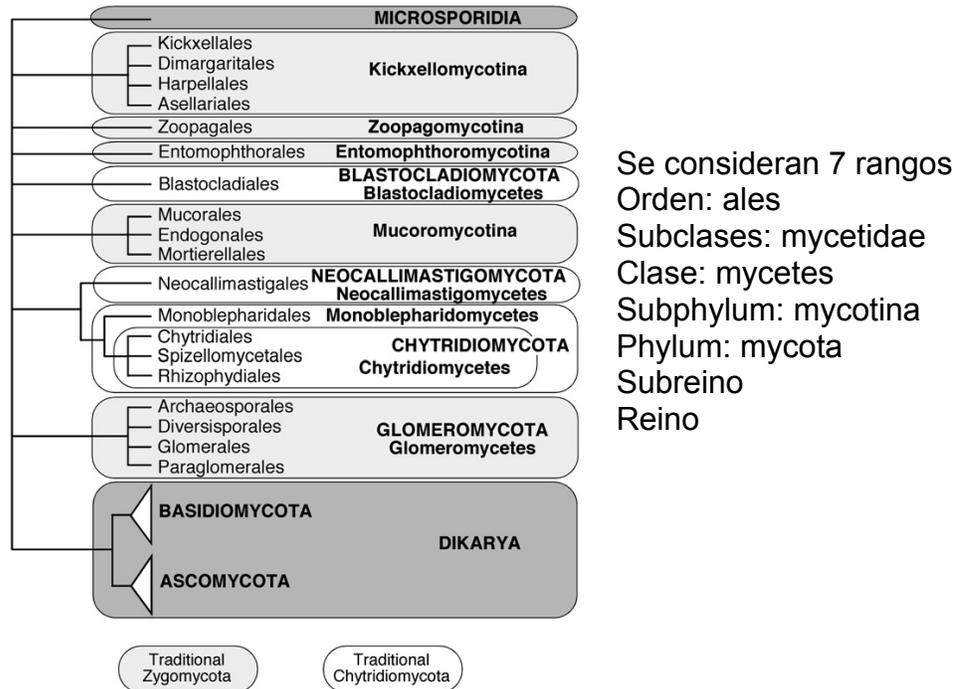
INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Requerimientos de nutrientes para el desarrollo de la célula fúngica.	2
Tabla 2	Diversidad de fuentes de carbono para levaduras y hongos filamentosos.	3
Tabla 3	Requerimientos de iones metálicos para el crecimiento fúngico y sus funciones metabólicas	4
Tabla 4	Principales polímeros presentes en la pared celular fúngica de acuerdo a Deacom, 2000 y Carlile <i>et.al.</i> , 2001	5
Tabla 5	Metabolismo energético en relación a los requerimientos de oxígeno.	6
Tabla 6	Alimentos específicos y levaduras alterantes asociadas.	14
Tabla 7	Clases de biocidas según el grupo químico.	18
Tabla 8	Mecanismo propuesto de actividad antifúngica.	21
Tabla 9	Efectividad de la plata y cobre frente a los microorganismos estudiados	25
Tabla 10	Resumen de literatura sobre el empleo de metal-zeolitas en aplicaciones antimicrobianas	33
Tabla 11	Relaciones atómicas de composición y % p/p de Ag y Na contenido en las zeolitas intercambiadas y el soporte sin intercambiar	78
Tabla 12	Cantidad de Ag liberada al medio de cultivo sin microorganismo en función del tiempo.	79
Tabla 13	Señales de difracción de rayos X de diversos óxidos de plata	83
Tabla 14	Consumos totales de H ₂ (μmol) de las diferentes muestras de Ag-zeolita y consumo por cantidad Ag en μmol (AA) en el rango de T° analizado por TPR entre temperatura ambiente y 900 °C	87
Tabla 15	Resultados de estudios fisicoquímicos mediante XRD, AAS y XPS de muestras de HKUST-1 fresca y sometidas a ensayos de estabilidad química.	93

I.1 HONGOS.

I.1.1 Ubicación taxonómica fúngica.

Los hongos pertenecen al reino Fungi, actualmente se encuentra clasificado de acuerdo al dendograma de Hibbert *et.al*, 2007 de la siguiente forma.



Dendograma Hibbert *et.al*, 2007

Los hongos que contaminan los alimentos se encuentran fundamentalmente en el Subreino DIKARIA y en el Subphylum Mucoromycotina.

I.1.2 Generalidades de los hongos.

Los hongos son organismos eucariotas, heterótrofos de nutrición absorptiva. La estructura vegetativa del hongo se denomina Talo y la misma puede ser unicelular (levaduras) o pluricelular (hongos filamentosos o mohos).

Los requerimientos nutricionales de los hongos son relativamente simples (Tabla 1, 2 y 3) y la mayoría de las especies son capaces de desarrollarse bien en condiciones aeróbicas, microaerófilas o algunas especies en condiciones anaeróbicas.

Tabla 1: Requerimientos de nutrientes para el desarrollo de la célula fúngica (Kavanagh, 2005).

Elementos	Fuentes comunes	Función celular
Carbono	Azúcares	Elementos estructurales de la célula fúngica en combinación con el hidrógeno, oxígeno y nitrógeno. Fuente de energía.
Hidrógeno	Protones del medio ácido.	Protones transmembrana fundamental para la nutrición de hongos. PH intracelular ácido (alrededor de 5-6) necesario para el metabolismo fúngico
Oxígeno	Aire, O ₂	Sustrato para las enzimas oxidativas respiratorias y otras de función mixta. Esencial para la síntesis de ergosterol y ácidos grasos insaturados
Nitrógeno	Sales de NH ₄ , urea, amino ácidos	Estructural y funcional como nitrógeno orgánico amino en proteínas.
Fósforo	Fosfatos	Transducción de energía, el ácido nucleico y la estructura de membrana.
Potasio	Sales de K ⁺	Balance Iónico y actividad enzimática.
Magnesio	Sales de Mg ²⁺	Actividad enzimática, estructura de la célula y organelas.
Sulfuro	Sulfatos, metionina	Sulfidril amino ácido y vitaminas.
Calcio	Sales de Ca ²⁺	Posible mensajero secundario en la señal de transducción.
Cobre	Sales de Cu ⁺	Pigmentos redox
Hierro	Sales de Fe ³⁺ quelandos por sideróforos y liberados como Fe ²⁺ dentro de la célula.	Proteínas hemo, citocromos.
Manganeso	Sales de Mn ²⁺	Actividad enzimática
Zinc	Sales de Zn ²⁺	Actividad enzimática
Niquel	Sales de Ni ²⁺	Actividad ureasa
Molibdeno	Na ₂ MoO ₄	Metabolismo de nitrato, vitamina B ₁₂

Tabla 2: Diversidad de fuentes de carbono para levaduras y hongos filamentosos (Walker, 1998).

Fuente de Carbono	Ejemplos típicos	Comentarios
Hexosas	D-glucosa, D-galactosa	Glucosa metabolizada por la mayoría de las levaduras y hongos filamentosos.
	D-fructosa, D-manosa	Si una levadura no fermenta la glucosa no fermenta los otros azúcares. Si la levadura fermenta la glucosa, fermenta la fructosa y manosa pero no necesariamente la galactosa.
Pentosas	L-arabinosa, D-xilosa, D-xilulosa, L-ramnosa.	Algunos hongos oxidan mejor las pentosas que la glucosa. <i>S.cerevisiae</i> puede utilizar xilulosa pero no xilosa.
Disacáridos	Maltosa, sacarosa, lactosa, trealosa, melobiosa, celobiosa, melezitosa.	Si una levadura fermenta la maltosa, generalmente no fermenta la maltosa y viceversa. Un gran número de levaduras utilizan disacáridos. Pocos mohos (ej. <i>R. nigricans</i>) no puede utilizar la sacarosa.
Trisacáridos	Rafinosa, maltotriosa	La rafinosa es sólo usada particularmente por <i>S.cerevisiae</i> pero utilizada completamente por otras <i>Saccharomyces</i> spp.
Oligosacáridos	Maltotetraosa, maltodextrinas	Metabolizadas por levaduras amilolíticas, no por cepas cerveceras.
Polisacáridos	Almidón, inulina, celulosa, hemicelulosa, quitina, sustancias pépticas.	Son raras las levaduras que fermentan los polisacáridos <i>Saccharomycopsis</i> spp. y <i>S. diastaticus</i> pueden utilizar almidón soluble. Muchos mohos pueden utilizar los polisacáridos dependiendo de la actividad enzimática extracelular.
Alcoholes alifáticos bajos	Metanol, etanol	Sustratos respiratorios para la mayoría de los mohos. Varias levaduras metilotróficas son utilizadas a nivel industrial.
Alcoholes del azúcar	Glicerol, glucitol	Oxidado por algunas hongos.
Ácidos orgánicos	Acetato, nitrato, lactato, malato, piruvato, succinato.	Muchas levaduras pueden oxidar los ácidos orgánicos pero pocos pueden fermentarlos.
Ácidos grasos	Oleato, palmitato	Varias levaduras pueden asimilar los ácidos grasos como carbono y fuente de energía.
Hidrocarburos	n-alcanos	Muchas especies de levaduras y hongos filamentosos desarrollan bien en C ₁₂ -C ₁₈ n-alcanos.

Aromáticos	Fenol, cresol, quinol, resurcinol, catecol, benzoato.	Pocas levaduras pueden utilizar estos compuestos. Varias levaduras utilizan los fenoles via cetoadoipato como fuente de carbono.
	Adenina, ácido úrico, butilamina, pentilamina, putrescina	Algunos hongos pueden utilizarlos como fuente de carbono y nitrógeno.
Misceláneos	Lignina	Degradado por los hongos de podredumbre blanca. Poca ganancia de energía pero hace disponible otros polisacáridos como celulosa y hemicelulosa.
	Queratínicos	Hongos queratofílicos

Tabla 3: Requerimientos de iones metálicos para el crecimiento fúngico y sus funciones metabólicas (Walker, 2004)

Ión metálico	Concentración en el medio de cultivo	Principales funciones celulares
Macroelementos		
K	2-4 mM	Osmoregulación, actividad enzimática
Mg	2-4 mM	Actividad enzimática, división celular
Microelementos		
Mn	2-4 μ M	Cofactor enzimático
Ca	< 1 μ M	Mensajero secundario, floculación de levadura.
Cu	1.5 μ M	Pigmentos redox.
Fe	1-3 μ M	Proteínas hemo, citocromo
Zn	4-8 μ M	Actividad enzimática, proteína estructural
Ni	~10 μ M	Actividad ureasa
Mo	1.5 μ M	Metabolismo del nitrato, vitamina B ₁₂
Co	0.5 μ M	Cobalamina, coenzimas.

Minerales como Ag, As, Ba, Cs, Cd, Hg, Li, Pb son tóxicos para los hongos afectando su desarrollo a concentraciones mayores a 100 μ M (Kavanagh, 2005). Los hongos presentan paredes celulares compuestas por diferentes polisacáridos

de acuerdo a los grupos taxonómicos (como quitina, glucanos, manano proteínas quitosano, ácido poliglucorónico o celulosa) juntos con pequeñas cantidades de proteínas y glicoproteínas (Tabla 4). Se ha demostrado que la pared celular es una estructura dinámica, donde se producen diferencias significativas cuantitativa y cualitativas no sólo entre diferentes especies de hongos, sino también diferencias morfológicas entre la misma especie en respuesta a condiciones ambientales de estrés.

Tabla 4: Principales polímeros presentes en la pared celular fúngica de acuerdo a Deacon, 2000 y Carlile, *et.al.*, 2001.

Grupos taxonómicos	Polímero fibrilares	Matriz polimerica	Presencia o ausencia de septos
Oomycetes	$\beta(1,3)$, $\beta(1,6)$ - Glucano celulosa	Glucano	Ausente
Chytridomycetes	Quitina; glucano	Glucano	Ausente
Zygomycetes	Quitina; quitosano	Ác. Poliglucorónico glucoromananoproteinas	Ausente
Basidiomycetes	Quitina ; $\beta(1,3)$ - $\beta(1,6)$ glucanos	$\alpha(1,3)$ -glucano Xylomananoproteinas	Presente (mayormente dilosporo)
Ascomycetes/ deuteromycetes	Quitina ; $\beta(1,3)$ - $\beta(1,6)$ glucanos	$\alpha(1,3)$ -glucano Galactomananoproteinas	Presente (con un poro central)

Las especies fúngicas responden de diversas formas frente a la disponibilidad de oxígeno en el medio. En la tabla 5 se observan los distintos grupos fúngicos en base a su metabolismo energético (Kavanagh, 2005).

Tabla 5: Metabolismo energético en relación a los requerimientos de oxígeno (Carlile *et.al.*, 2001).

Metabolismo energético		Ejemplos
Oxidativo obligado	El oxígeno es esencial para dichos hongos resultando aerobios obligados.	<i>Phycomyces, Rhodotorula</i>
Facultativos fermentativos	<p>Puesto que la energía se puede obtener tanto por procesos oxidativo como fermentativos por lo que son anaerobios facultativos.</p> <p>El metabolismo oxidativo, sin embargo, proporciona mucha más energía que la fermentación, por lo que los rendimientos más altos puede ocurrir bajo condiciones aeróbicas.</p>	<i>Mucor, Saccharomyces</i>
Fermentativo obligado	<p>El oxígeno no es necesario para la producción de energía, lo que no hay necesidad de oxígeno. Dado que, sin embargo, el oxígeno puede ser inofensivo o tóxico hay dos categorías posibles con respecto a su efecto.</p> <p>a- Facultativos anaerobios.</p> <p>b- Anaerobios obligados.</p>	<p>a- <i>Aqualinderella, Blastocladiá</i></p> <p>b- <i>Neocallimastix</i></p>

I.1.2.1 Características generales de los hongos filamentosos.

Por su variable morfología los hongos filamentosos muestran una gran diferencia en tamaño, estructura y actividad metabólica, formando diferentes tipos de colonias de crecimiento centrífugo y/o cuerpos fructíferos complejos. Estos últimos, poseen elaborados mecanismos de propagación y dispersión principalmente a través del aire.

Los mohos se reproducen por esporas, que pueden ser unicelulares o pluricelulares. Las esporas también pueden ser asexuales (producto de la mitosis celular) o sexuales (producto de la división celular por meiosis). Muchas especies producen los dos tipos de esporas. Las esporas de los mohos pueden permanecer

en el ambiente durante un tiempo muy prolongado (indefinido) y pueden soportar temperaturas y presiones extremas para, cuando las condiciones son favorables, germinar y formar una colonia.

Los mohos crecen como filamentos ramificados -hifas- que forman masas más o menos compactas llamadas micelio (Jennings y Lysek, 1999; Frisvad *et.al.*, 2007; Carlile *et.al.*, 2007), cuya estructura es cilíndrica, cenocítica (aseptada) o septada (con septos).

Las propiedades de los hongos filamentosos residen en la actividad del crecimiento del micelio, o, a nivel microscópico, en la actividad de la hifa (Fig.1). La pared celular de la hifa se compone de una parte microfibrilar embebida en una matriz de polisacáridos hidrosolubles. Las microfibrillas están constituidas de β -glucanos y quitina, siendo los constituyentes de los glucanos moléculas de glucosa unidas por enlaces β -1,3 y β -1,6, mientras que la quitina está compuesta por residuos de *N*-acetilglucosamina unidos por enlaces β -1,4. En la matriz amorfa se encuentran α -glucanos y glicoproteínas (Kavanagh, 2005).

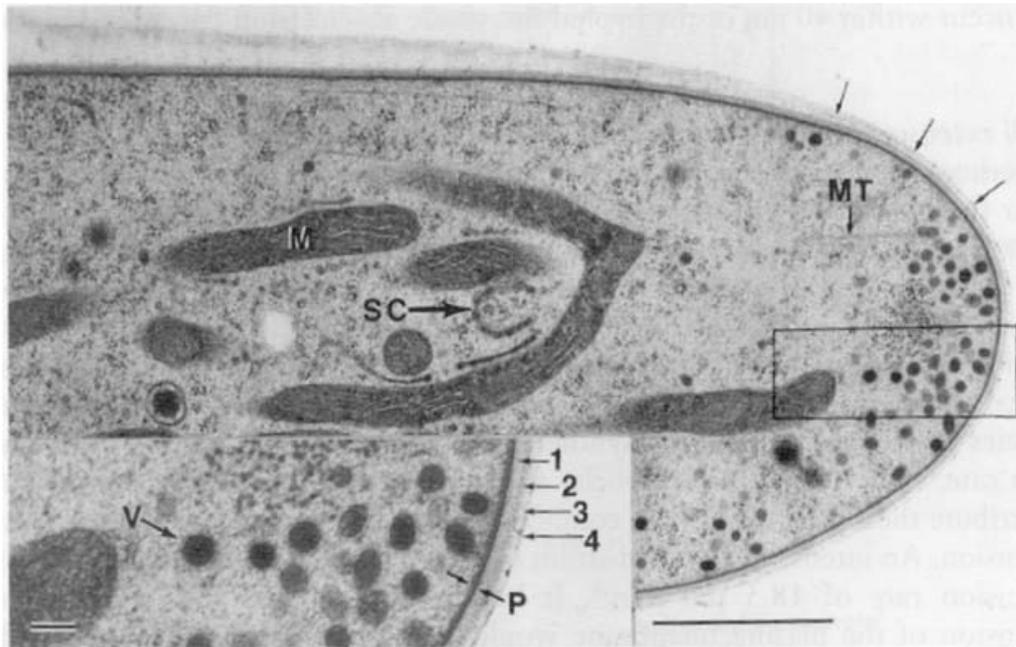


Figura 1: Estructura intracelular de una célula fúngica. Microscopía electrónica de transmisión – M: mitocondria; V: vacuola; MT: microtúbulos; SC: aparato de Golgi liso ,P: perfil liso de la membrana plasmática, 1,2,3,4: capas de la pared celular (Carlile, *et.al.*, 2001).

Las hifas cumplen funciones de nutrición y crecimiento mediante la secreción de enzimas (exoenzimas) que digieren la materia orgánica antes de ingerirla y que es almacenada en forma de glucógeno.

Las hifas presentan un crecimiento apical (Fig. 2), que se da casi exclusivamente por el extremo de ellas, donde los materiales nuevos de la pared son adicionados constantemente. Se ha observado que en la región subapical de una hifa en crecimiento hay una gran cantidad de mitocondrias y un flujo continuo de vesículas, por lo que se cree que el material necesario para la elongación del ápice de la hifa es enviado allí mediante el uso de dichas vesículas. Estas vesículas y otras estructuras celulares se agrupan y se concentran muy cerca de la punta del ápice, al que se denomina cuerpo apical (del alemán *Spitzenkörper*) (Fig.2c) (Alexopoulos, 1996; Moore-Landecker, 1990).

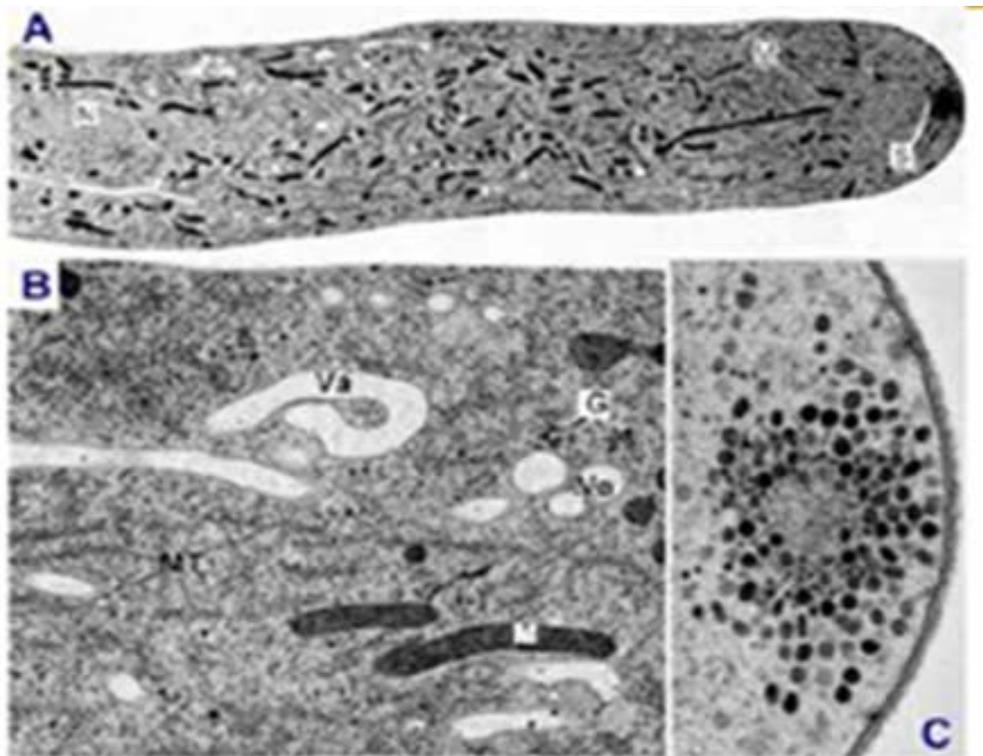


Figura 2: Crecimiento apical: Ultraestructura de la hifa. A- Región joven de una hifa. B- Parte de una región madura de la hifa. C- Acercamiento de *Spitzenkörper* (Deacon, 2006).

La mayoría de los mohos son aeróbicos pero se ha demostrado que algunos de ellos pueden desarrollarse a bajas tensiones de oxígeno (mohos microaerofilicos) como *Geotrichum candidum* y *Fusarium oxysporum*. Los cultivos de *Geotrichum candidum* en atmósferas pobres de oxígeno están acompañados con una elongación de la hifa y pérdida de ramificaciones laterales (Boutrou y Guéguen, 2005) y los que modifican su estructura morfológica (mohos dimórficos) como algunas especies de *Mucor* que en ausencia de oxígeno y altas concentraciones de dióxido de carbono sus esporangios germinan por brotación y adquieren una forma levaduriforme. Especies de *Rhizopus* también pueden crecer bajo condiciones anaeróbicas permaneciendo su forma micelial (Carlile *et.al.*, 2007).

I.1.2.2. Características generales de las levaduras.

Las levaduras presentan un crecimiento vegetativo que se producen en su mayoría a partir de la gemación o fisión binaria, y cuyas esporas sexuales no se forman en el interior de cuerpos fructíferos (Kurtzman y Fell, 1998). La mayor parte de las levaduras se consideran unicelulares, con un solo núcleo y una estructura de pared celular variable. Las células vegetativas pueden presentar morfologías muy variadas, oval, esférica, cilíndrica, entre otras y crecen de forma isodiamétrica. Muchas levaduras presentan reproducción sexual, formando ascas o basidios, estructuras donde tiene lugar la meiosis y que definen el estado perfecto (teleomórfico) de la levadura. Algunas especies se caracterizan por formar pseudohifas o incluso hifas verdaderas.

Pueden tener ciclos de vida muy complejos, además de ser muy variables en cuanto a sus capacidades fisiológicas. Las levaduras son microorganismos anaerobios facultativos, lo que quiere decir que aunque normalmente vivan en ambientes oxigenados en los que pueden realizar el metabolismo aeróbico también pueden vivir en ambientes pobres o carentes de oxígeno

La estructura de la pared celular de las levaduras (Fig.3 y 4) comprende polisacáridos (predominantemente β -glucanos que le confiere rigidez a la célula) y proteínas (principalmente mananoproteínas sobre la capa más externa para la

determinación de la porosidad), junto con algunos lípidos y fosfatos inorgánicos. Otro compuesto como quitina también está presente en mayores cantidades en las cicatrices de los brotes de las células madres.

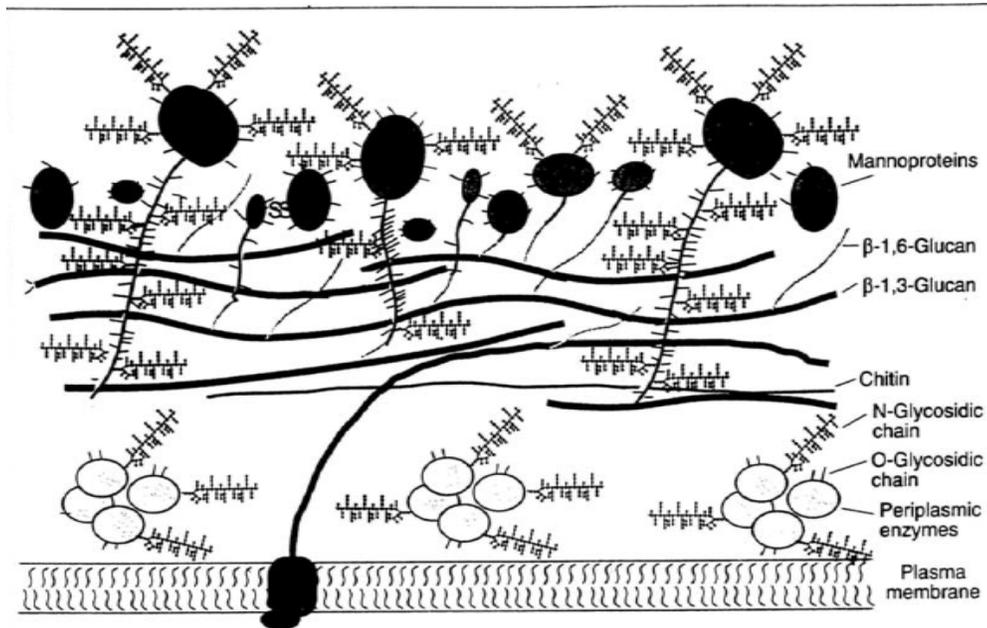


Figura 3: Estructura de la pared celular de una levadura (Walker, 1998)

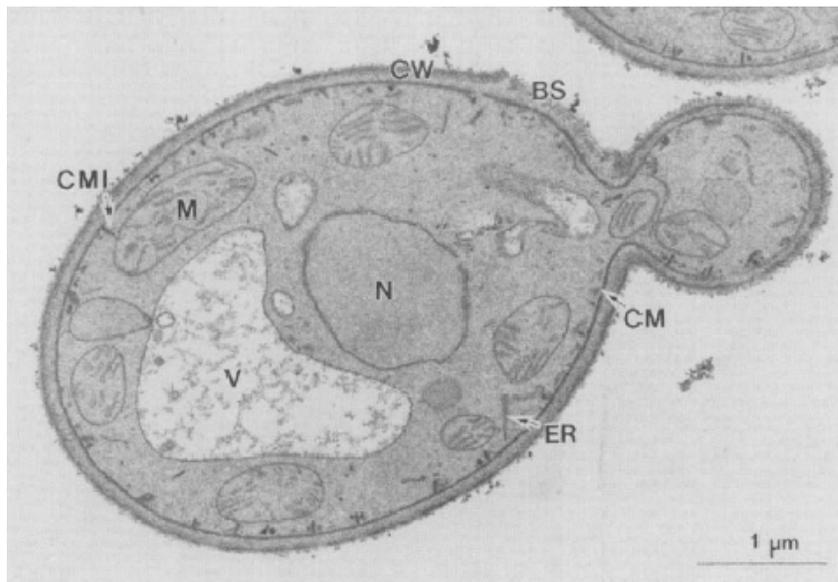


Figura 4: Micrografía electrónica de una célula de levadura típica en brotación.– CW: pared celular; CM: membrana celular; CMI: Invaginación de la membrana celular; BS: brote-cicatriz; M: mitocondrias; N: núcleo; V: vacuola; ER: retículo endoplasmático (Kanavagh, 2005)

I.1.3 Hongos dimorficos.

Se conocen como mohos dimorficos aquellos que pueden modificar su morfología de acuerdo a las condiciones del medio pasando de una estructura miceliar a levaduriforme. (Carlile *et.al.*, 2007; Jennings y Lysek, 1999, Kavanagh, 2005).

Los cambios en el hábito de crecimiento entre una levadura y el micelio están controlados por factores ambientales. Para algunos mohos es determinante la temperatura y/o nutrientes para desarrollar la forma levaduriforme y a otros ausencia de oxígeno y presencia de dióxido de carbono.

Existen otros aspectos del metabolismo celular que son alterados en los cambios entre las fases levaduriforme y miceliar. La correlación que existe entre el metabolismo fermentativo y la morfología levaduriforme, así como el metabolismo respiratorio y la morfología miceliar, es conocida, pero aún se mantienen algunos aspectos desconocidos (Carlile *et.al.*, 2007).

I.2 IMPORTANCIA DE LA CONTAMINACIÓN FÚNGICA EN LAS INDUSTRIAS ALIMENTICIAS.

Los hongos representan un creciente problema en nuestra sociedad actual como organismos contaminantes de alimentos, de las superficies interiores de las casas y como patógeno importantes para la salud humana (Brul y Klis, 1999). Son microorganismos ubicuos en el ambiente encontrándose en suelo, aire, agua, los alimentos y la materia en descomposición. Debido a esa naturaleza ubicua, se han identificado numerosos reservorios, como el aire no filtrado, los sistemas de ventilación, y en las industrias en diferentes zonas de elaboración y en las superficies de los equipos (Basilico *et.al.*, 2001). Las esporas fúngicas están muy bien adaptadas para ser diseminadas desde los reservorios previamente mencionados (Gots *et.al.*, 2003; Singh, 2005). Al ser transportadas por el aire y debido a su pequeño tamaño, pueden ser inhaladas e incluso, depositarse en las superficies mucosas por las vías respiratorias superiores y en los ojos como así también contaminar los alimentos (Singh, 2005; Carreras, 2006).

Los mohos y las levaduras comprenden grupos importantes de microorganismos cuyos efectos beneficiosos son bien conocidos y de gran utilidad en la industria de alimentos (Samson *et.al.*, 2000). Por ejemplo, algunas especies de *Rhizopus* y *Mucor* (Ray, 2004; Ludemann *et.al.*, 2009), se usan en la fermentación de quesos, alimentos orientales y carnes curadas; como modificadores o potenciadores del sabor; como productores de metabolitos aromáticos que posteriormente son usados como aditivos de zumos, vinos, licores, productos lácteos, caramelos, pan y galletas. Además, producen enzimas como lipasas, proteasas y carbohidrasas que son utilizadas para generar o extraer compuestos que influyen en el flavor del alimento (Girardin, 1997). Existen determinadas condiciones relacionadas con el proceso de conservación y manejo de los alimentos, que pueden favorecer el incremento de poblaciones alterantes de hongos (Basilico, 2005; Frisvad *et. al.*, 2007).

Los mohos pueden crecer sobre todo tipo de productos alimenticios como cereales y productos derivados, carne, leche, frutas, vegetales, frutos secos, grasas y sus derivados (Müller, 1981; Ray, 2004). Pueden comportarse como microorganismos oportunistas en la contaminación de alimentos con baja actividad de agua o bajos valores de pH, en un amplio intervalo de temperatura. Así mismo, se encuentran contaminando productos agrícolas que han sido secados de forma inadecuada y en productos alimenticios que tienen una larga vida de almacenamiento, en los cuales, la rápida contaminación bacteriana ya ha sido controlada (Jarvis *et.al.*, 1983; De Ruyter *et.al.*, 1993).

Los procesos industriales en los que se utiliza material biológico, proporcionan nutrientes y las condiciones adecuadas para el crecimiento de estos microorganismos (Maukonen *et.al.*, 2003). La contaminación de los productos alimenticios puede provenir de cuatro fuentes principales: los componentes de la materia prima, las superficies de la planta (paredes, pisos, techos) y de las maquinarias, las personas (y animales) y el ambiente (aire y suelo) (Holah, 1995; Duran y Marshall, 2002; Reij y Den Aantrekker, 2004; Basilico *et.al.*, 2001).

El crecimiento fúngico puede ocasionar diferentes tipos de alteración en los alimentos, entre ellos cabe destacar la pérdida de las características

organolépticas, la reducción del valor nutritivo, la putrefacción e incluso pueden presentar un riesgo potencial o real para la salud del consumidor, como consecuencia de la producción de micotoxinas (Jarvis *et.al.*, 1983). De hecho, hasta el descubrimiento de las micotoxinas, la alteración por mohos era considerada como un fenómeno relativamente benigno y los alimentos sólo se rechazaban por razones estéticas y por el olor característico a enmohecido, inaceptable por el consumidor. Muchos mohos tienen actividad proteolítica pero raramente producen olores pútridos, más asociados a la alteración bacteriana. Frecuentemente producen rancidez de los alimentos, como en quesos, debido a la hidrólisis de los ácidos grasos, que se producen de forma característica por algunos mohos del género *Penicillium* (Moss, 1999).

En cuanto a las levaduras, consideradas dentro del grupo de los hongos, han sido utilizadas durante siglos por el hombre por su interés comercial, en la producción de pan, vino, cerveza, sidra y otras bebidas alcohólicas. Este beneficio se obtiene gracias al crecimiento de las levaduras, que mediante la producción de alcoholes, ácidos, ésteres, aldehídos y gases, dan lugar al desarrollo de sabores y aromas característicos (Deák y Beuchat, 1996). Además, estas propiedades son a menudo específicas de la cepa, por lo que su uso en procesos de producción de alimentos fermentados es esencial para mantener la calidad y consistencia del producto (Deák, 1995; Tornay-Lehoczki y Dlačuchy, 2000). Es bien conocido el uso de las levaduras en la producción de otros alimentos fermentados como carnes, quesos, y en la producción de diferentes productos metabólicos, incluyendo enzimas, lípidos y vitaminas (Deák, 1991).

A pesar del enorme beneficio económico que se puede derivar del uso de las levaduras para la producción de alimentos y otros metabolitos, existe también un aspecto negativo debido a su potencial como alterantes de alimentos (Tabla 6). Este aspecto negativo no ha sido tan considerado como el beneficio que reportan en la industria alimentaria. Sigue siendo de interés las alteraciones producidas por las levaduras en alimentos y bebidas (Thomas, 1993). El uso de tecnologías modernas en el procesado de alimentos, la gran variedad de nuevas formulaciones de alimentos y bebidas, la tendencia a reducir el uso de

conservantes (especialmente aquellos que son efectivos frente a levaduras, como el dióxido de azufre y el ácido benzoico), y la aplicación de procesos menos severos, han provocado un aumento en la frecuencia de alteración por levaduras (Fleet, 1999; Loureiro y Querol, 1999).

Tabla 6: Alimentos específicos y levaduras alterantes asociadas (Guerola, 2006).

Producto (ejemplos)	Levaduras	Referencia
Frutas Uva, manzana, fresa, cereza, higo, frutas tropicales, naranjas	<i>Hanseniospora spp</i> , <i>Candida stellata</i> , <i>Issatchenkia orientalis</i> , <i>Pichia guilliermondii</i> , <i>P. membranaefaciens</i> , <i>P. fermentans</i>	Lachaise ,1977; Guerzoni y Marchetti, 1987; Spencer y col., 1992
Verduras Verduras frescas y procesadas, ensaladas	<i>Candida spp</i> , <i>Cryptococcus spp</i> , <i>Rhodotorula glutinis</i> , <i>Sporobolomyces roseus</i>	Parish y Carroll, 1985; Collins y Buick, 1989; Babic y col., 1992
Zumos de frutas y refrescos Zumos frescos y procesados, refrescos	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> , <i>Z. bailii</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Dekkera anomala</i> , <i>Candida spp</i> , <i>P. anomala</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i> , <i>Kloeckera apiculata</i> , <i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Sadler y col., 1992; Sand, 1974; Cole y col., 1987; Deák y Beuchat, 1993, 1994; Kisko et al., 2005
Bebidas alcohólicas Vino	<i>Dekkera spp</i> , <i>Saccharomycodes ludwigii</i> , <i>Candida vini</i> , <i>C. zeylanoides</i> , <i>C. rugosa</i> , <i>I. orientales</i> , <i>P. membranaefaciens</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>Z. bailii</i> , <i>P. guilliermondii</i> , <i>Z. bailii</i> , <i>Z. rouxii</i>	Goswell, 1986; Sancho y col., 1986; Chatonnet y col., 1992; Ibeas y col., 1996; Constantí y col., 1997; Stender y col., 2001; Dias y col., 2003a
Cerveza	<i>Saccharomyces spp.</i> , <i>Dekkera spp</i> , <i>P. fermentans</i> , <i>P. membranaefaciens</i> , <i>H. uvarum</i> , <i>D. hansenii</i> , <i>T. delbrueckii</i>	Lawrence, 1988; van der Aa Kuhle y Jespersen, 1998
Sidra	<i>P. membranaefaciens</i> , <i>H. uvarum</i> , <i>S. ludwigii</i> , <i>S. pombe</i>	Carr, 1984; Morrissey y col., 2004
Productos lácteos Leche, nata, mantequilla, yogurt, queso	<i>Candida spp</i> , <i>D. hansenii</i> , <i>P. anomala</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>R. glutinis</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>P. membranaefaciens</i> , <i>Y. lipolytica</i> , <i>Cryptococcus spp</i> , <i>S. roseus</i> , <i>Z. rouxii</i> , <i>Z. microellipsoides</i>	Green y Ibe, 1987; Brocklehurst y Lund, 1985; Fleet, 1990a; Caggia y col., 2001; Cappa y Cocconcelli, 2001

Producto (ejemplos)	Levaduras	Referencia
Cereales y productos de panadería Avena, trigo, maíz, pan	<i>Candida spp.</i> , <i>R. mucilaginosa</i> , <i>S. roseus</i> , <i>H. uvarum</i> , <i>Trichosporon spp.</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>T. delbrueckii</i> , <i>P. membranaefaciens</i>	Petters y col., 1988; Legan y Voysey, 1991
Alimentos con elevado contenido en azúcar o sal Mermelada, jarabe, concentrados, frutas confitadas, dulces	<i>Z. rouxii</i> , <i>Z. bisporus</i> , <i>T. delbruecki</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>D. hansenii</i> , <i>P. anomala</i> , <i>R. mucilaginosa</i> , <i>Candida spp</i>	Tilbury, 1980a; Tokouka y col., 1985; Jermini y col., 1987
Alimentos fermentados y conservados con ácidos orgánicos Col ácida, aceitunas, mayonesa, aliños, carne fermentada	<i>S. cerevisiae</i> , <i>P. anomala</i> , <i>Z. bailii</i> , <i>P. membranaefaciens</i> , <i>I. orientalis</i> , <i>D. hansenii</i> , <i>T. delbruecki</i>	Brocklehurst y Lund, 1984; Pitt y Hocking, 1988; Kurtzman, 1990; Marquina y col., 1992

La alteración de alimentos y bebidas es un concepto que, en algunos casos, no está bien definido. Esto ocurre fundamentalmente en alimentos fermentados, donde la actividad de la levadura es esencial durante el proceso y cuya producción de metabolitos contribuye al aroma y sabor del producto final. De hecho, por razones culturales, existe muy poca diferencia entre lo que se percibe como alteración o como actividad beneficiosa (Fleet, 1992). Una primera manifestación de la alteración producida por levaduras es la formación de biomasa en medios líquidos, detectada por la aparición de turbidez. Cuando la presencia de biomasa queda enmascarada por las características propias del alimento, la alteración puede detectarse por los productos del metabolismo microbiano, entre éstos cabe destacar la formación de CO₂, que distorsiona la forma de los envases y/o los propios alimentos, así como la aparición de diversos olores y sabores de fondo provocados por la formación de alcoholes, ácidos orgánicos y ésteres (Fleet, 1992; Samson *et.al.*, 2010).

Aunque la alteración por levaduras no produce un deterioro significativo de las propiedades nutricionales del alimento, a menudo el consumidor percibe estos cambios.

Teniendo esto en cuenta, el concepto de alteración depende enteramente de las objeciones del consumidor y se podría definir como “el crecimiento de levaduras en el alimento, suficiente como para causar alteración en ese alimento, perceptible por el consumidor, y que produce insatisfacción, queja o rechazo del alimento por parte de éste” (Stratford, 2005).

Aunque no se dispone de datos precisos, se estima que más del 25% de todos los alimentos producidos en el mundo se pierden debido a la acción alterativa de éstos microorganismos. Este hecho conlleva graves implicancias económicas para el sector, ya que las mermas que ocasiona el deterioro de materias primas y productos elaborados obliga a decomisar y, en ocasiones, a retirar del mercado grandes partidas de productos. Las industrias que se ven mayoritariamente afectadas por problemas de alteración son las que producen y comercializan alimentos altamente perecederos y requieren de condiciones especiales de mantenimiento.

I.2.1 Estrategias para prevenir la contaminación fúngica.

La contaminación causada por hongos es conocida desde hace mucho tiempo en la industria alimenticia y ha asumido una considerable importancia económica durante los últimos años por varias razones en los que se destaca:

- Requerimientos de la producción que llevan a un aumento en las cantidades de productos y que se almacenan en locales en condiciones inadecuadas.
- Introducción de productos con un alto riesgo de contaminación.
- Aparición en aumento de microorganismos resistentes a ciertos desinfectantes entre otras cosas.

La batalla contra tales problemas se hace muy difícil por la diversidad de las fuentes de contaminación y por el doble papel que algunos hongos poseen (como flora deseable en ciertos productos o contaminantes indeseables en otros).

Los alimentos son un medio favorable para el crecimiento de los microorganismos provocando su deterioro. Precisamente para proteger y evitar su deterioro se aplican biocidas que son compuestos que atacan de forma específica

mediante interacciones químicas, moléculas esenciales para el metabolismo bacteriano y de otros seres vivos.

Se conocen distintas metodologías para inhibir el desarrollo fúngico (fungistáticos) o para producir su muerte (fungicidas), pudiéndose utilizar tratamientos químicos (oxidantes tales como: cloro y compuestos clorados, ozono, peróxido de hidrógeno, ácido peracético; compuestos de amonio cuaternario; álcalis; ácidos orgánicos; alcoholes; antibióticos; polifosfatos y cationes) y tratamientos físicos (luz ultravioleta; calor; altas presiones); o la combinación de más de uno de estos tratamientos. Un mismo tratamiento puede actuar como fungistático o fungicida dependiendo de las dosis y tiempo de aplicación así como de las características inherentes a la especie fúngica (Manivannann, 2008; Russell, *et. al.*, 1992; Block, 2001).

Para evitar la contaminación se puede partir de una materia prima de buena calidad, limpiar y desinfectar el equipamiento que entrará en contacto con el alimento y asegurar una buena higiene del ambiente y del personal (Kiermeier *et.al.*, 2000; Vicent, 2002). De esta forma se podrá controlar y eliminar el crecimiento de microorganismos indeseables en las industrias alimenticias de forma que no afecte la salud del hombre ni altere los alimentos (DOUE, 2005).

I.3 AGENTES ANTIMICROBIANOS: Biocidas

La actividad de un biocida persigue destruir, contrarrestar, neutralizar e impedir la acción microbiana o ejercer el control de cualquier especie de organismo nocivo para el fin deseado, por medios físicos, químicos o biológicos. En la tabla 7 se observa la clasificación de los biocidas según el grupo químico al cual pertenecen.

Tabla 7: Clases de biocidas según el grupo químico (Guía institucional para uso de antisépticos y desinfectantes, 2005).

Grupo químico	Clase
•Alcoholes	Etanol
	Isopropanol
•Aldehídos	Glutaraldehído
	Formaldehído
•Anilidas	Triclocarbán
•Biguanidas	Clorhexidina
	Alexidina
	Biguanidas poliméricas
•Bisfenoles	Triclosán
	Hexaclorofeno
•Diamidinas	Propamida
	Dibromopropamida
•Fenoles	Fenol
	Cresoles
•Halofenoles	Cloroxilenol
	(PCMX)
•Agentes liberadores de halógenos	Compuestos de cloro
	Compuestos de yodo
•Metales pesados	Compuestos de plata
	Compuestos de mercurio
	Compuestos de cobre
	Compuestos de zinc
	Peróxido de hidrógeno
•Peroxígenos (oxidantes)	Ácido paracético
	Permanganato de potasio
	Ozono
•Compuestos de amonio cuaternario	Cloruro de benzalconio
	Cetrimida
•Colorantes	Acridinas
	Trifenilmetanos

Las sustancias biocidas interactúan en diferentes estructuras o receptores de los microorganismos, por lo que es menor el riesgo de aparición de resistencia

hacia los productos de desinfección que frente a los antibióticos, a pesar de ello es posible que se produzcan estas resistencias (Gillet, 2002). Las capas más externas de las células microbianas pueden tener un efecto significativo en la susceptibilidad o resistencia a los biocidas. La naturaleza y composición de la superficie varía de un tipo de célula a otra, en el caso de los hongos su pared celular tiene compuestos como mananos, quitina, y α y β glucanos, exclusivos del reino fúngico. El mecanismo de acción de los agentes antimicrobianos frente a los diferentes tipos de microorganismo todavía no está totalmente clarificado (McDonnell y Russell, 1999; Ghannoum y Rice, 1999). A pesar de ello, sea cual fuera el tipo de microorganismo, es posible que haya una secuencia común de acciones basadas en la interacción del biocida con la superficie celular, su posterior paso a la célula y su actuación frente al receptor específico (McDonnell y Russell, 1999).

Aunque como premisa inicial se podría pensar que el mecanismo de resistencia a los biocidas puede ser comparable entre bacterias y hongos y que sería factible desarrollar una teoría para ambos reinos, realmente esta comparación se ve limitada por diversos factores, entre los que se pueden destacar los siguientes aspectos (Ghannoum y Rice, 1999)

1°) Las diferencias estructurales que existen entre los hongos y las bacterias como por ejemplo la naturaleza diploide de muchos hongos y su mayor tiempo de generación en comparación a las bacterias. Además los compuestos antifúngicos y antibacterianos disponen de estructuras específicas de acción sobre el receptor, con funciones relevantes sobre cada tipo de microorganismo, por ejemplo muchos compuestos antimicrobianos actúan inhibiendo la formación de determinados peptidoglicanos, que son el componente esencial de la pared celular de las bacterias, mientras muchos componentes antifúngicos ejercen acción frente al receptor específico de la formación o funcionalidad del ergosterol, que es un componente importante de la pared celular de los hongos. No obstante hay un cierto paralelismo en el mecanismo por el cual desarrollan la resistencia a estos compuestos.

2°) La segunda limitación se debe a que diferentes mecanismos de resistencia determinados en bacterias no se han identificado en hongos. Existen evidencias que tanto las alteraciones del receptor específico así como el reducido acceso a ellos (algunas de ellas en combinación), son mecanismos importantes de resistencia a los antifúngicos.

3°) Por último, el conocimiento general sobre procesos de intercambio genético en bacterias está mucho más avanzado que el conocimiento de estos mecanismo en hongos.

I.3.1 Mecanismos generales de acción antifúngica.

En comparación con las bacterias existen muy pocos datos acerca de los mecanismos por los que los biocidas destruyen a los hongos. Las potenciales dianas de acción en el caso de los hongos son los ribosomas, ácidos nucleicos y proteínas estructurales y funcionales (enzimas). Es difícil establecer el rol de los ribosomas, proteínas estructurales, RNA y DNA como blancos o dianas para el ataque de los fungicidas debido a que hay muy pocos trabajos realizados sobre su acción. Sin embargo, algunas investigaciones se han realizado sobre los efectos antifúngicos sobre sistemas de enzimas específicas, de las cuales algunas están asociadas con la membrana plasmática. Hugo y Russell (1981) señaló que es difícil prever una situación en que la inhibición y/o muerte celular pueda ser explicada por la inhibición de la enzima específica a no ser que esta reacción sea esencial para el metabolismo de la célula. De modo que la inhibición de la enzima específica puede ser considerada como una de las muchas reacciones de inhibición pero no constituye la principal acción de un agente antifúngico.

El dióxido de azufre interactúa con los puentes disulfuros de las proteínas, por ej. la sulfitolisis es responsable de la ruptura del enlace disulfuro en cistina produciendo cisteína y sulfonato de cisteína. La interacción del dióxido de azufre con los ácidos nucleicos provoca efectos mutagénicos en las levaduras (Hammond y Carr, 1976; McDonnell y Russell, 1999).

Existen pocos estudios sobre hongos filamentosos, conociéndose que son considerablemente más resistentes a la acción de los biocidas que las levaduras,

incluso más que las bacterias vegetativas pero menos que las esporas bacterianas. Podría especularse que la composición de la pared celular de los hongos les otorga un mecanismo de resistencia intrínseco (McDonnell y Russell, 1999).

En la Tabla 8 se proponen algunos mecanismos de acción de distintos compuestos con actividad antifúngica.

Tabla 8: Mecanismo propuesto de actividad antifúngica (Russell *et.al.*, 1992).

Compuestos antifúngicos	Sitio(s) y mecanismo(s) de acción
Clorhexidina	Membrana plasmática: disgregación, lisis del protoplasma.
Compuestos de amonio cuaternario	Membrana plasmática: disgregación, lisis del protoplasma.
Ácidos orgánicos	Inhibidor del transporte activo
Alcoholes	Membrana plasmática: disgregación
Metales pesados	Unión a los principales grupos funcionales (ej.-SH de enzimas asociadas a la membrana).

I.3.2 Derivados de metales pesados.

Durante muchos años, los metales pesados (mercurio, plata, cobre y zinc) se han utilizado como bactericidas, si bien algunos sólo tienen efecto bacteriostático, hoy en día se está tratando de utilizar nuevos biocidas con menor acción tóxica (Guía institucional para uso de antisépticos y desinfectante, 2005)

Los principales derivados son: las sales de mercurio como timerosal y merbromin; las sales de plata: nitrato de plata, sulfadiazina de plata; los compuestos de cobre y los compuestos de zinc. El mecanismo de acción de estos compuestos consiste en precipitar las proteínas e inhibir los grupos sulfhidrilos de las células en términos generales. También, se ha observado que los metales

pesados reaccionan con las proteínas atacando a los grupos tioles y de esta forma inactivan las mismas (Liau *et. al.*, 1997; Feng *et.al.*, 2000).

Los antimicrobianos como: plata (Ag), cobre (Cu) y zinc (Zn) han encontrado su lugar en una serie de aplicaciones.

I.3.2.1 Compuestos de Plata.

La plata se ha utilizado como un agente antimicrobiano durante miles de años. Durante los últimos decenios, se ha introducido en numerosos nuevos tratamientos donde se incluyen el uso de plata coloidal o adsorbida en un transportador coloidal. Están permitidos para tratamientos de aguas potables (Castellano *et.al.*, 2007) y bebidas en algunos países y tienen aplicaciones en farmacología, medicina, industria alimentaria, suplementos dietéticos, y para producir recubrimientos antimicrobianos en productos, etc. (Petica *et al.*, 2008). Sin embargo no se conocen estudios en profundidad sobre sus aspectos toxicológicos (Davies y Etris, 1997).

La plata se usa a menudo como un desinfectante alternativo en aplicaciones en las que el uso de desinfectantes tradicionales tales como el cloro puede resultar en la formación de subproductos tóxicos o causar corrosión de las superficies. Se ha demostrado que la plata puede producir un efecto sinérgico en combinación con varios otros desinfectantes. Si bien, muchos mecanismos de la acción antibacteriana de la plata se han descrito, pero sus mecanismos antivirales, antiprotozoarios y antifúngicos no se conocen bien con exactitud.

Sin embargo, se necesita de mayores investigaciones para determinar la eficacia de la plata como antimicrobiano en nuevas aplicaciones y los efectos de su uso a largo plazo.

Tanto la tolerancia microbiana y la resistencia a la plata han sido reportados; no obstante, el efecto de la plata ha sido estudiada frente a una amplia variedad de microorganismos durante varios años.

- Mecanismo de acción de la Plata.

Los iones de plata tienen el mayor nivel de actividad antimicrobiana de todos los metales pesados. (Feng *et. al.*, 2000; Kawahara *et. al.*, 2000; Klueh *et. al.*, 2000).

El mecanismo de acción de la plata frente a los microorganismos aún no se conoce con exactitud, pero se sugiere posibles mecanismos de acción de la plata metálica o iones plata de acuerdo a los cambios en la morfología y estructura de las células bacterianas (Mahendra *et.al.*, 2009; Cho *et. al.*, 2005).

Se ha observado que la acción de la plata está vinculada con las interacciones de los grupos tioles que se encuentran en la enzima respiratoria de las células bacterianas. La plata se une a la pared de la célula y membrana celular e inhibe los procesos respiratorios (Klasen, 2000). Es posible que el ADN de bacterias tratadas con plata pierdan su capacidad de réplica, por la afinidad de la plata a interaccionar con grupos fosforilados y azufrados (Pal *et.al.*, 2007; Bhabra *et al.*, 2009). En el caso de *Escherichia coli*, la plata actúa inhibiendo la absorción del fosfato inorgánico y liberando fosfato acumulado en la célula como también manitol, succinato, prolina y glutamina (Rosenkranz y Carr, 1972; Bragg y Rainnie, 1974; Schreurs y Rosenberg, 1982; Haefili *et. al.*, 1984; Yamanaka *et.al.*, 2005).

En otros trabajos se ha observado que los iones de plata producen una región de bajo peso molecular en el centro de la bacteria. Este efecto se debe a que el microorganismo agrupa y protege su DNA como mecanismo de defensa contra compuestos tóxicos (Morones *et.al.*, 2005).

Kawara *et.al.* (2000) demostró que las especies gram-negativas son más sensibles a la acción de la plata ya que la misma se une a la carga negativa de los peptidoglicanos de la pared celular bacteriana a diferencia de las especies gram-positivas que presentan una capa más gruesa de peptidoglicano, impidiendo su entrada en la célula. Son especialmente activos frente a *Staphylococcus* y *Pseudomonas*. Además, se ha observado en algunos casos una buena actividad fungicida y virucida (Wright *et.al.* 1999; Bowler *et.al.* 2004).

También se ha demostrado que el material en suspensión, proteínas, cloruros e iones calcio reducen la efectividad de la plata, y se ha sugerido que su acción

sería más efectiva sobre bacterias que sobre levaduras y mohos (Block, 2001; Yoshinobu *et al.*, 2003).

I.3.2.2 Compuestos de Cobre.

Desde la antigüedad, el cobre se ha usado en la fabricación de recipientes y en la desinfección natural del agua para prevenir la propagación de enfermedades. Posteriormente, los científicos han tratado de aprovechar estas propiedades antimicrobianas para su empleo en industrias de alimentos, como conservantes, medicinas, productos de higiene oral, antisépticos, instrumentos médicos, textiles, etc.

Durante muchos años se han estudiado los mecanismos químico-moleculares responsables de los procesos antimicrobianos del cobre, encontrándose que niveles elevados de cobre dentro de la célula producen estrés oxidativo y generación de peróxido de hidrógeno. Bajo estas condiciones, el cobre participa en la llamada reacción química Fenton, que causa daño oxidante a la célula. Por otro lado, el exceso de cobre reduce la integridad de la membrana de los microorganismos produciendo fuga de nutrientes esenciales como el potasio y glutamato, inhibiendo su crecimiento.

Así como el cobre es necesario para muchas funciones de las proteínas, en una situación de exceso, se liga a las proteínas que no lo requieren para su funcionamiento, lo que lleva a una pérdida de funciones proteicas y/o a un colapso de éstas en proporciones disfuncionales (León *et.al.*, 2011).

Las sales de cobre se han utilizado como biocidas durante mucho tiempo, entre ellos cabe destacar el uso de Caldo Bordeaux uno de los primeros fungicidas aplicados que aún se sigue utilizando para el control de ciertas enfermedades fúngicas en cultivos. Este caldo es una mezcla de sales de sulfato de cobre e hidróxido de calcio. Cuando se pulveriza sobre las plantas los compuestos de cobre solubles son liberados lentamente. Estos penetran las esporas fúngicas, y se unen a los grupos aminos, carboxilos y tioles en las proteínas, inhibiendo la acción de las enzimas (Carlile *et.al.*, 2001).

En la tabla 9 se observa la efectividad de la plata y del cobre frente a diversos microorganismos estudiados.

Tabla 9: Efectividad de la plata y cobre frente a los microorganismos estudiados (Silvestry-Rodríguez *et.al*, 2007)

Organismos	Tratamientos	Referencias
<i>Hartmannella vermiformis</i> <i>Tetrahymena pyriformis</i> <i>Naegleria fowleri</i>	100 ppb Ag+1.0 ppb Cu o 500 ppb Ag+5.0 ppb Cu 400 ppb Cu+40 ppb Ag o 800 ppn Cu+80 ppb Ag o combinado con 1.0 ppb de cloro libre	Rohr <i>et.al.</i> , 2000 Castells <i>et.al.</i> , 1995
Hiv-1 (AIDS)	1.0, 5.0,10.0 y 20.0 ppm de Ag ₄ O ₄	Antelman, 1992
HIV-1103	Complejo de tiosulfato de Ag en microesferas de silicagel	Davies and Etris, 1997
Poliovirus (tipo 1)	400 ppb Cu+40 ppb Ag o una combinación con cloro libre de 0.2 y 0.3 ppm	Yahya <i>et. al.</i> , 1992
Bacteriófago MS-2	400 ppb Cu+40 ppb Ag o una combinación con cloro libre de 0.2 y 0.3 ppm	Yahya <i>et. al.</i> , 1992 Thurman and Gerba, 1989
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Concentración mínima inhibitoria de 1.25 ppm de Ag ₄ O ₄	Antelman, 1992
<i>Candida albicans</i>	Concentración mínima inhibitoria de 2.5-5.0 ppm de Ag ₄ O ₄	Antelman, 1992
<i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	AgBC a una concentración entre 0.05 a 0.20 mg/mL	Bellantone <i>et.al.</i> , 2002
<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	AgNO ₃	Feng <i>et.al.</i> , 2000
<i>Escherichia coli</i>	Recubrimiento de cerámicos con Ag y Cu a una concentración de 0.05 ppm de Ag y 0.05 ppm de Cu	Kim <i>et.al.</i> , 2004

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Micrococcus lutena</i> <i>Staphylococcus agalactiae</i>	Concentración mínima inhibitoria de Ag ₄ O ₄ de 1.25- 2.5 ppm	Antelman, 1992
<i>Escherichia coli</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Staphylococcus pyogenes</i>	Concentración mínima inhibitoria de Ag ₄ O ₄ de 2.5 ppm	Antelman, 1992
<i>Bacillus subtilis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus faecium</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Concentración mínima inhibitoria de Ag ₄ O ₄ de 0.625 ppm	Antelman, 1992
<i>Escherichia coli</i>	Ag-Zeolita	Inoue <i>et.al.</i> 2002
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) <i>Staphylococcus</i> <i>aureus (no-MRSA)</i>	Ag/Zn zeolita	Takai <i>et. al.</i> , 2002
<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Legionella pneumophila</i>	2.5% Ag/14% Zn (p/p) zeolita	Bright <i>et.al.</i> , 2002; Rusin <i>et.al.</i> ; 2003
<i>Streptococcus mutans</i> <i>Streptococcus mitis</i> <i>Streptococcus salivarius</i> <i>Streptococcus sanguis</i>	Ag-Zn zeolite y SiO ₂ rango de concentración 5/55, 10/50, 20/40 y 30/30 % peso.	Hotta <i>et.al.</i> , 1998
<i>Vibrio cholerae</i>	1.0 y 2.0 ppm de Ag ₄ O ₄ ; baja concentración Ag ⁺	Antelman 1992; Dibrov <i>et.al.</i> , 2002
<i>Legionella pneumophila</i>	Tratada con Ag + Cu	Davies and Etris, 1997

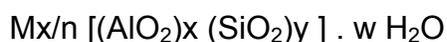
I.4 MATERIALES PARA LA DOSIFICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS BIOACTIVAS.

La efectividad antimicrobiana de materiales conteniendo Ag depende de muchos factores como el tamaño y morfología de las partículas, la durabilidad mecánica y química de dichos materiales y su capacidad de ir liberando la Ag. Generalmente a menor tamaño de partícula, mayor efectividad antimicrobiana, por lo cual se han desarrollado varios métodos para obtener nanopartículas, como microemulsión, reducción sonoquímica y síntesis fotoquímica (Lu *et.al.*, 2009). Sin embargo, las nanopartículas tienden a formar grandes partículas que llevan al deterioro de sus propiedades antimicrobianas, sumado a la dificultad del reciclado y reuso. Estos motivos impulsaron la inmovilización de nanopartículas en materiales sólidos como una vía potencial de solucionar estos problemas. Por esta razón, se han reportado muchas alternativas de inmovilización de nanopartículas de Ag en materiales inorgánicos como óxido de titanio (Cheng *et.al.*, 2006), sílice (Kawashita *et.al.*, 2000), diversos materiales cerámicos (Oyanedel-Craver, 2008), fosfatos de titanio y de circonio (Wang *et.al.*, 2006). Las nanopartículas pueden ser iones y éstos pueden ser cargados en materiales inorgánicos, principalmente en matrices de naturaleza cerámica mediante intercambio iónico. Entre los materiales empleados como vehículos para liberar iones se pueden mencionar las arcillas (Ohashi *et.al.*, 1998), aluminosilicatos (Li *et.al.*, 2002) y zeolitas (Rivera-Garza *et.al.*, 2000) en particular. Estos materiales tienen elevada capacidad de intercambio, elevada superficie específica e inerticidad química, con baja o nula toxicidad. También se han incorporado con nanopartículas materiales orgánicos como polímeros (Ignatova *et.al.*, 2006) y materiales inorgánicos–orgánicos como complejos de metal-polímero (Soykan *et.al.*, 2007). Una familia relativamente nueva de este tipo de materiales son las denominadas redes organometálicas (MOFs). Estos materiales, en virtud de sus propiedades porosas y naturaleza química híbrida pueden convertirse en promisorios para la dispersión de nanopartículas e iones con propiedades biológicas. Recientemente se han reportado algunos MOF basados en Ag (Berchel *et.al.*, 2011) y en Co (Zhuang *et.al.*, 2012) con buena acción bactericida.

I.4.1 Zeolitas

Las zeolitas fueron descubiertas en el siglo XVIII cuando el mineralogista Cronstedt observó que calentado trozos de un cierto tipo de material natural de origen volcánico, estos comenzaban a moverse a medida que se evaporaba agua, por lo que los denominó zeolitas, palabra de origen griego que significa piedra que hierve (PQ Corporation's Zeolites and Catalysts Division, 1996). Debido a la complejas propiedades físicas de estos materiales, los mismos se han definido como aluminosilicatos con estructuras tridimensionales que encierran cavidades ocupadas por iones y moléculas de agua, los cuales poseen un considerable movimiento libre que permite intercambio iónico e hidratación reversible (Rabo, 1976). Las zeolitas son materiales cristalinos microporosos que consisten en unidades tetraédricas de $[\text{AlO}_4]^{5-}$ y $[\text{SiO}_4]^{4-}$ en la que los átomos de Si y Al se unen entre sí por átomos de oxígeno formando una red tridimensional (Breck, 1974). Esta combinación provoca una densidad de carga negativa en la estructura debido a que el aluminio se encuentra en un estado de oxidación (+3). La carga negativa es neutralizada por cationes de compensación, como metales alcalinos, alcalinos térreos, etc. Estos cationes junto con las moléculas de agua, se encuentran ocupando el espacio intracristalino de estos aluminosilicatos ya sea adsorbidas o en forma de hidroxilos en la superficie de los cristales o en los defectos de la estructura.

La fórmula general de las zeolitas se expresa de la siguiente forma:



Dónde: M es un catión intercambiable de valencia n, w es el número de moléculas de agua, y/x es la relación Si/Al.

La cantidad de Al en la estructura puede variar en un amplio rango, con una relación de Si/Al = 1 a ∞ , y la composición de la matriz depende de las condiciones de síntesis. A medida que la relación Si/Al aumenta en la matriz, aumenta la estabilidad hidrotérmica y la hidrofobicidad. (Auerbach *et. al.*, 2003).

I.4.1.1 Estructura de las Zeolitas

La única característica de las zeolitas que puede ser precisamente especificada es la topología de la red. Todas las otras características, como la distribución de átomos en sitios cristalográficos equivalentes, son complejas e inciertas. Para la descripción de dicha topología (Fig. 5), se reduce la representación de los átomos de la zeolita a esquemas simples de tal forma que la red queda representada por un esquema tridimensional en el que los vértices representan los átomos T, mientras que las líneas (unión de dichos vértices) representan los átomos de oxígeno que los unen (Rabo, 1976).

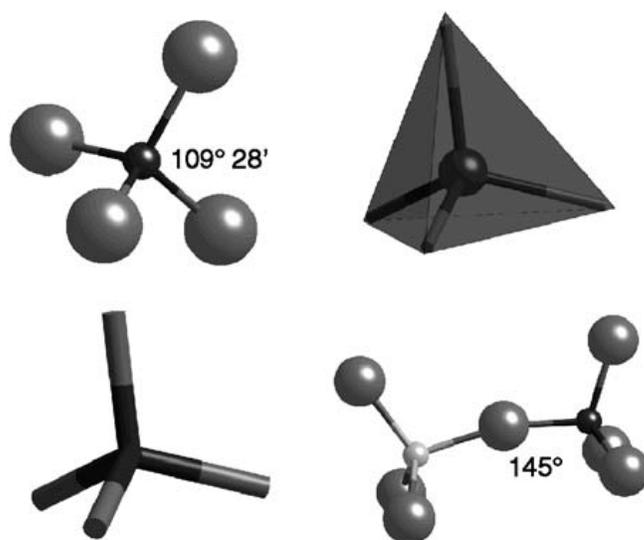


Figura 5: Estructuras de representación de la unidad básica de las zeolitas (Auerbach *et al.*, 2003).

Estos tetraedros de SiO_4 y AlO_4^- se unen entre sí para formar unidades secundarias que conducen a cavidades y canales, con un tamaño que depende de la forma en que se organicen. Los sistemas de canales pueden ser unidimensionales, bidimensionales o tridimensionales, según las direcciones espaciales en las que se ordenen las unidades secundarias. Las cavidades y los canales permiten alojar cationes de compensación, agua y otras moléculas o sales. Este tipo de estructura microscópica hace que las zeolitas presenten una superficie interna extremadamente grande, entre 500 y 1000 m^2/g , con relación a

su superficie externa. La microporosidad de estos sólidos es abierta y la estructura permite la transferencia de materia entre el espacio intracrystalino y el medio que lo rodea. Esta transferencia está limitada por el diámetro de los poros de la zeolita, ya que sólo podrán ingresar o salir del espacio intracrystalino aquellas moléculas cuyas dimensiones sean inferiores a un cierto valor, el cual varía de una zeolita a otra.

Hasta la actualidad son conocidas alrededor de 161 estructuras diferentes de zeolitas (<http://www.iza.structure.org/database>), de las cuales las más utilizadas en investigación y a nivel industrial son las estructuras MFI, Mordenita, LTA y Faujasita (X e Y). Cada tipo de zeolita tiene asignado un código de tres letras teniendo en cuenta lo establecido por la Comisión de Nomenclatura de zeolitas de la IUPAC (1978). Los diferentes tipos de zeolitas difieren en el diámetro y forma de poros y la manera en que estos están interconectados. En la Figura 6 se resumen las características de las estructuras zeolíticas más conocidas. Teniendo en cuenta los diámetros de poro de los diferentes tipos de estructura (Auerbach *et. al.*, 2003).

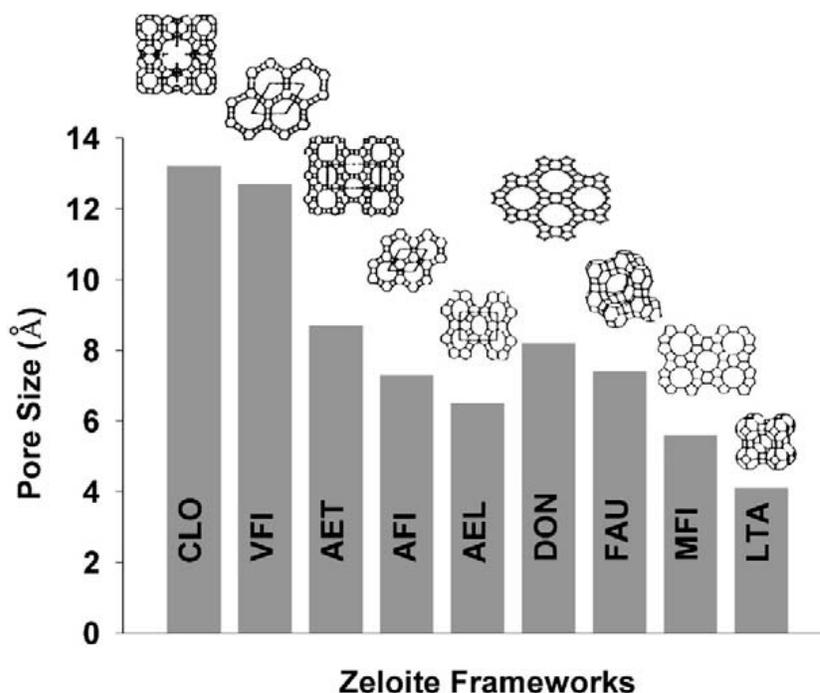


Figura 6: Comparación de los tamaños de poro de diferentes estructuras de zeolitas (Auerbach *et. al.*, 2003).

I.4.1.2 Propiedades de las zeolitas

Las propiedades más importantes que poseen las zeolitas desde el punto de vista de su aplicación son: por un lado su capacidad de adsorción, dependiente de la afinidad electrostática por moléculas polares o no polares y por otro lado las cavidades de orden molecular que poseen, le permiten comportarse como tamices pudiéndose lograr separaciones de alta eficiencia a nivel molecular. También, debido a la relativa libertad con que pueden moverse los cationes dentro de la estructura, se las usa como intercambiadores iónicos. La preferencia por determinados cationes dependerá del tamaño de los mismos, compatibles con la estructura de cada zeolita como así también de las características de adsorción. Las particularidades anteriores han llevado a que las zeolitas sean extensivamente empleadas principalmente en tres grandes aplicaciones: adsorbentes, catalizadores y materiales para intercambio iónico (Auerbach *et. al.*; 2003). En lo que respecta a esta última, el mayor uso se da en la industria de detergentes y como sustituto de fosfatos, ya que la selectividad de la zeolita A por Ca^{2+} provee ventajas únicas. Además las zeolitas naturales encuentran un uso considerable en la remoción de radioisótopos de Cs^+ and Sr^{2+} a través de intercambio iónico. Más recientemente, han proliferado otros tipos de aplicaciones relacionadas con la capacidad de intercambio iónico, como ser su empleo como agente antibacteriano.

I.4.1.3 Mordenita

En particular, la zeolita mordenita es un material microporoso que posee la estructura topológica denominada MOR y su fórmula química es $[\text{Na}^+_8 \text{H}_2\text{O}_{24}] [\text{Al}_8\text{Si}_{40}\text{O}_{96}]$ (Fig 7 a.). La estructura es ortorómbica con los parámetros: $a = 18,1$, $b = 20,5$; $c = 7,5 \text{ \AA}$; $\alpha = 90,0$; $\beta = 90,0$; $\gamma = 90,0^\circ$ (Auerbach *et. al.*, 2003). El sistema de canales efectivo de esta zeolita es 1-dimensional y lineal, constituido por anillos elípticos de 12 miembros con apertura de $7 \times 6,5 \text{ \AA}^\circ$ (Fig. 7b). Estos anillos se encuentran interconectados a otro sistema más cerrado de 8 miembros ($3,4 \times 4,8 \text{ \AA}^\circ$), que corren en la misma dirección (Fig. 7c).

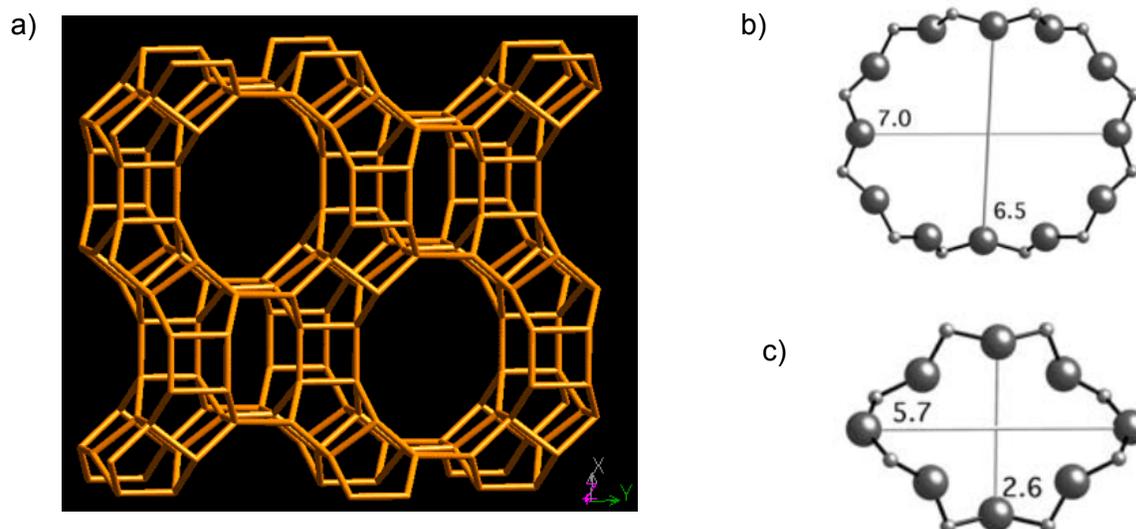


Figura 7: a) Estructura tridimensional de canales de mordenita, vista en la dirección [001]; b) Anillo principal de 12 miembros visto en la dirección [001]; c) Anillo de 8 miembros que limitan los anillos de 12 miembros, visto en la dirección [001] (Auerbach *et. al.*, 2003).

I.4.1.4 Estado del arte sobre metal-zeolitas aplicadas como antimicrobianos.

Específicamente en cuanto a estudios de aplicación de materiales microporosos inorgánicos como vehículos de iones metálicos con finalidades principalmente antibacterianas, se han estudiado algunas zeolitas conteniendo Ag, Cu o Zn. Gran parte de dichos estudios se refieren a ensayos con una bacteria indicadora como es *Escherichia coli*. Por otra parte, existe mucho menos literatura en torno al empleo de Ag-zeolitas contra hongos, pudiéndose citar los estudios de Ishitani *et.al.* (1995) y Ferreira *et.al.* (2012) contra *Saccharomyces. cerevisiae* empleando Zeomic® y Ag-zeolita Y, respectivamente. Nikawa (1997) y Ferreira *et.al.* (2012) estudiaron *Candida albicans* empleando Zeomic® y Ag-zeolita Y. También se estudió Ag-montmorillonita contra *Pycnopus cinnabarinus* y *Pleurotus ostreatus* (Malachová *et.al.*, 2011) y se han reportado estudios de metal-zeolita contra *Aspergillus niger* (Yamamoto *et.al.*, 1991).

A continuación se presenta un resumen de los antecedentes de metal-zeolitas aplicadas para el control del desarrollo de diversos microorganismos.

Tabla 10: Resumen de literatura sobre el empleo de metal-zeolitas en aplicaciones antimicrobianas.

Tipo de Metal-zeolita	Microorganismos ensayados	Cita
Ag-zeolita X	<i>Escherichia coli</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i>	Kwakye-Awuah, 2007
Ag, Cu o Zn-montmorillonita	<i>Escherichia coli</i> ; <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> y <i>Pleurotus ostreatus</i>	Malachová 2011
Ag-mordenita, Ag-ZSM5.	<i>Staphylococcus aureus</i>	Lalueza, 2011
Zeomic® (Ag 2,5%-Zeolita A)	<i>Escherichia coli</i>	Matsumura, 2003
Cu, Ag-clinoptilolite	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Hrenovic, 2013
Ag-zeolita	<i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> ; <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Candida albicans</i>	Ferreira, 2012
Ag- zeolita	<i>Escherichia coli</i>	Inoue, 2002
Ag-zeolita	<i>Escherichia coli</i> , <i>Vibrio harveyi</i> , <i>Vibrio cholerae</i> y <i>Vibrio</i> <i>parahaemolyticus</i>	Krishnani, 2012
Ag-zeolita (Zeomic®)	<i>Candida albicans</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	Matsuura, 1997
Cu-montmorillonita	<i>Escherichia coli</i>	Hu, 2006
Ag-zeolita	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Shigella flexneri</i> y <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	Flores-López, 2012
Ag, Zn, Cu-clinoptilolita	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Escherichia coli</i>	Top 2004
Cu-vermiculita	<i>Staphylococcus aureus</i>	Drelich 2011
Ag-ETS-10	<i>Escherichia coli</i>	Lv, 2009
Zeolita A sin metal	<i>Acinetobacter junii</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hrenovic, 2012
Ag-clinoptilolita-heulandita	<i>Escherichia coli</i> , <i>Streptococcus faecalis</i>	Rivera-Garza, 2000
Ag-clinoptilolita	<i>Escherichia coli</i>	De la Rosa-Gómez, 2007

Ag-montmorillonita	<i>Escherichia coli</i>	Magaña, 2008
Ag-zeolita (Zeomic®)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ishitani, 1995
Ag-zeolita (Zeomic®)	<i>Candida albicans</i>	Nikawa 1997
Ag-zeolita (Zeomic®)	<i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Prevotella intermedia</i> , <i>Actinobacillus</i> <i>actinomycetemcomitans</i> , <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Streptococcus sanguis</i> , <i>Actinomyces</i> <i>viscosus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Kawahara 2000
Ag,Zn-zeolita (AgION)	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	Haile 2007

I.4.2 Redes órgano-metálicas (MOFs)

Las redes órgano-metálicas son sólidos porosos híbridos que emergieron como un nuevo dominio de investigación y desarrollo en los últimos 15 años. Se conocen como metal organic frameworks (MOFs) y se forman a partir de la reacción entre especies orgánicas e inorgánicas de tal manera de construir redes tridimensionales cuyo esqueleto contiene tanto las unidades orgánicas (ligandos) como inorgánicas unidas mediante enlaces fuertes (Férey *et.al.* 2008). A diferencia de sólidos inorgánicos del tipo de las zeolitas, el esqueleto del MOF, en general, es eléctricamente neutro, lo que hace que no tengan capacidad de intercambio iónico. La existencia de entidades orgánicas e inorgánicas en la estructura permite que coexistan zonas hidrofílicas e hidrofóbicas dentro de los poros, lo cual le otorga nuevas y únicas propiedades de adsorción. Dado que los MOF se pueden sintetizar con una amplia variedad de cationes que participen en la construcción de la red y teniendo en cuenta además, la gran cantidad de ligandos orgánicos funcionalizados posibles de conectar la estructura, se puede tener una idea del enorme número de estructuras de MOFs posibles. Estos ligandos, en general, tienen átomos donadores de oxígeno o nitrógeno y cuando se trata de los primeros, los más habituales son los policarboxilatos.

I.4.2.1 HKUST-1

Uno de los MOFs más estudiados y que fue sintetizado en 1999 por Chui *et.al.*, se denomina HKUST-1 en relación a Hong-Kong University of Science and Technology (Chui *et.al.*, 1999). Este es un MOF que contiene cobre, posee elevada superficie específica (800 a 1900 m²/g) y baja densidad. La estructura (Fig.8) se compone de unidades de benceno tricarboxilato (BTC) y átomos de cobre, pudiéndose expresar como Cu₃(BTC)₂(H₂O)₃.xH₂O. Es un material microporoso que posee un sistema interconectado de poros de sección con forma cuadrada con un tamaño de 9 Å x 9 Å. La parte inorgánica está constituida por centros binucleares de Cu-Cu que interaccionan débilmente con ligandos axiales de agua hacia el interior del poro, los cuales pueden ser removidos dejando expuesto los átomos de cobre, cada uno con un sitio de coordinación libre. Esta cualidad y teniendo en cuenta que el Cu es un metal de transición conocido de tener influencia en aplicaciones biológicas, nos impulsó el estudio de este material en los ensayos microbiológicos como un material microporoso conteniendo iones Cu.

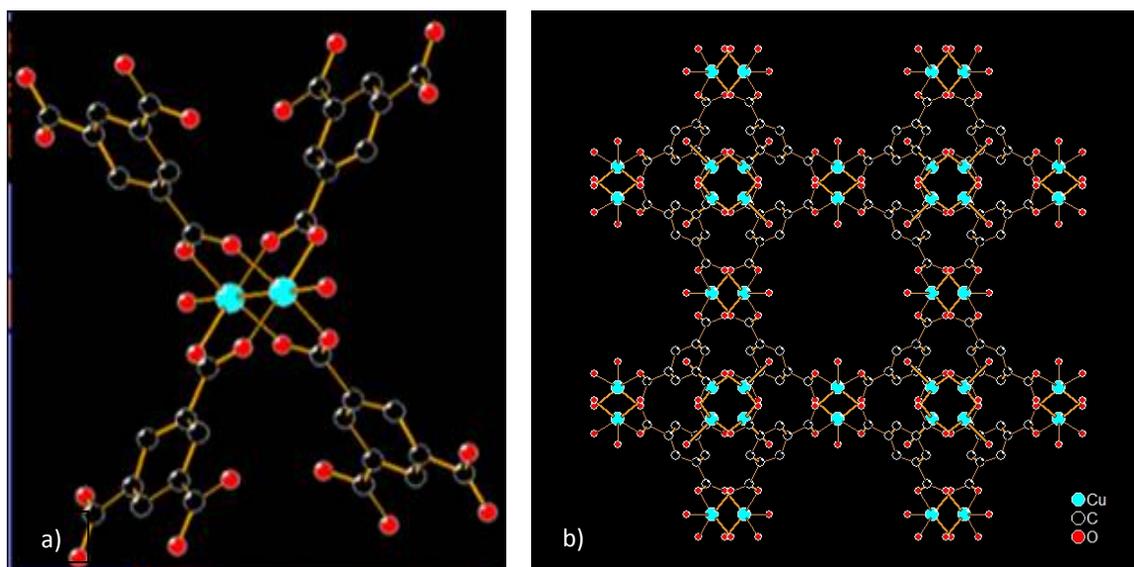


Figura 8: Esquema de conectividad en HKUST-1 a) Los ligandos de BTC se unen en coordinación tetraédrica al centro binuclear de Cu; b) Red extendida de conexión mostrando un poro del material (en azul: Cu, rojo: oxígeno, negro: carbono) (Auerbach *et. al.*, 2003).

OBJETIVO GENERAL

Investigar la capacidad antifúngica de materiales microporosos que dosifiquen iones de Ag y Cu frente a levaduras y mohos obtenidos de alimentos contaminados de origen industrial, en condiciones de baja tensión de oxígeno. Caracterizar las propiedades fisicoquímicas de dichos materiales y relacionarlas con su comportamiento como antifúngico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislamiento, identificación y conservación de hongos filamentosos contaminantes de alimentos que crecen en productos con baja tensión de oxígeno.
- Reactivación de cepas de levaduras contaminantes de jugo de frutas comerciales alterados y conservadas en el cepario del Laboratorio de la FIQ-UNL.
- Determinación de las curvas de crecimiento de las cepas fúngicas aisladas e identificadas y las cepas de levaduras reactivadas.
- Evaluación de la capacidad antifúngica de AgNO_3 frente a los mohos y levaduras estudiadas.
- Dispersión de especies de Ag en una matriz de zeolita mordenita para obtener sólidos con distintas concentraciones de Ag, mediante intercambios iónicos con soluciones de diferentes concentraciones de Ag(I) .
- Evaluación de la capacidad antifúngica de Ag-mordenita frente a los mohos y levaduras que fueron aislados de los alimentos y reactivados, en condiciones de incubación con baja tensión de oxígeno.

- Evaluación de la capacidad antifúngica frente a los mismos microorganismos de una red órgano-metálica conteniendo cobre, en particular del material HKUST-1.
- Efectuar caracterizaciones fisicoquímicas de los materiales microporosos ensayados.
- Tratar de vincular el desempeño de los materiales ensayados en su acción inhibitoria contra los microorganismos, con sus propiedades fisicoquímicas.

II.1 TOMA DE MUESTRAS, AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN, CONSERVACIÓN Y REACTIVACIÓN DE CEPAS FÚNGICAS.

II.1.1 Toma de muestras de hongos filamentosos en industrias lácteas.

Los aislados fúngicos fueron obtenidos a partir de estudios realizados en Industrias lácteas, con las cuales el Laboratorio de Microbiología de la FIQ-UNL tiene convenios a través del CENTRO PARA LA TRANSFERENCIA DE LOS RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN-UNL (CETRI-UNL) mediante la realización de SERVICIOS A TERCEROS (SAT).

Los microorganismos seleccionados para ser utilizados en esta Tesis fueron aislados de productos lácteos en donde éstos provocaron alteraciones en condiciones de baja tensión de oxígeno.

Las muestras fueron tomadas bajo flujo laminar a partir de distintos productos lácteos; se diluyeron las muestras por el método de diluciones seriadas y fueron sembradas en medio de cultivo agar extracto de malta (MEA) con el agregado de cloranfenicol (100mg/l) y se incubó a 25 °C durante 5 días para poder identificar la flora fúngica contaminante.

II.1.2 Obtención de aislados de hongos filamentosos.

A partir de las placas cultivadas donde se diferenciaban perfectamente las colonias, se procedió a repicar cada colonia en medio de cultivo MEA. Se incubaron a 25 °C durante 5 días para verificar la pureza de las colonias para su posterior identificación.

II.1.3 Identificación de los hongos filamentosos aislados.

Los aislados fúngicos fueron identificados de acuerdo a sus características macro y microscópicas según lo propuesto por las metodologías Pitt y Hocking, 2009; Samson *et al*, 2010; Carmichael *et al*, 1980; Domsch *et al*, 1980 y otros autores. Se utilizaron medios de cultivos apropiados con distinta actividad acuosa, incubando a distintas temperaturas y diferentes tiempos según los autores citados.

Con estas metodologías se logró la identificación de los géneros y especies (para la composición de los medios de cultivo ver Anexo A).

Las observaciones macroscópicas se realizaron utilizando una lupa estereoscópica con el fin de apreciar características como: coloración de los esporos, producción de pigmentos solubles, presencia de exudado, etc. Las observaciones microscópicas se llevaron a cabo utilizando un microscopio óptico y los preparados se realizaron utilizando colorante azul de algodón con ácido láctico.

II.1.4 Conservación de las cepas de hongos filamentosos.

Las cepas fúngicas identificadas en el punto anterior fueron conservadas en tubos de Eppendorff conteniendo glicerol- agua (18%p/p) frizados a -20°C hasta la realización de los ensayos de actividad antifúngica.

II.1.5 Reactivación de hongos unicelulares del cepario del laboratorio de Microbiología de la FIQ.

Se seleccionaron 3 levaduras previamente aisladas de bebidas analcohólicas a base de fruta, contenidas en envases de plásticos alterados y concentrados de jugo de naranja. Las cepas se encontraban conservadas en el cepario del Laboratorio de Microbiología FIQ- UNL. Las mismas fueron reactivadas en caldo extracto de malta (CEM) durante 48 h a 25°C y posteriormente se sembraron en agar extracto de malta (MEA) y se determinó la pureza de la colonia de las cepas según Pitt y Hocking, 2009 y Samsom *et.al.*, 2010.

Levaduras seleccionadas:

- *Saccharomyces cerevisiae* Meyen (S.c.) (LMFIQ-701)
- *Zygosaccharomyces rouxii* (Boutroux) Yarrow (Z.r.) (LMFIQ-702)
- *Debaryomyces hansenii* (Zopf) Lodder & Kreger (D.h.) (LMFIQ- 700)

II.2 ENSAYOS CON ANTIFÚNGICOS.

II.2.1 Determinación de las curvas de crecimiento de las cepas fúngicas.

Se conoce (Russell *et al.*; 1999) que en la fase de crecimiento exponencial tardía y comienzo de la fase estacionaria existe una alta concentración de esporas con alta resistencia a los agentes adversos. Con este propósito se realizaron las curvas de crecimientos de las especies fúngicas usando el modelo de Baranyi y Roberts para determinar, para cada especie, el tiempo necesario para llegar a esta fase (ver Anexo B).

Para el estudio de los mohos se partió de suspensiones de esporas con una concentración inicial de 10^7 - 10^8 (esporas*/mL) y se sembraron 2 μ L en el centro de una placa conteniendo medio de cultivo MEA. Se tomaron las mediciones de los radios cada 8 h (para mohos de rápido desarrollo) y cada 24 h (para mohos de lento desarrollo).

Para las levaduras, las curvas de crecimiento se realizaron en condiciones de baja tensión de oxígeno en tubos de 10 mL de capacidad con 9 mL de CEM sembrando 1 mL de una concentración de 10^4 y 10^7 (células de levaduras/mL). Se realizó el recuento en placa de Petri (UFC/mL) utilizando medio de cultivo MEA cada 6 h hasta las 48 h de desarrollo, para determinar las curvas de crecimientos.

Los ensayos se realizaron por triplicado para determinar las fases de crecimiento exponencial.

II.2.2 Preparación de las suspensiones de los microorganismos.

Para llevar a cabo la suspensión de las esporas, se partió de cultivos en fase exponencial ajustando las concentraciones a 10^4 - 10^5 (esporas*/mL) en tubos estériles conteniendo 5 ml de Tween 20 (0,1% v/v en agua estéril) para lo cual, a partir de cada placa de MEA se recolectó con un ansa ojal una abundante cantidad de esporas para lograr la concentración deseada.

*Debiera considerarse el término propágulos fúngicos y no esporas ya que si bien se desprenden mayormente esporas también lo hacen fragmentos de hifas.

Para las levaduras se partió de cultivos en fase de crecimiento exponencial ajustando la concentración a 10^4 - 10^5 (células de lev/mL) en tubos estériles conteniendo 5 mL de CEM.

II.2.2.1 Recuento de esporas en Cámara de Neubauer y en placa de Petri.

Se realizó el recuento de esporas/células en la cámara de Neubauer (que cuantifica células vivas y muertas), para determinar la concentración inicial de la suspensión de esporas/células.

Paralelamente, se llevó a cabo el recuento en placa de Petri (para contar el número de esporas-células vivas) para lo cual se realizaron diluciones seriadas en tubos conteniendo 9 mL de agua de peptona 0,1 % p/v como diluyente y sembrando 1mL en profundidad en placas de Petri, utilizando MEA como medio de cultivo, las mismas se incubaron a T= 28 °C durante 5 días.

Estos ensayos se llevaron a cabo por triplicado y permitieron estimar el número de células vivas en cada ensayo.

II.2.2.2 Metodología utilizada en los ensayos de acción antifúngica.

Obtenidas las suspensiones fúngicas y ajustada la concentración a 10^4 - 10^5 (lev-esporas/mL) se procedió a sembrar 1 mL de las mismas en 9 mL de medio de cultivo CEM en una serie de tubos con tapa a rosca de 10 mL de capacidad, para crear condiciones de baja tensión de oxígeno. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

A los tubos conteniendo el medio de cultivo se les agregó previamente los diferentes antifúngicos y a las concentraciones a ensayar. Los tubos fueron incubados a T° 28°C. Se realizó el recuento en placa de Petri (UFC/mL) con diluciones seriadas a los distintos tiempos: 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 y 48 h sembrando 1 mL en profundidad en MEA. Los recuentos fueron efectuados por duplicado.

Paralelamente, se realizaron los recuentos (UFC/mL) de todas las cepas ensayadas sin antimicrobiano para constatar el desarrollo de los mismos teniendo en cuenta las condiciones de trabajo mencionadas anteriormente.

La eficacia de un antimicrobiano está determinada por la diferencia entre el número de microorganismos antes y después del tratamiento con el mismo. Las reducciones logarítmicas de 1, 2, 3, 4 y 5 Log son equivalentes a los porcentajes de Eficiencia de 90, 99, 99.9, 99.99 y 99.999 % respectivamente (Sapers, 2001). Para que un antimicrobiano sea considerado seguro para la industria alimentaria en la eliminación de mohos debe producir una reducción logarítmica de 4 Log (99.99% eficiencia de muerte) y en la eliminación de bacterias 5 Log (99.999% eficiencia de muerte) (López *et.al.*, 2001; Bloomfield y Looney, 1992).

II.3 ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE Ag-MORDENITA.

II.3.1 Preparación de Ag-mordenita.

Se prepararon soluciones de AgNO_3 de distintas concentraciones: 0,005 M; 0,010 M; 0,025 M y 0,100 M disolviendo AgNO_3 marca Sigma-Aldrich en agua destilada, para intercambiar con la zeolita. Como material zeolítico se utilizó una Na-mordenita marca Zeolyst con una relación Si/Al (nominal) = 6,57. Se partió de estos valores de concentraciones de soluciones de intercambio tomando como base procedimientos de intercambio según Seijger *et.al.* (2003) de tal forma de obtener cantidades de Ag dispersas en la matriz de zeolita, del orden de aproximadamente del 4 al 15 % p/p.

La incorporación de las especies de Ag se realizó mediante intercambio iónico, para lo cual 4 g de mordenita se suspendieron en las soluciones de AgNO_3 de diferentes concentraciones (citadas arriba), manteniendo en agitación a temperatura ambiente durante 24 h en oscuridad. Las soluciones se mantuvieron en ausencia de luz para evitar la reducción a $\text{Ag}(0)$. Posteriormente, se realizó un filtrado de la zeolita con papel de filtro Munktell H000 con bomba de vacío, lavando la misma 2 veces con 250 mL de agua destilada hasta eliminación del exceso de

solución de plata. El filtrado se realizó en oscuridad, manteniendo tapado el papel de filtro. Luego, se realizó un secado en estufa a 130 °C durante 24 h. Las Ag-mordenita obtenidas con distintos contenidos de Ag, se conservaron en frascos herméticos en un lugar seco y en oscuridad.

II.3.2 Evaluación de la capacidad antifúngica con soluciones de AgNO₃.

Estos ensayos se realizaron para evaluar la acción de la Ag (I) en solución frente a las cepas fúngicas, para posteriormente realizar comparaciones respecto a la acción de la Ag dosificada por la Ag-mordenita. Para estas experiencias se prepararon distintas concentraciones de AgNO₃ en 100 mL de medio de cultivo caldo extracto de malta (CEM). Las concentraciones ensayadas fueron: 1670; 555; 170 y 55,4 µM. Los tubos conteniendo 9 mL de CEM, con las distintas concentraciones de AgNO₃ fueron incubados al abrigo de la luz para evitar la reducción a Ag(0) (ver metodología punto II.2.2 y II.2.2.2).

II.3.3 Evaluación de la capacidad antifúngica de Ag-mordenita.

Estos ensayos se realizaron suspendiendo 300, 100, 60, 30 ó 10 mg del sólido de Ag-mordenita conteniendo 5,6 % p/p de Ag, denominado Ag(6)Z en 100 mL de medio de cultivo CEM. La suspensión se llevó a ultrasonido durante 10 min para homogeneizar el medio de cultivo y que éste penetre en la porosidad de las partículas de zeolita, eliminado el aire. Luego, se distribuyeron 9 mL de las suspensiones en tubos con tapa a rosca y se procedió de acuerdo al punto II.2.2 y II.2.2.2.

II.3.4 Ensayos con Na-mordenita.

Se realizaron ensayos con el material Na-mordenita, sin intercambio iónico con Ag, para determinar si dicha matriz de zeolita presenta acción inhibitoria por sí sola (ver metodología punto II.2.2 y II.2.2.2).

II.4 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE UNA RED ORGANOMETÁLICA (MOF) DE COBRE.

II.4.1 Microorganismos utilizados.

Para los estudios con el sólido organometálico se utilizaron dos cepas fúngicas representativas de contaminación en alimentos que son capaces de desarrollar en condiciones de baja tensión de oxígeno. Una cepa fúngica identificada como *Geotrichum candidum* y una de las cepas de levaduras reactivadas *Saccharomyces cerevisiae*. Las mismas cepas fueron utilizadas para el estudio con Ag-mordenita. Además, se incorporó una cepa bacteriana *Escherichia coli* (LMFIQ-1000) que también desarrolla a baja tensión de oxígeno, para evaluar la acción del MOF frente a este otro tipo de microorganismo.

II.4.2 Preparación del MOF (HKUST-1)

La síntesis de HKUST-1 se llevó a cabo según el procedimiento de Chui *et.al*, 1999. Para ello se pesó 0,875 g de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, 99%) y se disolvió en 12 ml de agua destilada. En paralelo se pesó 0,42g de ácido trimésico (BTC) (Sigma-Aldrich 99%) que fue disuelto en 12 ml de etanol (Merck). Posteriormente, ambas soluciones se mezclaron, se mantuvo bajo agitación durante 60 min y luego se llevó a autoclave dentro de un vaso de teflón a 120 °C durante 16 h. El material obtenido se secó durante 10 h a 80 °C obteniéndose finalmente los cristales de MOF de color turquesa.

II.4.3 Evaluación de la capacidad antimicrobiana del MOF (HKUST-1)

Los ensayos se realizaron en forma análoga a las experiencias con Ag-zeolita, suspendiendo 100 mg del sólido HKUST-1 en 100 mL de medio de cultivo CEM. Se llevó a ultrasonido durante 10 min para homogeneizar el medio de cultivo y se distribuyeron 9 mL en tubos tapa a rosca. Luego se procedió de acuerdo al punto II.2.2 y II.2.2.2.

II.4.4 Evaluación de la capacidad antimicrobiana del Ácido Trimesico (BTC).

Se realizaron ensayos con el ligando orgánico del MOF, esto es el ácido trimésico (BTC), para determinar si el mismo presenta acción inhibitoria por sí sólo.

II.5 CARACTERIZACIONES FISICOQUÍMICAS DE LOS MATERIALES.

Con la finalidad de obtener información sobre el comportamiento, las cualidades y la naturaleza de los sólidos en estudio, se realizaron las caracterizaciones fisicoquímicas de los mismos. Estos estudios fueron los siguientes:

II.5.1. Tratamientos efectuados a los materiales ensayados.

a) Filtración de los medios de cultivo conteniendo Ag-mordenita y HKUST-1

El medio de cultivo CEM conteniendo Ag-mordenita y HKUST-1 sin microorganismos, fueron filtrados luego de la incubación para recuperar la fase líquida y determinar las cantidades de Ag y Cu en solución, respectivamente. Las incubaciones se efectuaron en idénticas condiciones que en las evaluaciones antimicrobianas.

También se filtró el medio de cultivo CEM conteniendo HKUST-1 con los microorganismos para recuperar estos últimos y efectuarles caracterizaciones. Las filtraciones se efectuaron con una jeringa con un filtro Sartorius (0.45 μm) tipo AC para HPLC.

b) Pruebas de estabilidad química del HKUST-1

Estas pruebas se llevaron a cabo poniendo en contacto 100 mg de HKUST-1 con 100 ml de CEM, se agitó a temperatura ambiente durante períodos de 24h y 48h. Se realizó la misma prueba colocando la misma cantidad de material en agua destilada. Después del filtrado y secado se realizaron análisis de los sólidos y líquidos recuperados.

II.5.2. Técnicas instrumentales de caracterización fisicoquímica.

a) *Espectroscopía de absorción atómica (AA)*

Se determinó la concentración de Cu y de Ag liberada a los medios de cultivos por Ag-mordenita y HKUST-1, como así también la cantidad de Ag contenida en el sólido Ag-mordenita. Se utilizó un espectrómetro Perkin Elmer, AAnalyst 800 trabajando por atomización con llama. Para la determinación del contenido de Ag en Ag-mordenita, previamente se digirió dicha muestra mediante un procedimiento con ácidos. Para esto, 100 mg del sólido se trató con 10ml ClO_4H + 2ml HNO_3 sobre plancha calefactora \approx 8 h. Se transvasó a tubo de teflón (Digester) + 2 ml HF se digirió 1 hora, posteriormente se diluyó y filtró.

Fundamento

Es un método analítico que está basado en la atomización del analito en una matriz líquida y que utiliza comúnmente un nebulizador para crear una niebla de la muestra. La niebla atómica es desolvatada y expuesta a una energía de una determinada longitud de onda emitida por una lámpara de cátodo hueco construida con el mismo analito a determinar. La excitación de los átomos del analito es efectuada por la lámpara a una determinada longitud de onda. La cantidad de luz absorbida después de pasar a través de la llama determina la cantidad de analito existente en la muestra (Skoog *et.al.*, 2001)

b) *Reducción a temperatura programada con H_2 (H_2 -TPR)*

Con esta técnica se evaluaron las distintas especies de Ag presentes en las muestras, como así también el consumo de H_2 y su relación con el contenido metálico, determinado anteriormente por AA. Se utilizó un equipo Ohkura TP-2002S. Previamente al ensayo, se realizó un pretratamiento in-situ de desecación de la muestra que consistió en pasar una corriente de N_2 y llevar la muestra a 300 °C, manteniendo a esta temperatura por 30 min. Luego se dejó enfriar y una vez frío se cambió a una corriente de H_2 diluida en He. En dicha corriente se aplicó una

rampa de temperatura hasta 900 °C a 5° C/min. Se registró el consumo de H₂ en función de la temperatura de la muestra.

Una vez obtenidos los perfiles TPR, éstos fueron deconvolucionados para separar las señales de reducción individuales. Con esto, se obtuvieron los consumos parciales de H₂ en cada zona de reducción y también el consumo total. Se utilizó el software Origin 7.5, ajustando manualmente hasta obtener el menor error entre el fiteo y la curva real. Los resultados se presentan en el Anexo C.

Fundamento

En la técnica de TPR-H₂ la muestra es sometida a un aumento de temperatura, mientras que una mezcla de gas reductor fluye por ella (por lo general, hidrógeno diluido en un gas inerte como argón). El porcentaje de reducción se obtiene a partir de la medición continua y mediante el seguimiento del cambio en la composición de la mezcla de gas después de pasar por el reactor. De esta forma, si existe un proceso de consumo de H₂ por reducción de alguna especie, dicho consumo se refleja en una variación de la señal del instrumento (Faraldos y Goberna, 2002).

c) Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Con este instrumento que posee elevado nivel de magnificación, se obtuvieron imágenes de la microestructura de los cristales de HKUST-1 antes y después de ser utilizados en los ensayos microbiológicos. Además se observó la morfología de algunos microorganismos (*S. cerevisiae*). Se utilizó un equipo SEM JEOL modelo JSM-35C utilizado a una aceleración de 20 kV. Las observaciones se realizaron bajo el modo de imágenes de electrones secundarios utilizando una tensión de aceleración de 20 kV. La adquisición de la imagen se realizó con un sistema digital marca Semafore.

Preparación de la muestra:

El sólido se dispersó en agua en una baja concentración y luego se agregó una gota de la dispersión sobre un portamuestra. Luego se evaporó el agua

antes de recubrir la muestra para el ensayo. Posteriormente se recubrieron con oro, depositado por “sputtering” empleando un evaporador marca Veeco modelo VE-300 operado en atmósfera de Argón. Esto genera un fino recubrimiento de oro que sirve para incrementar la definición de las imágenes, evitando la acumulación superficial de cargas eléctricas sin modificar la morfología de la muestra.

Fundamento

El SEM proporciona información morfológica y topográfica sobre las superficies de los sólidos que normalmente es necesaria para entender el comportamiento de estos. En un microscopio electrónico de barrido se barre mediante un rastreo programado la superficie de la muestra con un haz de electrones de energía elevada y como consecuencia de ello producen en la superficie diversos tipos de señales. Todas las señales se han utilizado en estudios de superficies, pero las utilizadas en SEM son las correspondientes a electrones retrodispersados y secundarios. Con estos instrumentos en realidad no se realiza una observación directa de la muestra, como en el caso de los microscopios ópticos, sino que se reconstruye una imagen de esta a partir de los electrones secundarios desprendidos de su superficie, causado por la incidencia de un haz de electrones de alta energía enfocada en la muestra (Manual de instrucciones de microscopio de barrido electrónico JEOL JSM-35C, JEOL LTD./ Tokyo, Japan).

d) Microanálisis químico elemental de rayos X por sonda de electrones (EPMA)

Para determinar la existencia de Cu en el interior de los microorganismos luego del ensayo con HKUST-1 y las proporciones de Ag y Na contenidas en la zeolita, se utilizó un equipo dispersivo en energía marca EDAX acoplado al SEM. Con este, se trató el espectro de rayos X proveniente de la muestra a causa de un bombardeo electrónico de la misma. Esta técnica, permite detectar elementos cuyo número atómico esté comprendido entre 11 (Na) y 92 (Ur) inclusive. El software del sistema EDAX permitió el cálculo semicuantitativo de los elementos, empleando el

método SEMIQ, que no requirió del empleo de estándares. Los espectros de rayos X se obtuvieron con una tensión de aceleración de 20 kV. (Goodhew *et.al*, 2001). Este análisis permitió obtener los % peso de cada elemento detectado y las relaciones atómicas entre éstos.

Preparación de muestras

Para este ensayo la misma muestra observada por SEM fue recubierta con grafito. Al recubrir con este material, además de evitar posibles interferencias en las señales, se logra una mayor sensibilidad de la técnica.

Fundamento

Se basa en el principio de que si un material sólido es bombardeado por un haz acelerado y enfocado de electrones, el haz incidente tiene la suficiente energía para liberar tanto materia como energía de la muestra. Estas interacciones electrón-muestra liberan principalmente calor, pero también electrones derivados y rayos X. Los que más interesan son los electrones secundarios y retrodispersados, útiles para imágenes de la superficie. Mientras, la generación de rayos X es producida por colisiones inelásticas de los electrones incidentes con los electrones de las capas internas de los átomos de la muestra; cuando un electrón de una capa interna se eyecta de su órbita dejando una vacancia, un electrón de una capa más alta cae en esta vacancia y debe perder algo de energía para hacerlo, como rayos X. Estos rayos X cuantizados son característicos de cada elemento. El análisis es no destructivo, por lo que es posible reanalizar el mismo material más de una vez (Faraldos y Goberna, 2002).

e) Difracción de rayos X (DRX)

Esta técnica se utilizó para determinar la estructura cristalina de la zeolita intercambiada con Ag, como así también del MOF antes y después de los ensayos microbiológicos. El instrumento utilizado fue un Shimadzu XD-D1 con tubo de rayos X de Cu, detector fotomultiplicador, filtro de Ni y software para procesamiento de

datos. Se trabajó con una velocidad de barrido de 2° min^{-1} entre $2\theta = 5^\circ$ y 55° , que es el intervalo en el que las señales más importantes de la zeolita y el MOF se pueden encontrar.

Preparación de las muestras:

Los sólidos se colocaron en un portamuestra para polvos, compactándolo con espátula. La muestra colocada en el portamuestra se colocó verticalmente en el instrumento

Fundamento

La interacción entre la radiación X y los electrones de la materia que atraviesa da lugar a una dispersión. Cuando un rayo X alcanza la superficie de un cristal a cualquier ángulo, una porción es dispersada por la capa de átomos de la superficie. La porción no dispersada penetra en la segunda capa de átomos donde otra vez una fracción de la radiación es dispersada y la que queda pasa a la tercera capa. Aquí tienen lugar las interferencias (tanto constructivas como destructivas) entre los rayos dispersados. El efecto acumulativo de esta dispersión desde los centros regularmente espaciados es la difracción del haz. Los requisitos para que se produzca la difracción de los rayos X son: (1) que el espaciado entre las capas de átomos o los planos del cristal “d” sea aproximadamente la misma magnitud que la longitud de onda de la radiación incidente “ λ ” y (2) que los planos del cristal o centros de dispersión estén distribuidos en el espacio de una manera muy regular. Así se puede escribir que las condiciones para una interferencia constructiva del haz de rayos X, que forma un ángulo θ con el cristal son $2d \sin\theta = n \cdot \lambda$ ecuación conocida como ley de Bragg. Esta técnica proporciona un medio adecuado y práctico para la identificación de compuestos cristalinos tales como las zeolitas (Faraldos y Goberna, 2002).

f) *Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS)*

Se analizó mediante XPS el estado de oxidación del Cu en HKUST-1 antes y después de los ensayos microbiológicos. Para ello se utilizó un módulo Multitécnica Specs equipado con una fuente de rayos X dual Mg/Al y un analizador hemiesférico PHOIBOS 150 en el modo transmisión analizador fijo (FAT). Los espectros se obtuvieron con una energía de paso de 30 eV y un ánodo de Mg operado a 200W. La presión durante la medida fue menor a $2 \cdot 10^{-8}$ mbar. Las muestras fueron molidas, prensadas, soportadas sobre portamuestra, sometidas a una deshidratación en vacío a 150 °C durante 20 min y finalmente evacuadas a vacío inferior a $3 \cdot 10^{-7}$ mbar previo a las lecturas.

Se tomó la señal de C1s como referencia interna a 284,4 eV. El procesamiento de los datos y deconvolución de los picos se realizó con el software Casa XPS (separación de las señales Cu 2p_{3/2} y Cu 2p_{1/2} = 19,8 eV, los picos fueron graficados con componentes gaussianas y lorentzianas (GL = 30 para Cu(I) y GL = 80 para Cu (II)).

Fundamento

La técnica consiste básicamente en la excitación mediante un haz de rayos X de los niveles más internos de los átomos, provocando la emisión de fotoelectrones que proporcionan información sobre la energía de cada nivel y, por tanto, sobre la naturaleza de cada átomo emisor. Puesto que la energía del haz es $h\nu$, si el fotoelectrón sale con una energía cinética E_K , la diferencia entre ambas nos da la energía de enlace (EE) del átomo en particular, que es característica de cada elemento. Todo se resume a medir la velocidad de los electrones emitidos mediante el espectrómetro: $EE = h\nu - E_K$. Es una técnica de análisis elemental cualitativa que permite estudiar la superficie de los materiales. El análisis se hace sobre las capas más cercanas a la superficie (alrededor de 5 nm de profundidad). Una gran ventaja respecto a otras técnicas es que permite determinar el estado químico (ej. estado de oxidación) de los átomos que se encuentran en la muestra (Faraldos y Goberna, 2002).

II.6 ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS OBTENIDOS.

Para el análisis de los resultados se utilizaron como soportes informáticos Planilla Excel, OriginPro versión 8 y software DMFit (Dynamic Modeling) versión 2.1 para realizar las curvas de crecimiento y determinar la fase óptima en que los microorganismos presentaban mayor resistencia a los antifúngicos. Todas las drogas utilizadas fueron de grado analítico.

III.1 IDENTIFICACIÓN Y REACTIVACIÓN DE LAS CEPAS FÚNGICAS.

III.1.1 Identificación de las especies fúngicas aisladas.

Se aislaron e identificaron los siguientes mohos contaminantes de productos lácteos que de acuerdo a Pitt y Hocking, 2009 se constató las características macro, microscópicas y fisiológicas. Las mismas se detallan a continuación.

- *Rhizopus oryzae* Went & Prins. Geerl (*R.o.*)
(Subphylum: Mucoromycotina; Orden: Mucorales; Familia: Mucoraceae)
(Http:www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)

CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS.

Las colonias en MEA y CYA a 25°C a los 7 días cubren las placas de Petri. El micelio es grisáceo con esporangios negros y reversos pálidos. En G25N las colonias alcanzan un diámetro de 30-60 mm, cubren la placa de Petri con micelio bajo. No se observa crecimiento a 5°C. En CYA a 37°C cubren la placa de Petri de forma similar que las colonias en CYA a 25°C.

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS.

Los esporangióforos surgen en grupos de uno a tres a partir de los rizoides, con estipes de 1500 µm de longitud, no ramificados. Esporangio esférico hasta 150µm de diámetro, columelas generalmente esféricas hasta 100 µm marrón claro, cuando maduran colapsan hacia abajo con forma de paraguas.

Los esporangiosporos son marrones, de variadas formas; elipsoidal, irregulares y de aproximadamente de 5-8 µm de longitud.

FISIOLOGÍA

Crece a una temperatura desde 7 a 42°C ó 45°C, con el óptimo cerca de 37°C, su mínimo de actividad de agua para el crecimiento es 0,88. Bajo condiciones óptimas su crecimiento es muy rápido. Al igual que otras especies de Mucorales, *Rhizopus* puede crecer bajo condiciones anaeróbicas, sin embargo con una atmosfera de 80% de O₂ + 20% de CO₂ reduce a la mitad su tasa de crecimiento.

Según Samson *et.al.*, 2010 es común encontrarlo en maní, nueces, maíz, productos lácteos, vegetales frescos y frutas. Su presencia en jugos procesados indica una contaminación exógena ocurrido en la etapa de llenado y sellado. El aislado fue obtenido a partir de yogurt comercial.

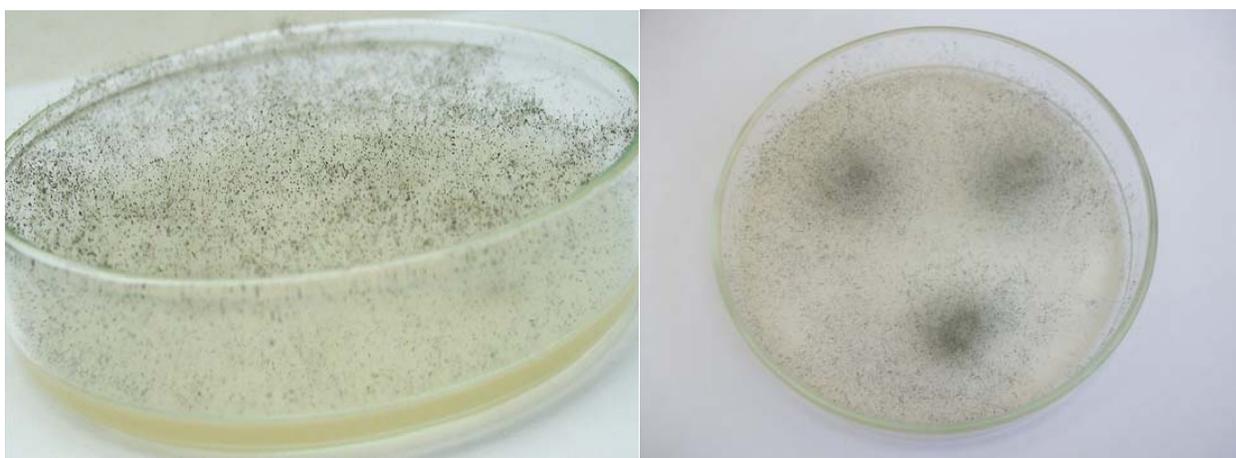


Figura 9: Colonias en MEA, 7 días a 25°C de *Rhizopus oryzae*

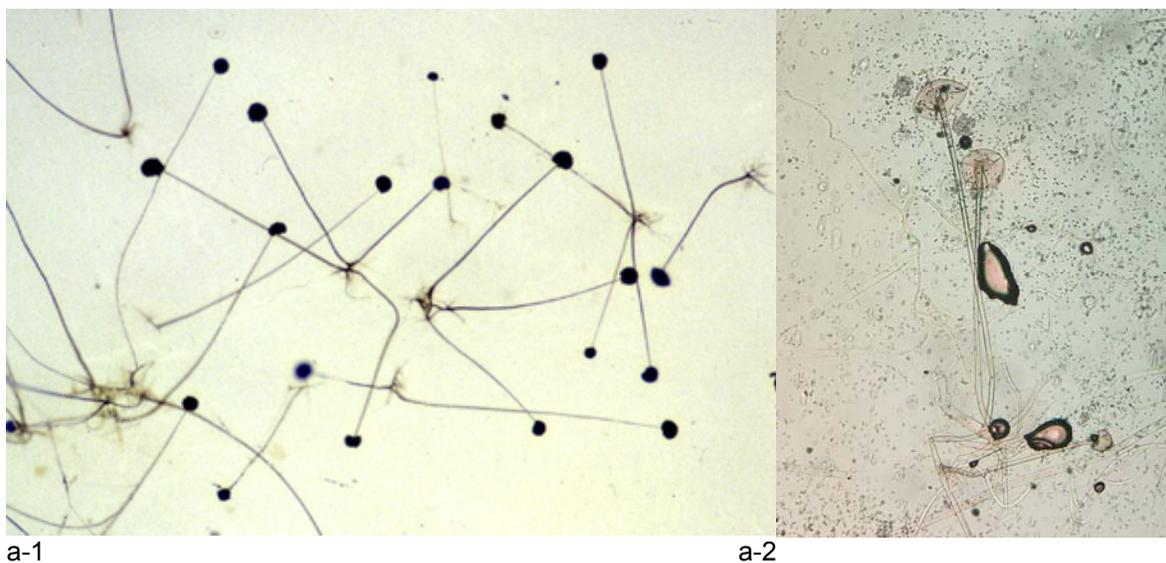


Figura 10: a- Esporangióforos de *Rhizopus oryzae* (lente objetivo de 10x).
(Fig. a-1: <http://www.google.com.ar/imgres?q=rhizopus+oryzae&>)



Figura10: b- Columela colapsada y esporangiosporos de *Rhizopus oryzae*. (lente objetivo 40x)

- *Mucor circinelloides* Tiegh. (M.c.)
(Subphylum: Mucoromycotina; Orden: Mucorales; Familia: Mucoraceae)
([Http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed))

CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS.

Las colonias en CYA a 25°C a los 7 días alcanzan un diámetro de hasta 60 mm o más, a menudo su crecimiento se extiende hacia el exterior de la placa de Petri.

El micelio es gris claro y el reverso color del medio de cultivo. En MEA las colonias cubren la placa de Petri similarmente como en CYA. En G25N las colonias alcanzan un diámetro de 15-25 mm, son bajas y relativamente densas y amarillas tanto en reverso como anverso. A 5°C las colonias llegan a un diámetro de 4-10mm, son bajas y crecen de manera esparcida. En CYA a 37°C, las colonias alcanzan un diámetro de 20-40 mm, son laxas y esparcidas con colores marrones.

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS

Los esporangios tienen forma esférica con un diámetro de 25-50 μm , a veces hasta 80 μm , los esporangiosporos son hialinos y la mayoría elipsoidales, de 4,5-7 μm de longitud de paredes finas. Las clamidoconidias son poco comunes,

esféricas, cilíndricas o irregulares de más de 15mm de diámetro, no se forman zigosporas.

FISIOLOGÍA

Esta especie se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza y puede crecer bajo condiciones anaeróbicas, debido a esto ocasionalmente causa contaminaciones en bebidas. Su crecimiento bajo estas condiciones se asemeja a levaduras, pero sus células son mucho más alargadas como para ser confundidas con una levadura verdadera. Las células cultivadas en condiciones aeróbicas producen un crecimiento en forma filamentosa. Su apariencia semejante con levaduras también se produce en elevadas concentraciones de cloruro de sodio.

Tresner y Hayes (1971) reportaron su crecimiento en medios con 15% de cloruro de sodio (0,90 de actividad de agua) pero no en 20% (0,86 de actividad de agua).

Según Samson *et.al.*, 2010, esta especie resulta ser patógeno en animales y el hombre. Causa alteración en quesos, mangos y duraznos. Otras fuentes: carnes, avellanas, nueces, maíz, etc.

El aislado fue obtenido de leche fermentada con bacterias probióticas.

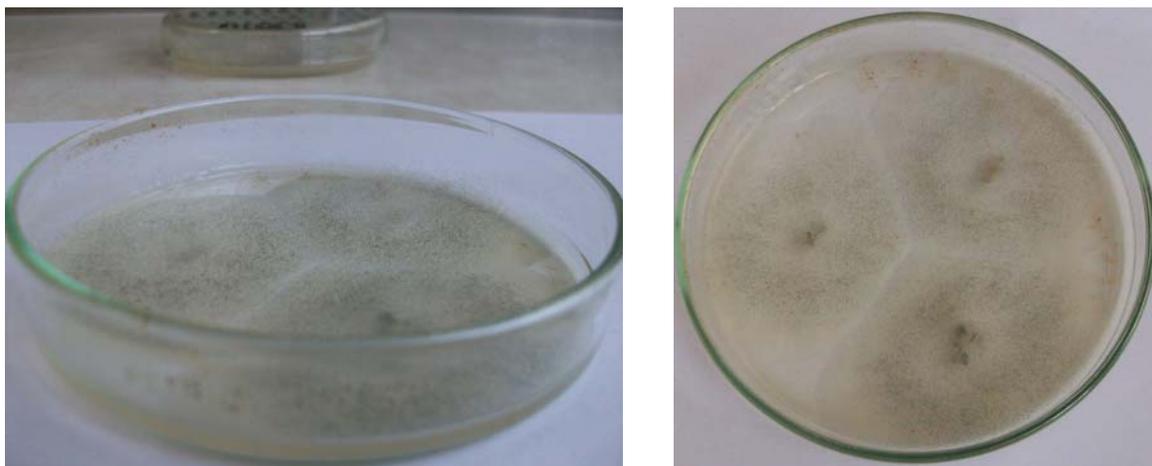


Figura 11: Colonias en MEA, 7 días a 25°C de *Mucor circinelloides*.

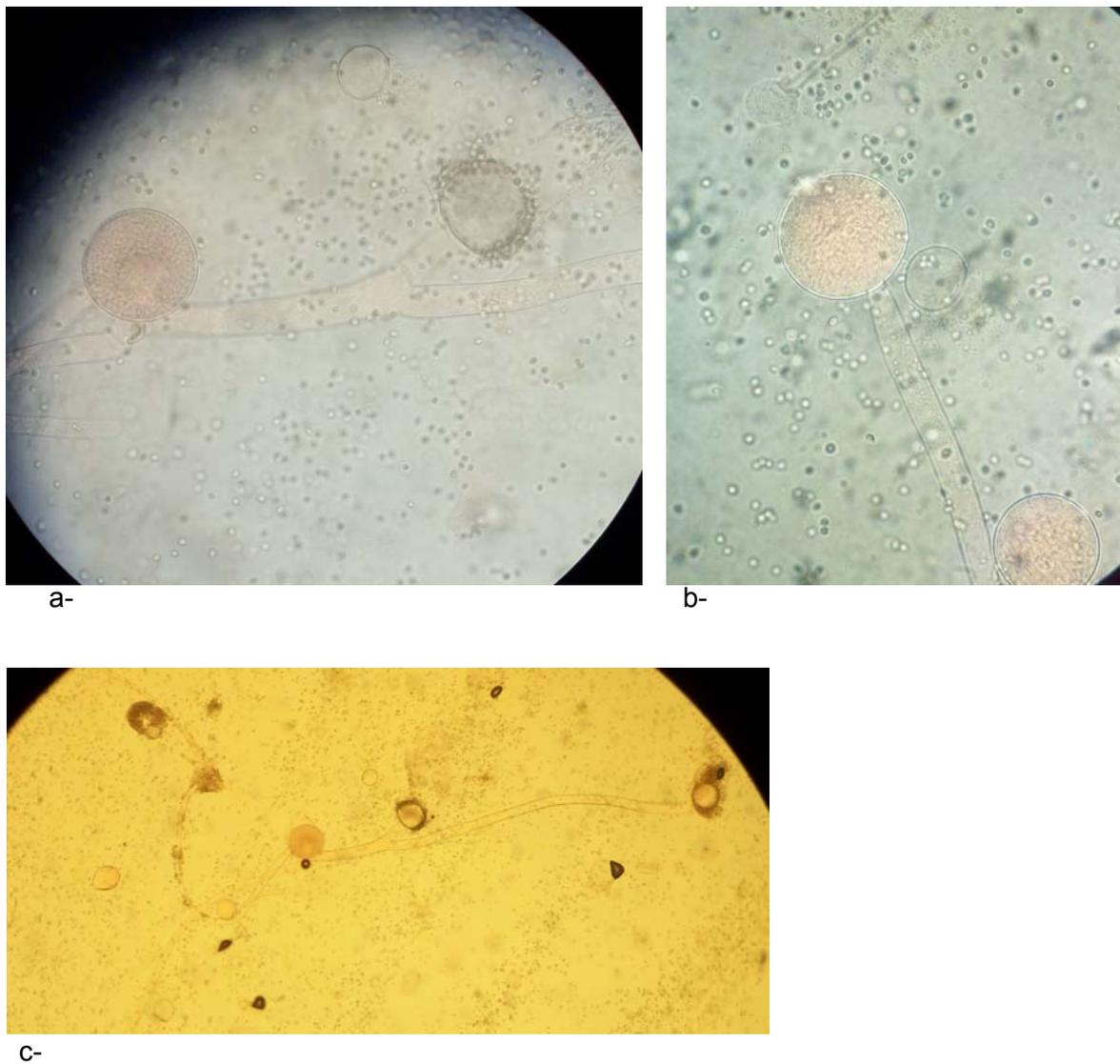


Figura 12: a-b- Esporangios y esporangiosporos de *Mucor circinelloides* (lente objetivo 40x), c- Esporangios de *Mucor circinelloides* (lente objetivo 10x)

- *Geotrichum candidum* Link: Fr. (G.c.)(Anamorfo)
(Phylum: Ascomycota; Subphylum: Saccharomycotina; Orden: Saccharomycetales;
Familia: Dipodascaceae) ([Http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed))

CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS.

Las colonias en CYA a 25°C a los 7 días presentan un diámetro de 20-45mm de diámetro. El micelio es blanco y reverso pálido. Las colonias en MEA presentan un

diámetro de 50-65 mm similar que en CYA pero de textura más suave similar a una levadura. En G25N no crece. A 5°C no germina o puede desarrollar colonias de hasta 4 mm de. En CYA a 37°C usualmente no crece, ocasionalmente no más de 10mm de diámetro.

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS

Por mucho tiempo este género se distinguió por su forma de reproducción, que se basa exclusivamente en la formación de arthroconidias de la hifa vegetativa. Las arthroconidias son esporas cilíndricas formadas por septación de la hifa vegetativa en cortos segmentos, que con el tiempo redondean sus extremidades semejándose a una levadura.

FISIOLOGÍA

El crecimiento de *Geotrichum candidum* está restringido a hábitats con alta actividad de agua, su mínimo para crecer es 0,95. Miller y Golding (1949) reportaron que *Geotrichum candidum* puede crecer a bajas tensiones de oxígeno pero no en anaerobiosis. No se conoce que esta especie produzca compuestos tóxicos.

Según Samson *et.al.*, 2010 *Geotrichum candidum* es un importante patógeno de cítricos durante el almacenamiento poscosecha causando alteración agria en una amplia variedad de vegetales. Es un contaminante frecuente en líneas de procesamiento y por consiguiente en los productos como alimentos congelados.

Este moho es un problema común en leche cruda, especialmente cuando se utiliza en la elaboración de quesos blandos y frescos. Se lo ha aislado de una gran variedad de otros alimentos como carnes, jamones, quesos duros, alimentos fermentados tradicionales y bebidas alcohólicas.

La cepa fue aislada de queso blando comercial.



Figura 13: Colonias en MEA, 7 días a 25°C de *Geotrichum candidum*

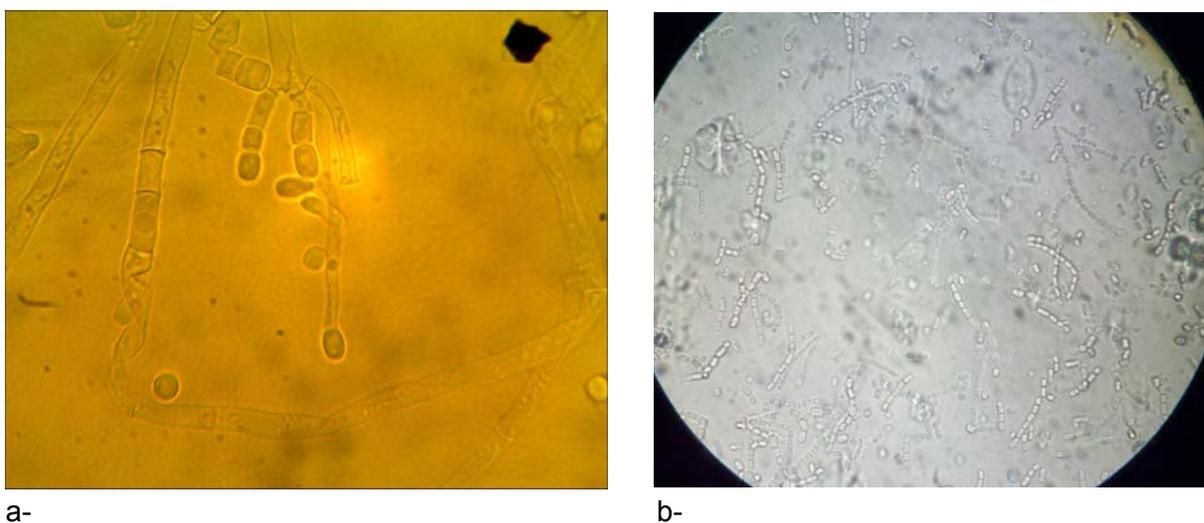


Figura 14: Arthroconidias de *Geotrichum candidum* (lente objetivo; a- 40x, b- 10x)

III.1.2 Reactivación de levaduras del cepario del Laboratorio de Microbiología de la FIQ.

Las levaduras reactivadas presentaron las siguientes características que corresponden a las especies descritas por Pitt y Hocking como se detallan a continuación.

- *Saccharomyces cerevisiae* Meyen (S.c)
(Phylum: Ascomycota; Subphylum: Saccharomycotina; Orden Saccharomycetales; Familia: Saccharomycetaceae)([Http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed))

CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS.

Las colonias en MEA a 25°C presentan un diámetro de 1-2 mm a los 3 días, blancas, convexas, márgenes circulares. A los 7 días su diámetro es de 2-3 mm. Presentan escaso crecimiento en medio agar Czapeck. El desarrollo de las colonias en CYA a 37°C por lo general es mucho más rápido que a 25°C. El crecimiento en agar extracto de malta con ácido acético es escaso o ausente. No crece en MY50G o MY10-12.

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS

Las células usualmente son esféricas a subesféricas 5-12 x 5-10 µm, ocasionalmente elipsoidales a cilíndricas, 5-20(-30) x 3-9 µm. Se reproducen por brotación en forma irregular, solas, de a pares o en cadenas. Algunas veces presenta ascosporas en MEA después de una prolongada incubación. Los ascos son formados directamente de la célula vegetativa sin conjugación; los ascos contienen de 1-4 ascosporas esféricas a subesféricas de paredes lisas.

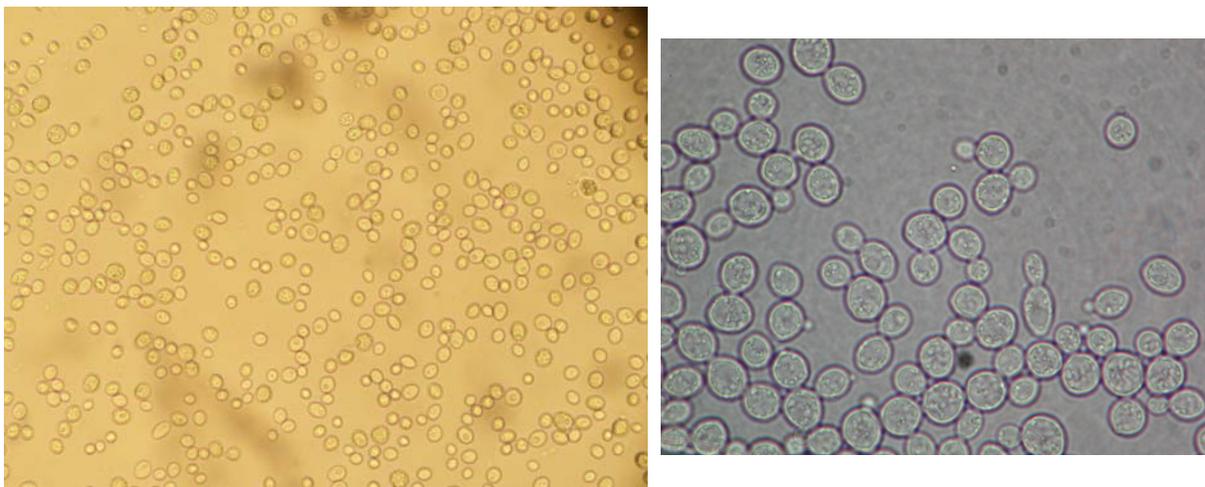
FISIOLOGÍA

Saccharomyces cerevisiae presenta un crecimiento óptimo entre 33 y 38°C con 10-30% de glucosa. La temperatura mínima de crecimiento fue a 4°C con 10% de glucosa y 13°C con 50% de glucosa. Su temperatura máxima de crecimiento es de 38-30 °C. Juven *et. al.* (1978) demostró que *Saccharomyces cerevisiae* crece con bajo a_w de 0,89 en glucosa y a un pH neutro en medio de cultivo.

Praphailong y Fleet (1997) demostraron un crecimiento con 7.5% (w/v) NaCl (0.95 a_w) a pH 5 y pH 7, pero a pH 3, sólo con 5% (w/v) NaCl fue tolerado. El pH más bajo al cual obtuvieron desarrollo de *Saccharomyces cerevisiae* fue 2.5 en base nitrogenada con 5% de glucosa en buffer citrato- fosfato.

Saccharomyces cerevisiae es bien conocido por su rol en la manufactura de panes y bebidas alcohólicas. Esta levadura tiene una amplia distribución en alimentos y

puede ser una fuente de deterioro de los mismos. De acuerdo a Samson *et.al.*, 2010 se encuentra presente en zumos de frutas y concentrados de frutas. Se ha aislado también de pasta de tomate, puré de frutas, máquinas embotelladoras y productos lácteos.



a-

b-

Figura 15: Células vegetativas de *Saccharomyces cerevisiae* (lente objetivo: a-40x y b-45x) (Fig.b: <http://www.google.com.ar/imgres?q=saccharomyces+cerevisiae&>)

- *Zygosaccharomyces rouxii* (Boutroux) Yarrow (Z.r.)
(Phylum: Ascomycota; Subphylum: Saccharomycotina; Orden: Saccharomycetales; Familia: Saccharomycetaceae)([Http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed))

CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS.

Las colonias en MEA a 25°C presentan un diámetro de 0.2-0.5 mm a los 3 días; son blancas de márgenes circulares, mayormente semiesférica y de superficie brillante.

No crece en agar czapeck, presentan escaso crecimiento a 37°C. No crece en agar extracto de malta con ácido acético. Crece en MY50G y en MY10-12, originando colonias a los 3 días.

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS

Las células son subesféricas a elipsoidales a los 3 días de 4-9 x 2.5-7 μm , mayormente de 5-7 x 4-5 μm . Se reproducen por brotación, solas, de a pares o en pequeños grupos.

Las ascosporas raramente se observan en medios de cultivo artificial pero se han encontrado en alimentos de bajo a_w , y con alto contenido de azúcar como el caso de las ciruelas.

Los ascos son de forma irregular, usualmente formados por conjugación de 2 células; presentan de 1-4 ascosporas siendo éstas esféricas a subesféricas, de paredes lisas a finamente rugosas.

FISIOLOGÍA.

Zygosaccharomyces rouxii tiene la capacidad combinada de desarrollarse a baja actividad acuosa y fermentar fuertemente los azúcares (hexosas), y es causante de deterioro en alimentos fermentados

De acuerdo a Samson *et.al.*, 2010 se encuentra presente extracto de malta, jugo de fruta concentrado, cerezas glaseadas, mosto del vino, mermeladas, etc.

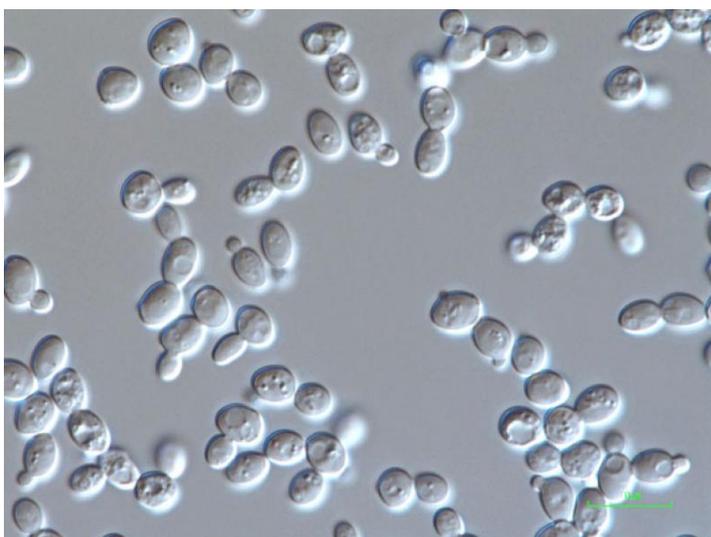


Figura 16: Células vegetativas de *Zygosaccharomyces rouxii* (lente objetivo 45x).
(<http://www.google.com.ar/imgres?q=zygosaccharomyces+rouxii&>)

- *Debaryomyces hansenii* (Zopf) Lodder & Kreger (D.h.)
(Phylum: Ascomycota; Subphylum: Saccharomycotina; Orden: Saccharomycetales;
Familia: Debaryomycetaceae)([Http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed))

CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS.

Presenta colonias en MEA a 25°C de 1-2 mm de diámetro a los 3 días son de color beige. Poseen forma convexa semiesférica con márgenes circulares; a los 7 días forman colonias de 2-4 mm de diámetro. El crecimiento en Agar Czapeck es escaso, rara vez crecen a 37°C. No presenta crecimiento en agar extracto de malta con ácido acético, posee crecimiento lento en MY50G (hasta 1 mm de diámetro a los 7 días) y rápido crecimiento en MY10-12 (1-4 mm en 7 días).

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS

Las células en MEA a los 3 días son esféricas, subesféricas de 2.5-4 µm de diámetro, algunas células elipsoidales resultan de hasta 8 µm de largo. Posee reproducción de forma irregular por brotación, a veces en más de un sitio en la célula madre. Se reproducen solas; de a pares o en pequeños grupos. Las ascosporas se observan en cultivos viejos por conjunción entre la célula madre y la célula hija. Presentan generalmente 1 ó 2 ascosporas por ascos.

FISIOLOGÍA

Esta levadura presenta alta tolerancia a la sal, por lo que se la encuentra en aceitunas, quesos, leche fermentada y salsa de soja. Es un componente común de la microflora de los quesos, pudiendo cumplir un papel en su maduración.

De acuerdo a Samson *et.al.*, 2010, *Debaryomyces hansenii* causa deterioro en jugos de frutas, conservas de higos, se lo ha aislado de frutas, tomates crudos, yogur, manteca rancia, cerveza, etc.

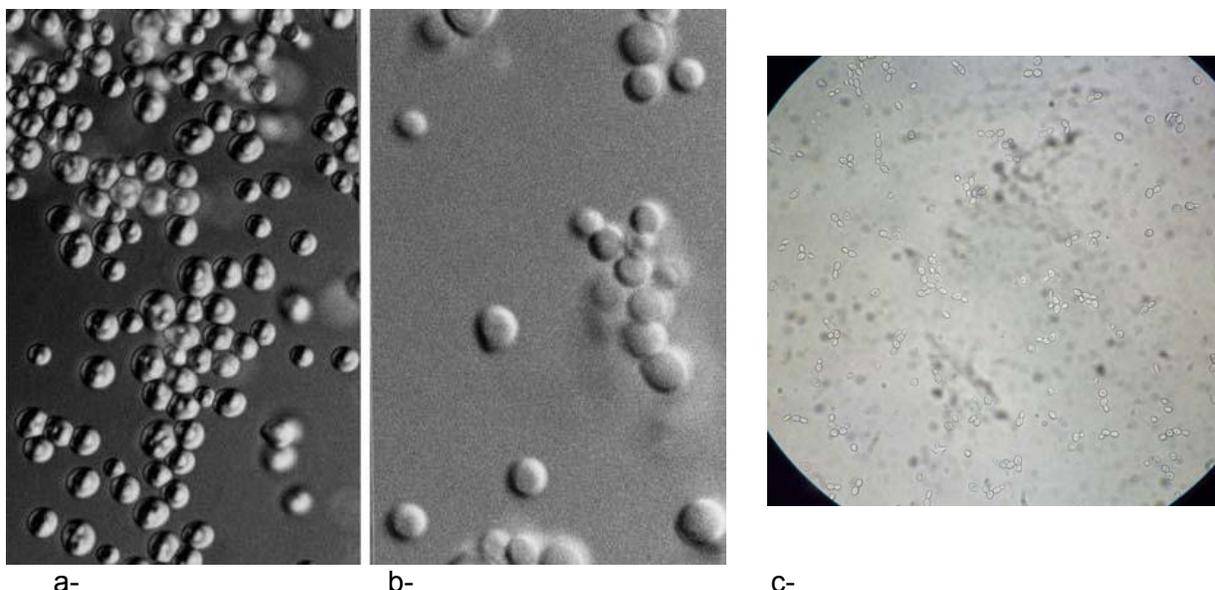


Figura 17: Células vegetativas de *Debaryomyces hansenii* (lente objetivo a-40x, b- 45x y c- 10x) (Fig.a y b.: Pitt and Hocking, 2009).

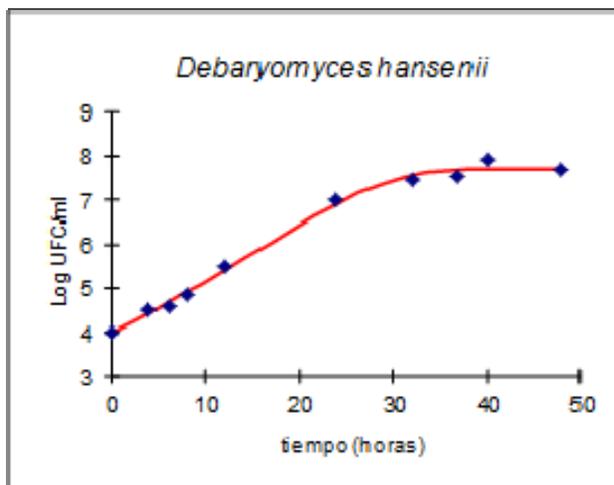
Dado que el aspecto de las colonias de las 3 levaduras estudiadas son similares, no se muestran fotografías de las mismas en placas de Petri.

III.2 ENSAYOS CON AGENTES ANTIMICROBIANOS.

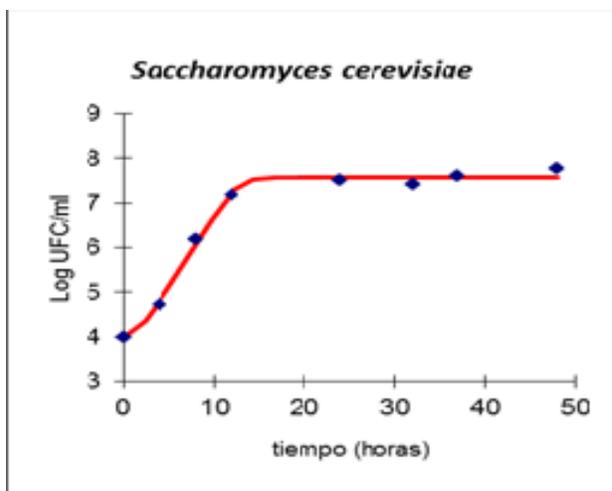
III.2.1 Determinación de las curvas de crecimiento de las cepas fúngicas.

Los datos obtenidos se procesaron con el software DMFit (DM: Dynamic Modelling Versión 2.1) generando los valores de: velocidad específica de crecimiento (μ_{max}), fase lag (λ), número inicial de células (y_0) a $t=0$, número final de células (y_{max}). Con su respectivo coeficiente de regresión r^2 (ver anexo B) En las siguientes gráficas se pueden observar las curvas de crecimiento de los distintos hongos: *Debaryomyces hansenii*; *Saccharomyces cerevisiae*; *Zygosaccharomyces rouxii*; *Geotrichum candidum*; *Rhizopus oryzae* y *Mucor circinelloides*.

Los valores fueron promediados de los ensayos realizados por triplicado.

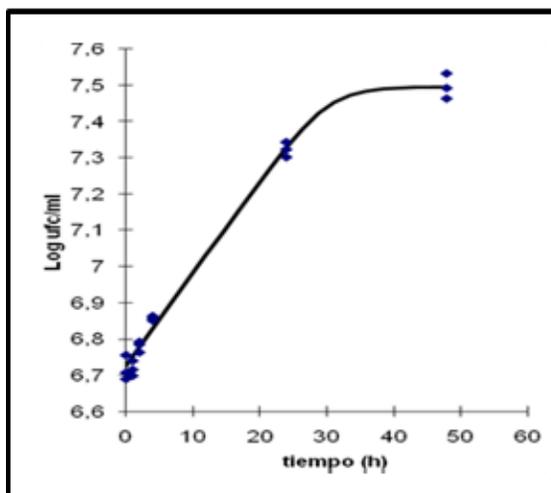
Gráfica 1: Curva de crecimiento de *Debaryomyces hansenii*Parámetros de crecimiento de *Debaryomyces hansenii*.

(μ_{\max}) (log UFC.ml ⁻¹ .h ⁻¹)	fase lag (λ) (h)	y_0 (log UFC. ml ⁻¹)	y_{\max} (Log UFC.ml ⁻¹)	r^2_{stat}
0,129	0,814	3,974	7,727	0,992

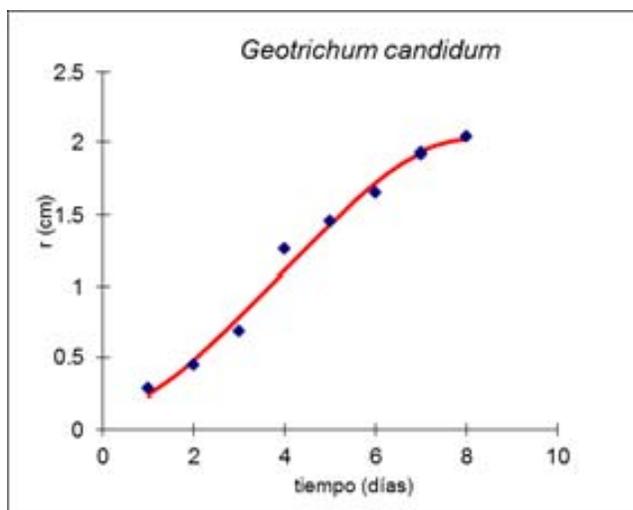
Gráfica 2: Curva de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*.

Parámetros de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*

(μ_{\max}) (log UFC.ml ⁻¹ .h ⁻¹)	fase lag (λ) (h)	y_0 (log UFC. ml ⁻¹)	y_{\max} (Log UFC.ml ⁻¹)	r^2_{stat}
0,337	1,707	3,972	7,576	0,989

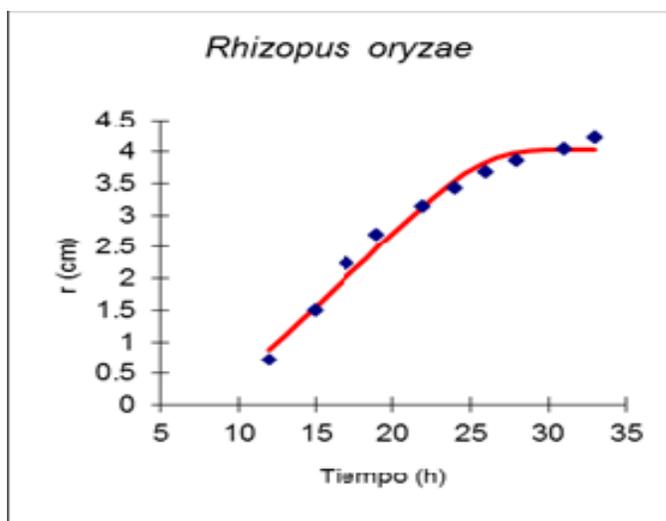
Gráfica 3: Curva de crecimiento de *Zygosaccharomyces rouxii*Parámetros de crecimiento de *Zygosaccharomyces rouxii*

μ_{\max} (Log UFC.ml ⁻¹ .h ⁻¹)	fase lag (h)	y_0 (Log UFC. ml ⁻¹)	y_{\max} (Log UFC.ml ⁻¹)	r^2_{stat}
0,025	4,696 E-08	6,722	7,495	0,99

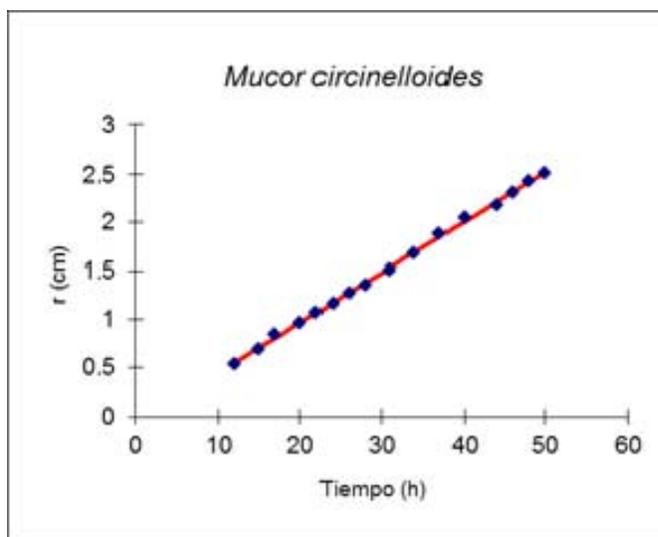
Gráfica 4: Curva de crecimiento de *Geotrichum candidum*

Parámetros de crecimiento de *Geotrichum candidum*

$\mu_{\max}(\text{cm.días}^{-1})$	fase lag (días)	y_0 (cm.día ⁻¹)	y_{\max} (cm.días ⁻¹)	r^2_{stat}
0,326	0,342	0,242	2,044	0,977

Gráfica 5: Curva de crecimiento de *Rhizopus oryzae*.Parámetros de crecimiento de *Rhizopus oryzae*

$\mu_{\max}(\text{cm.h}^{-1})$	fase lag (h)	y_0 (cm.h ⁻¹)	y_{\max} (cm.h ⁻¹)	r^2_{stat}
0,228	8,413E-09	0,874	4,033	0,973

Gráfica 6: Curva de crecimiento de *Mucor circinelloides*.

Parámetros de crecimiento de *Mucor circinelloides*

$\mu_{\max}(\text{cm.h}^{-1})$	fase lag (h)	$y_0 (\text{cm.h}^{-1})$	$y_{\max} (\text{cm.h}^{-1})$	r^2_{stat}
0,052	0,053	0,544		0,999

De las gráficas obtenidas se pueden observar que las levaduras presentaron su fase de crecimiento exponencial tardía y comienzo de la fase exponencial estacionaria en los siguientes tiempos: *D. hansenii* y *Z. rouxii* dentro de las 28-30h y *S. cerevisiae* entre las 12-14h.

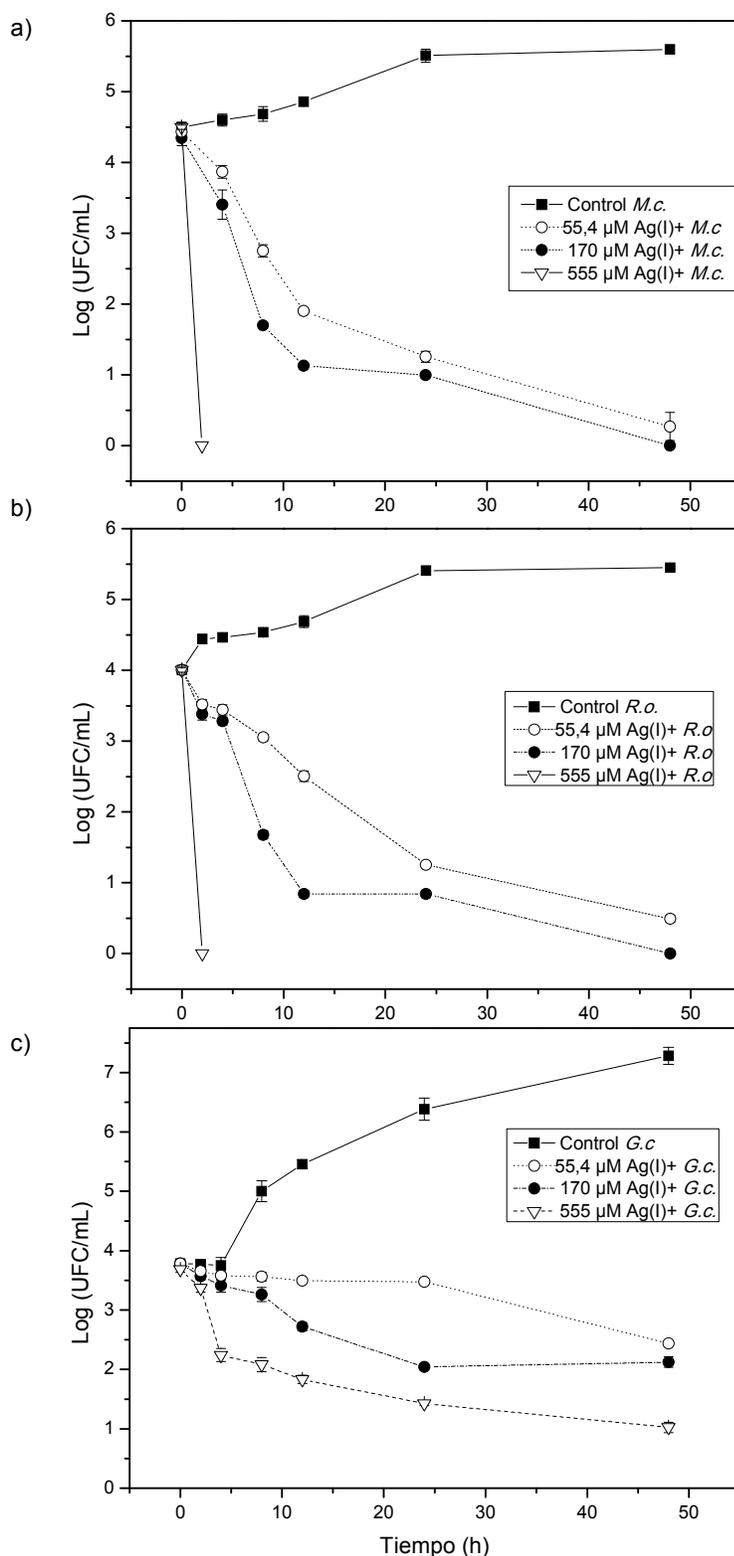
Los mohos presentaron su fase de crecimiento exponencial tardía y comienzo de la fase exponencial estacionaria en los siguientes tiempos: *G. candidum* entre 6-7 días (moho de lento desarrollo), *R. oryzae* entre las 24-26h (moho de rápido desarrollo) y *M. circinelloides* si bien, como se observa en la gráfica presentó un crecimiento lineal, macroscópicamente se observó una mayor esporulación dentro de las 24-26 h al igual que *R. oryzae* y teniendo en cuenta que *M. circinelloides* es un moho de rápido crecimiento la cosecha de las esporangiosporas se realizó en los mismos tiempos que para *R. oryzae*.

III.2.2 ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS CON SOLUCIONES DE AgNO_3

Se efectuaron ensayos con soluciones de AgNO_3 en un rango de concentraciones de 1670; 555; 170 y 55,4 μM , que corresponden a una cantidad de Ag libre en solución similar a la que luego presentará el sólido de Ag-mordenita ensayado.

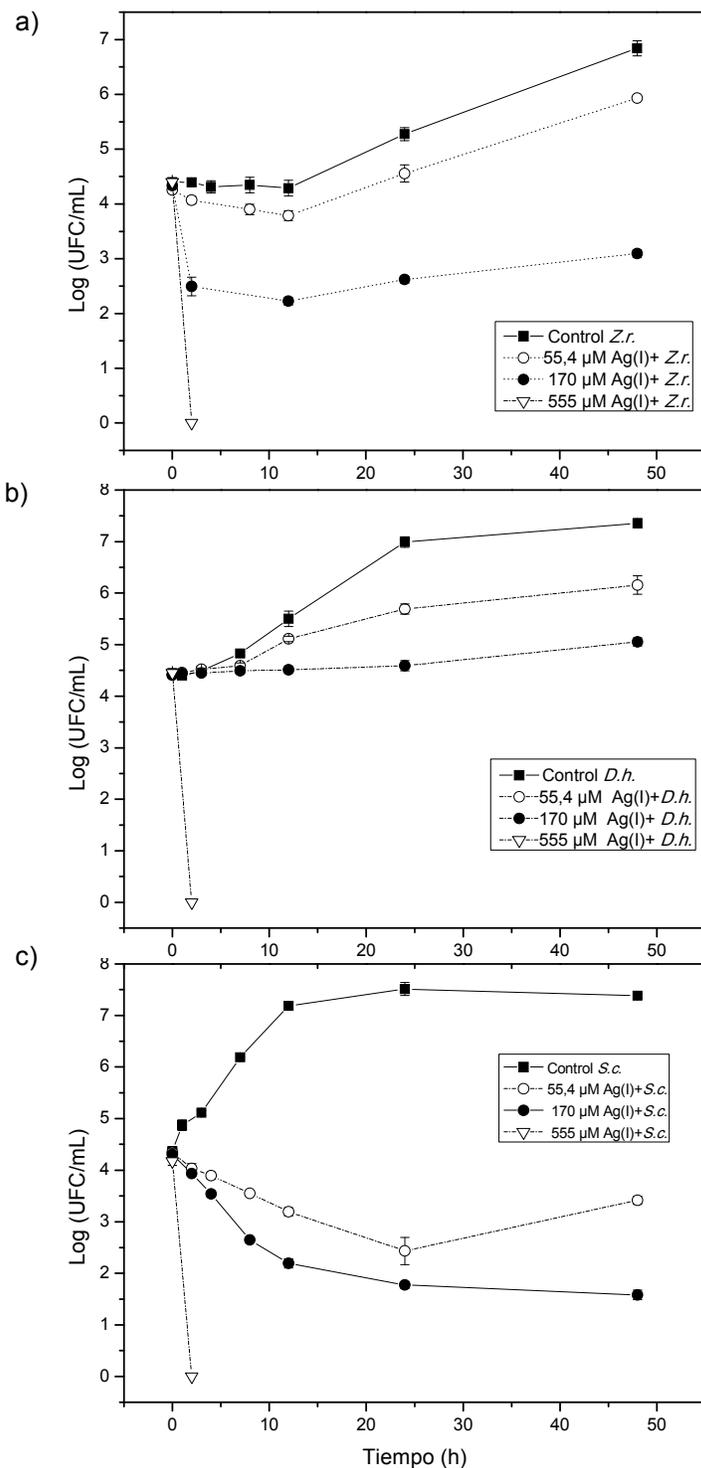
III.2.2.1 Curvas de desarrollo de hongos filamentosos empleando Ag(I) en solución.

En los casos que se utilizó la concentración de 1670 μM de Ag(I) los mohos fueron inhibidos totalmente, por lo que no se presentan las curvas de crecimiento correspondientes. En tanto, el desarrollo de las colonias de *M. circinelloides* y *R. oryzae* (Fig. 7 a y b) empleando una concentración de AgNO_3 de 555 μM , se inhibió totalmente en ambos casos a un $t = 2\text{h}$. Esta reducción de 4 log en el desarrollo de las colonias se consideran valores importantes de inhibición, mientras que las UFC/mL de *G.candidum* (Fig. 7c) lograron descender 3 log a las 48 h de incubación. En este caso la acción inhibitoria fue algo menos efectiva, considerándose 3 log un valor de inhibición medio. Cuando la concentración de Ag(I) empleada fue, ya sea de 170 ó de 55,4 μM , tanto *M. circinelloides* como *R. oryzae* presentaron una inhibición efectiva bajando 4 log tras 48 h. Esto muestra una cinética de inhibición algo más lenta comparando cuando se empleó la solución más concentrada de 555 μM . Sin embargo, fueron muy similares entre sí demostrando una eficacia comparable de la solución más diluida (55,4 μM). En tanto, para *G.candidum*, empleando la solución de 170 ó 55,4 μM , no se observó una acción inhibitoria importante ya que se redujo 1,66 log y 1,35 log tras 48 h de incubación, respectivamente. No obstante en este caso, se nota que el control presentó un crecimiento sostenido de 3,5 log tras 48 h de incubación.



Gráfica 7: Curvas de desarrollo de hongos filamentosos empleando distintas concentraciones de Ag (I) en solución, expresadas en log (UFC/mL) vs. tiempo: a) *Mucor circinelloides* (*M.c.*); b) *Rhizopus oryzae* (*R.o.*); c) *Geotrichum candidum* (*G.c.*).

III.2.2.2 Curvas de desarrollo de levaduras empleando Ag (I) en solución.



Gráfica 8: Curvas de desarrollo de levaduras empleando distintas concentraciones de Ag(I) , expresadas en log (UFC/mL) vs. tiempo (h). a) *Zygosaccharomyces rouxii*, (Z.r.) b) *Debaryomyces hansenii*; (D.h) c) *Saccharomyces cerevisiae*. (S.c.)

Las tres levaduras ensayadas fueron inhibidas totalmente cuando se trabajó a una concentración de 1670 μM de AgNO_3 , por lo que no se presentan las curvas de crecimiento correspondientes. Mientras, a una concentración de 555 μM las tres levaduras presentaron una inhibición total del crecimiento tras 2 h de incubación. Cuando se trabajó con concentraciones de 170 y 55,4 μM , se observó un menor crecimiento con respecto a la curva control para *Z. rouxii* y *D.hansenii* (Gráf. 8 a y b) mientras que para *S.cerevisiae* (Gráf. 8c) presentó un bajo grado de inhibición. No obstante, se notó una mayor sensibilidad para *S. cerevisiae* que exhibió una reducción de 2,72 y 0,93 log a las concentraciones de 170 y 55.4 μM , respectivamente.

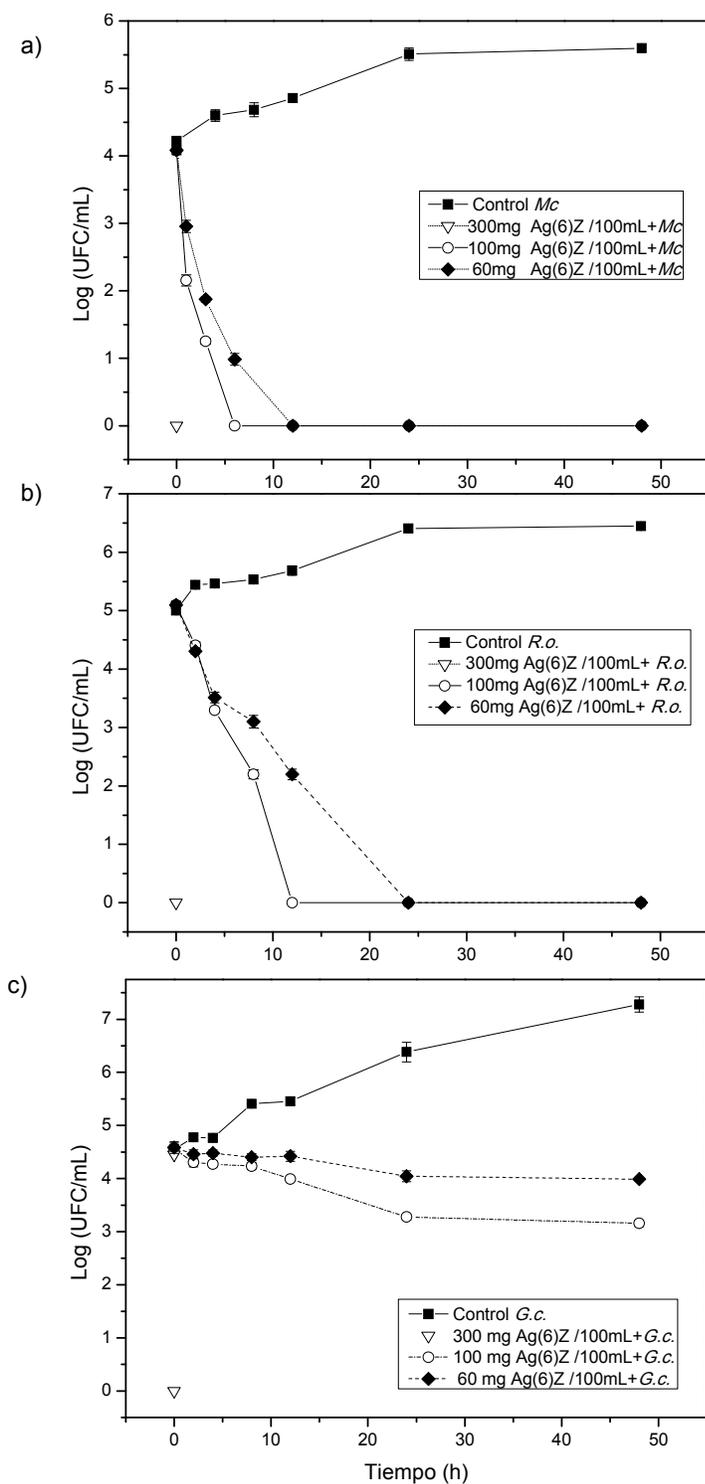
De los resultados anteriores de crecimiento de mohos y levaduras en presencia de distintas concentraciones de AgNO_3 se pudo comprobar que:

- *G.candidum* fue el moho que mayor resistencia presentó frente a la acción del AgNO_3 incluso a una concentración de 555 μM .
- Los mohos, *M. circinelloides* y *R. oryzae*, presentaron una alta sensibilidad a la Ag(I) en solución, que llevó a una inhibición de su crecimiento con la solución más diluida (55.4 μM) tras 48 h de incubación.
- En el caso de las levaduras, la inhibición fue mucho menos efectiva comparado a los mohos. La especie más sensible fue *S. cerevisiae* que presentó una reducción de 2,72 log a una concentración de 170 μM

III.2.3 ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS EMPLEANDO *Ag-MORDENITA*.

Para estos ensayos se trabajó con el sólido conteniendo una concentración intermedia de Ag , esto es con un 5,6% p/p de Ag respecto a la mordenita (Ag(6)Z). Se emplearon masas de este material, de tal forma de obtener cantidades nominales de Ag comparables a las ensayadas con Ag libre en solución. Posteriormente, se presentarán los resultados de caracterización en donde se determinaron los contenidos de Ag incorporados en las diferentes preparaciones de Ag -mordenita.

III.2.3.1 Curvas de desarrollo de hongos filamentosos empleando Ag-mordenita.

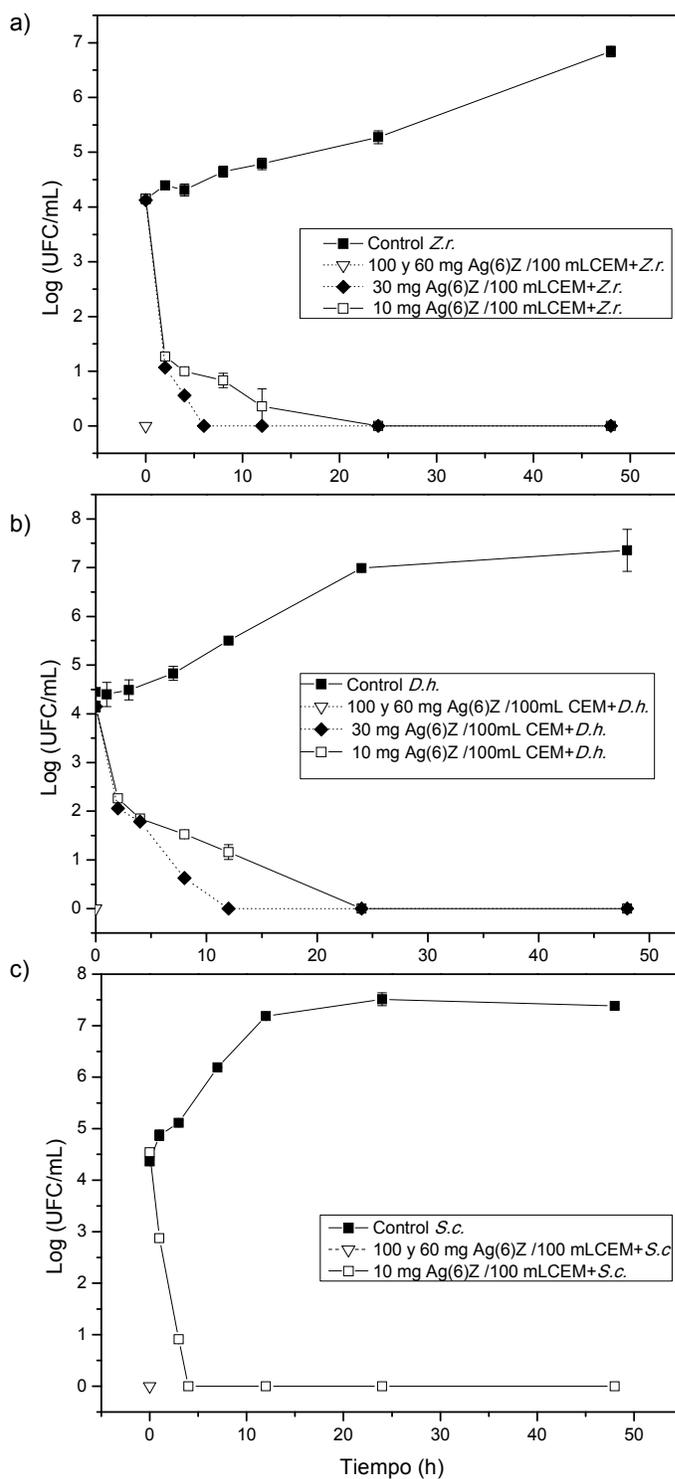


Gráfica 9: Curvas de desarrollo de hongos filamentosos empleando Ag(6)Z, expresadas en log (UFC/mL) vs. tiempo (h): a) *Mucor circinelloides* (M.c.); b) *Rhizopus oryzae* (R.o.); c) *Geotrichum candidum* (G.c).

Se puede observar de las gráficas que los mohos ensayados utilizando 300 mg de Ag(6)Z / 100 mL de CEM fueron inhibidos totalmente a $t = 0$. En tanto las curvas obtenidas empleando una relación Ag(6)Z/medio de cultivo de 100 mg/100mL, muestran una muy buena acción inhibitoria frente a *M. circinelloides* y *R. oryzae* (Gráf. 9 a y b) bajando 4 log a las 6 y 12 h, respectivamente. Esto representa una velocidad de acción mucho mayor que la observada para una cantidad equivalente de Ag(I) libre en solución, mostrando una mayor eficiencia a iguales cantidades del metal para el caso en que este es dosificado por la zeolita. En tanto *G. candidum* (Gráf. 9c) bajó 1,4 log empleando 100 mg de Ag(6)Z tras 48 h demostrando, al igual que el caso de Ag(I) libre en solución, una menor sensibilidad a la Ag de esta especie de moho. Como a la concentración de 100 mg Ag(6)Z/100 mL CEM, se obtuvo una muy buena acción inhibitoria para los Mucorales, se ensayó una concentración menor de 60 mg/100mL CEM. Se puede observar en la gráfica 9 a y b, que tanto *M. circinelloides* y *R. oryzae* presentaron comportamientos semejantes, reduciendo 4 log aunque con menor velocidad, a las 12 y 24 h de incubación, respectivamente

Para el ensayo con *G. candidum* empleando una relación de 60 mg/100 mL CEM sólo se redujo 0,6 log a las 48 h, demostrándose que también para el caso de utilizar Ag-mordenita el crecimiento de *G. candidum* se inhibe poco. Podría inferirse que los mohos tabicados presentan mayor resistencia frente a la acción de la Ag-mordenita que los mohos sin tabicar (Mucorales). Sería necesario estudiar un mayor número de mohos tabicados y sin tabicar para confirmar o no dicha hipótesis.

III.2.3.2 Curvas de desarrollo de levaduras empleando Ag-mordenita.



Gráfica 10: Curvas de desarrollo de levaduras empleando Ag(6)Z, expresadas en log (UFC/mL) vs tiempo (h): a) *Zygosaccharomyces rouxii* (Z.r.); b) *Debaryomyces hansenii* (D.h.); c) *Saccharomyces cerevisiae* (S.c.).

Las levaduras ensayadas utilizando de 300mg de Ag(6)Z / 100 mL de CEM fueron inhibidas totalmente a t=0. En las curvas se puede observar que con relaciones de 100 mg de Ag(6)Z/100 mL de CEM todas las levaduras bajaron 4 log a t=0 demostrando ser mucho más sensibles a la Ag(6)Z que *G. candidum*, microorganismo representante de los mohos. Por lo tanto, se ensayaron menores concentraciones del material Ag(6)Z, como ser: 60, 30 y 10 mg Ag(6)Z/100mL CEM.

En estos ensayos empleando Ag-mordenita, se observaron notables diferencias respecto a los ensayos equivalentes empleando Ag en solución. Se determinó que a una concentración de 60 mg Ag(6)Z /100 mL CEM se ejerce una fuerte acción inhibitoria para todas las levaduras, que fue similar a lo ocurrido empleando una relación mayor de 100 mg Ag(6)Z. Cuando se disminuyó la cantidad a 30 mg Ag(6)Z /100 mL CEM, *Z. rouxii* (Gráf. 10a) logró bajar 4 log a las 6 h presentando una muy buena acción inhibitoria efectiva, mientras que cuando se empleó una concentración de 10 mg Ag(6)Z se redujo 4 log pero a las 24 h de incubación. Cuando se comparan estos efectos con los ocurridos empleando soluciones de AgNO₃ de concentraciones de Ag comparables (55,4 µM) se puede ver que con una cantidad mucho menor de Ag en la Ag-zeolita, se logra un efecto mucho más efectivo.

En el caso de *D. hansenii* (Gráf. 10b) se verificó un comportamiento similar a *Z. rouxii*, inhibiéndose 4 log a las 12 h de incubación con 30 mg Ag(6)Z y con la misma tasa de inhibición para 24 h de incubación pero con 10 mg Ag(6)Z. Se considera que una concentración de 30 mg Ag(6)Z ya presentó una acción inhibitoria efectiva.

Para los ensayos con *S. cerevisiae* (Gráf.10c) empleando la menor cantidad de Ag-zeolita ensayada de 10 mg Ag-Z(6)/100 mL CEM, se logró bajar 4,5 log en 4 h de incubación, lo cual indica una acción inhibitoria fuerte a un menor tiempo con respecto a *Z. rouxii* y *D. hansenii*. Por este motivo, para esta levadura no se ensayó a la concentración de 30 mg Ag-Z(6). Esto contrasta fuertemente con los resultados conseguidos con Ag(I) en solución, que mostró una baja acción inhibitoria tras un periodo de 48 h.

Como resumen de los resultados obtenidos empleando Ag-zeolita se pudo determinar que:

Tanto los hongos y levaduras ensayados se mostraron sensibles a la acción de Ag(6)Z y en todos los casos la acción de la Ag-zeolita fue más efectiva que el equivalente de Ag libre en solución.

- *S. cerevisiae* fue el más sensible de todos los microorganismos ensayados frente la Ag-zeolita, obteniéndose una fuerte y rápida acción inhibitoria empleando tan sólo 10 mg Ag(6)Z tras 4 h de incubación.
- *G. candidum* fue el moho que mayor resistencia presentó frente a la acción de Ag-mordenita.

III.2.3.3 Actividad antifúngica de la matriz Na-mordenita

Los resultados obtenidos con el material zeolítico sin intercambio iónico con plata, es decir Na-mordenita, mostró un comportamiento similar al de las curvas de control con los microorganismos ensayados. Por este motivo, no se graficaron estos resultados y demuestra que el soporte Na-mordenita no presenta acción inhibitoria por sí mismo y que la acción observada, como se verá luego en las caracterizaciones fisicoquímicas, se debe a los iones Ag(+) presentes en la matriz zeolítica.

III.2.3.4 Caracterizaciones fisicoquímicas de Ag-mordenita.

a) *Espectroscopía de Absorción Atómica (AA).*

En la Tabla 11 presentada a continuación se muestran las distintas concentraciones de Ag en la zeolita obtenidas mediante intercambio iónico de Na-mordenita. Estas concentraciones fueron determinadas luego de la digestión de las muestras sólidas, mediante espectroscopía de absorción atómica. Entre corchetes se indican las concentraciones de las soluciones de Ag(NO₃) empleadas para lograr los distintos grados de intercambio de plata. Se puede observar que a

medida que aumentó la concentración de la solución de intercambio, se lograron mayores contenidos de Ag en la zeolita. Simultáneamente, el contenido de Na, que también se determinó por AA, fue disminuyendo. De esta forma, se pudieron obtener sólidos conteniendo entre 3,9 a un 13,6 % p/p de Ag que se denominaron Ag(4)Z, Ag(6)Z, Ag(10)Z y Ag(14)Z.

En la Figura 18, se observa más claramente la tendencia en las concentraciones de Ag y Na en la zeolita de acuerdo a la concentración de la solución de intercambio utilizada. Se nota que la cantidad de Ag que se puede ir incorporando por intercambio a la matriz de zeolita con incrementos proporcionales de Ag en solución de intercambio, va siendo menor a medida que aumenta el contenido de Ag en la zeolita. Esta forma asintótica de la curva muestra que a medida que se incrementa el contenido de Ag en la zeolita, se necesita una mayor fuerza impulsora (concentración de Ag en solución) porque los iones deben ir ubicándose en sitios menos accesibles. En acuerdo con esta tendencia, la cantidad de Na remanente en la zeolita luego de los intercambios, presenta una curva correspondiente pero en sentido inverso.

Tabla 11: Relaciones atómicas de composición y % p/p de Ag y Na contenido en las zeolitas intercambiadas y el soporte sin intercambiar.

	Ag(14)Z [0,1 M]	Ag(10)Z [0,025 M]	Ag(6)Z [0,01]	Ag(4)Z [0,005]	Na-mor
Si/Al^{***}	5,73	6,04	6,87	7,06	7,38
Ag/Al^{***}	1,05	0,84	0,47	0,31	0
Na/Al^{***}	-	0,097	0,041	0,121	0,265
% p/p Ag ^{**}	13,6	10,3	5,6	3,9	-
% p/p Na ^{**}	0,22	1,20	2,32	3,30	4,62
% Intercambio[*]	88,0	64,2	33,1	25,6	0

*** Determinado por EPMA; ** Determinados por AA; * Determinado por AA y cálculos Anexo D.

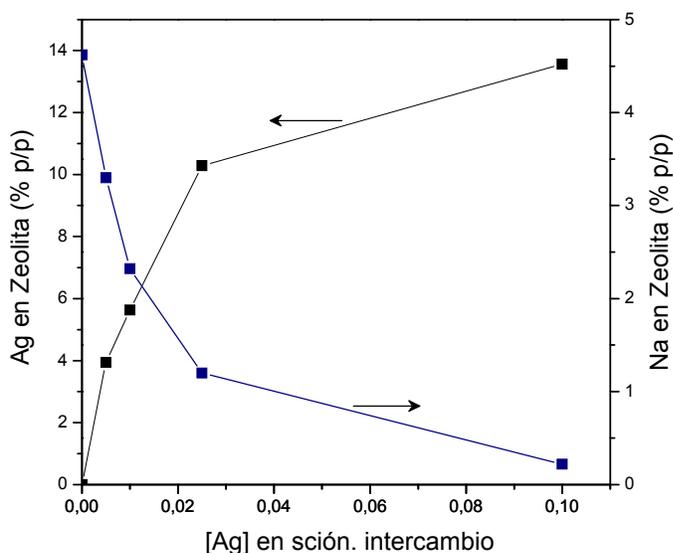


Figura 18: Curva que relaciona la concentración de Ag en solución y el contenido de Ag y Na logrado en la zeolita intercambiada, determinado por AA.

Mediante AA también se siguieron las concentraciones de Ag en el medio de cultivo luego de poner en contacto el mismo por diferentes períodos, con una cierta masa de Ag-mordenita, en particular para las muestras Ag(6)Z y Ag(4)Z. En la Tabla 12 se presentan los resultados para Ag(6)Z obtenidos por duplicado, pudiendo observarse que la cantidad de Ag en solución fue baja y prácticamente no se modificó en el período estudiado. En los primeros instantes de contacto se liberó Ag al medio de cultivo. El ensayo con Ag(4)Z mostró una tendencia similar pero con una concentración que fue unas 3 veces menor que con el sólido anterior.

Tabla 12: Cantidad de Ag liberada al medio de cultivo sin microorganismos en función del tiempo.

Muestra	Tiempo /h				
	0	3	5	9	48
(Ag(6)Z)-a	15	16	13	18	-
(Ag(6)Z)-b	18	-	-	17	17
Ag(4)Z	3	4	8	4	

Los valores de concentración se expresan en ppm.

b) *Análisis elemental por sonda de electrones (EPMA).*

En la Tabla 11, también se presentan las relaciones atómicas relativas entre Si, Al, Na y Ag en las distintas muestras intercambiadas, como así también en el soporte sin intercambiar, determinados por análisis EPMA.

Considerando que la cantidad de aluminio permanece constante en la zeolita, la relación Ag/Al indica la misma tendencia que la determinada por AA, es decir una incorporación gradual de Ag a la matriz de zeolita. Además, a pesar que la señal de este último se vio afectada por señales de background propias del material y dificultaron su cuantificación, fue posible estimar las relaciones Na/Al. Las mismas son concordantes con lo determinado por AA, mostrando una disminución de Na a medida que se intercambia más Ag.

En la Figura 19, se presentan los espectros EPMA obtenidos. Puede verse como aumenta la señal de rayos X provenientes de los átomos de Ag a medida que el contenido de dicho metal es mayor en la zeolita, conforme se aumentó la concentración de la solución de intercambio. Paralelamente, la señal proveniente del Na fue disminuyendo y para la muestra Ag(14)Z ya no se pudo observar. Debe destacarse que si bien por EPMA en esta muestra no se pudo determinar Na, el ensayo de AA muestra una pequeña proporción, que está por debajo del límite de detección de la técnica EPMA. Esto indica que en esta muestra se ha alcanzado un nivel de intercambio muy elevado, pero no total. Por otra parte, las señales en torno a 1,48 y 1,74 keV son del Al y el Si de la zeolita, respectivamente, y no sufrieron cambios durante el proceso de intercambio. No obstante, se debe mencionar que la relación Si/Al estimada para todas las muestras (Tabla 11); disminuye ligeramente a medida que el contenido de Ag es mayor. Esto puede deberse a que en la estimación de la señal de Al influye el background en la zona de bajas energías, que no se observa en la muestra con menor contenido de Na. Por este motivo, se consideró la relación Si/Al de la zeolita como la de la muestra con mayor carga de Ag. Teniendo esta consideración, a partir de la carga de zeolita determinada por AA y la relación Si/Al, se pueden estimar los porcentajes de intercambio (Anexo E), que se indican

en la Tabla 11. Aquí se observa la consistencia entre los resultados de EPMA y AA, mostrando que la muestra con mayor contenido de Ag, no alcanza el 100 % de intercambio.

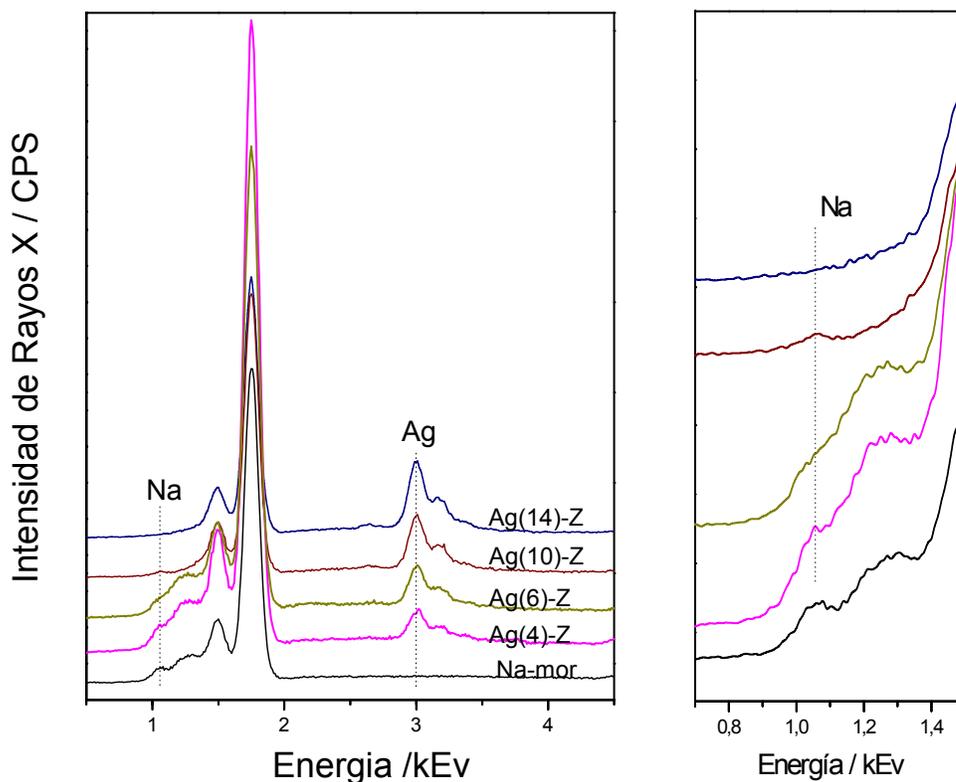


Figura 19: Espectros EPMA de sólidos de Ag-mordenita conteniendo diferentes cantidades de plata.

c) *Difracción de rayos X (DRX).*

Mediante esta técnica se evaluó la estructura cristalina de la zeolita luego del proceso de intercambio y la posible presencia de otras fases, como por ejemplo óxidos de plata. En la Figura 20 se presenta el difractograma obtenido del soporte de Na-mordenita de partida. Se puede ver que se trata de un material puro, dado que se corresponden todas las señales de difracción con las indexadas para esta zeolita (Breck, 1974) y dichas señales son esbeltas y bien definidas, indicando una elevada cristalinidad del material. Por otra parte, cuando la zeolita fue sometida al proceso de intercambio en las condiciones más drásticas, es decir

utilizando la solución de mayor concentración de plata, la estructura cristalina básica de la zeolita se mantuvo constante (Figura 20). No obstante, se observa una disminución de la intensidad relativa de la señal de la zeolita a $2\theta = 9,6^\circ$, correspondiente a los planos (200). Se ha observado en Ag-clinoptilolita una variación en las intensidades relativa de los planos (020) y (200) luego del intercambio con Ag, que se asocian a la naturaleza, posición y cantidad de especies extra-red en los canales de la zeolita (Concepcion Rosabal *et.al.*, 2005).

Además de las señales correspondientes a la estructura de mordenita, fue posible diferenciar en forma clara una única señal a $2\theta = 32,82^\circ$ (Figura 20). Existen varias especies de óxidos de Ag para las cuales se disponen datos de su estructura cristalina, las cuales se resumen en la Tabla 13. En ésta, se presentan las principales señales de difracción de dichos óxidos y su intensidad relativa (entre paréntesis). La señal observada en la muestra Ag(14)Z, se corresponde con la señal principal de Ag_2O (tarjeta JCPDS-ICDD 41-1104), con una intensidad media-baja, lo cual indica la presencia de una pequeña cantidad de dicho óxido en la muestra con mayor carga de Ag.

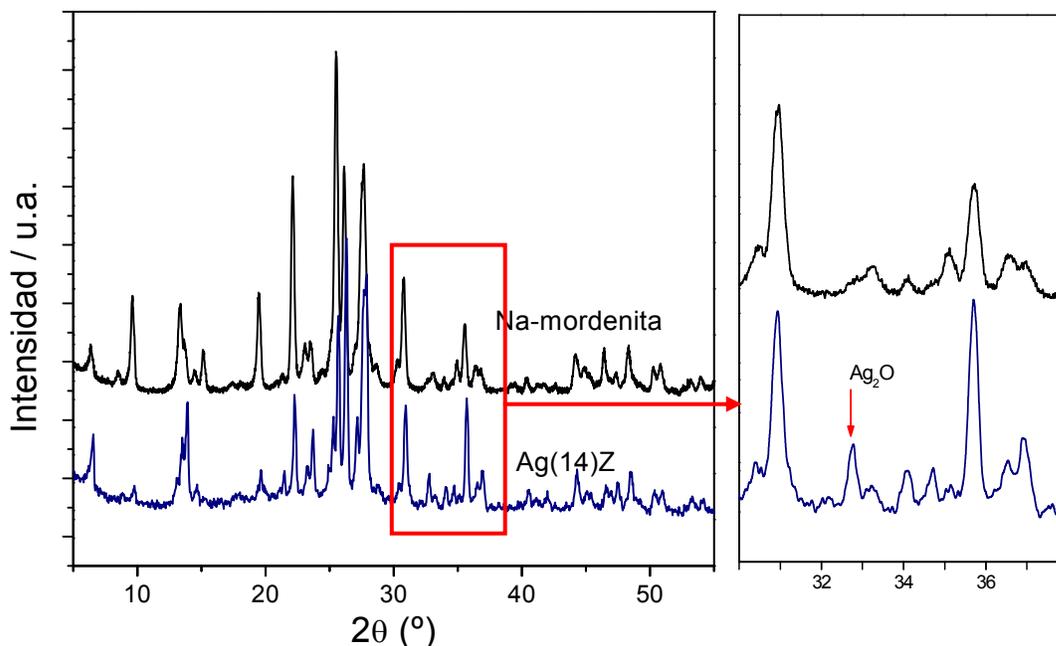


Figura 20: Patrones de difracción de rayos X de Na-mordenita y de Ag(14)-mordenita.

Tabla 13: Señales de difracción de rayos X de diversos óxidos de plata (se indica el ángulo 2θ y su intensidad relativa).

Ag(14)/Z	Ag(0) ⁽¹⁾	Ag ₂ O ⁽²⁾	Ag ₂ O ₂ ⁽³⁾	Ag ₃ O ₄ ⁽⁴⁾	Ag ₂ O ₃ ⁽⁵⁾	AgO ⁽⁶⁾	Ag ₆ O ₂ ⁽⁷⁾
					26,67(100)		
					31,6(100)		
			32,07(47)			32,03(50)	
			32,35(100)	32,67(90)		32,3(100)	
32,75		32,82(100)					
							33,7(20)
34,72			34,2(38)				
					36,6(29)		36,28(23)
			37,2(89)				
	38,15(100)	38,1(28)					
							38,43(100)
	44,3(40)						
					52,8(38)		

(1) JCPDS-ICDD 4- 783, (2) JCPDS-ICDD 41-1104, (3) JCPDS-ICDD 22-472, (4) JCPDS-ICDD 40-909, (5) JCPDS-ICDD 72-607, (6) JCPDS-ICDD 43-1038, (7) JCPDS-ICDD 74-878

d) *Reducción a temperatura programa con H₂ (H₂-TPR).*

La reducción con temperatura programada en una corriente de H₂ diluido al 5 %, puede ayudar a analizar las diferentes especies de Ag que se encuentran presentes en la zeolita. En los perfiles de la Figura 21, se muestran los resultados de H₂-TPR para las 4 Ag-zolitas en estudio y se observa que al aumentar la carga de Ag, el perfil general se mantiene con un incremento en el área de las señales, consistente con el incremento de la cantidad de especies Ag reducibles. En el caso de la muestra con menor contenido de Ag, se observan claramente tres regiones de reducción. La primera (~115 °C) es causada probablemente por la reducción de especies de Ag₂O altamente dispersas en la superficie de los cristales de la zeolita. Esto es compatible con estudios TPR de

mezclas mecánicas de este óxido en forma másica y Na-mordenita, que presentaron una señal en torno de los 170 °C (Aspromonte, 2011).

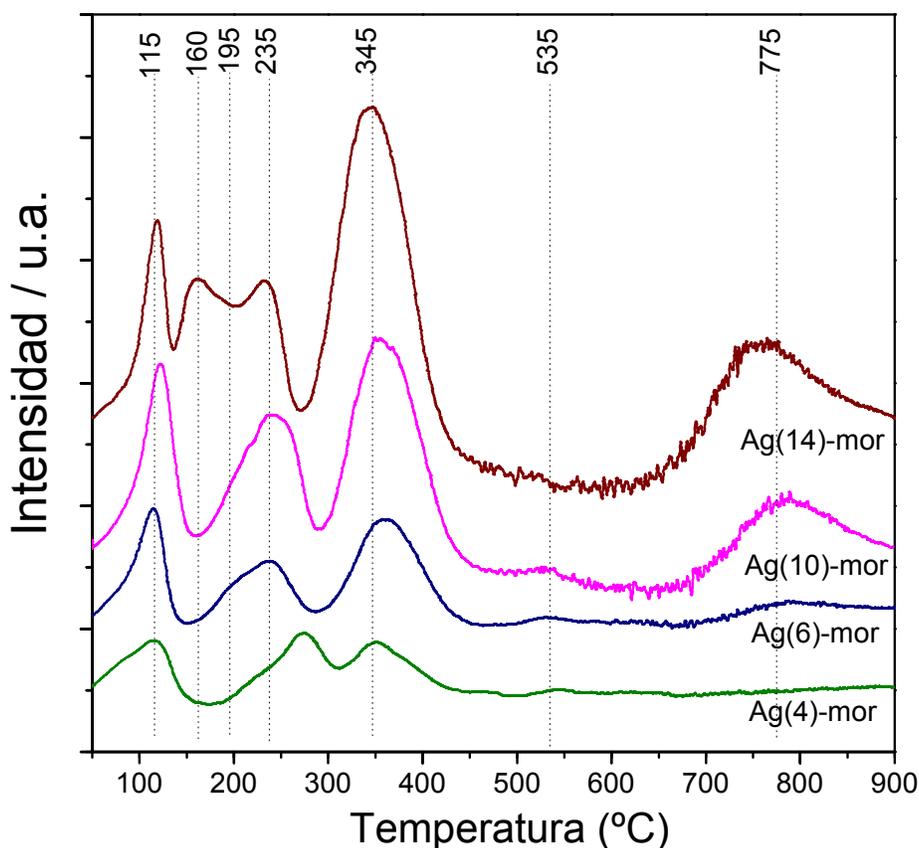


Figura 21: Patrones de reducción H₂-TPR de muestras de Ag-mordenita con diferentes contenidos de plata.

Antes de asignar las otras señales se debe discutir el trabajo de Kaucký *et.al.*, (2008) quienes identificaron tres tipos de sitios de intercambio en mordenita. Cuando la carga del metal es baja los iones ocupan los sitios beta, localizados en el anillo de 8 miembros adyacente al canal principal (Figura 22). Al incrementarse la cantidad del metal, los iones ocupan sitios alfa, ubicados en el canal principal coordinados con oxígenos de la red de zeolita del anillo de 6 miembros. Por último, a cargas elevadas de metal, los iones ocupan los sitios gamma, que están ubicados en cavidades pequeñas de la mordenita. En estos sitios, el metal posee aproximadamente una coordinación octaédrica y es el sitio con más alta coordinación.

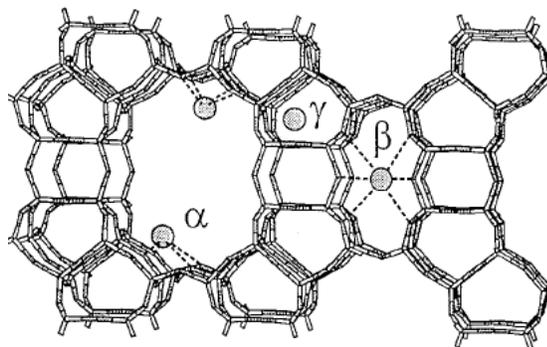


Figura 22: Localización de los sitios α , β y γ en la red de mordenita.

En función de los perfiles de TPR observados en las Ag-zeolitas (Figura 21), las señales centradas a 235 °C se pueden atribuir a especies Ag(+) en sitios alfa, siendo para este metal los primeros en ser ocupados al intercambiar la zeolita con una baja carga de plata. En tanto, la señal centrada a 345 °C se debería a especies Ag(+) en sitios beta algo más estables, con una proporción semejante respecto a las especies alfa para la muestra con baja carga. A medida que el contenido de Ag va siendo mayor, se incrementa la población de especies en sitios beta. Por último, la señal a temperaturas > a 700 °C, se debe a especies Ag(+) en los sitios más estable de coordinación en la zeolita, que son los sitios gamma. En estas ubicaciones los iones Ag(+) interaccionan fuertemente con la estructura de la zeolita y son más difícilmente reducibles. Como se puede notar, estas especies gamma recién comienzan a aparecer en la muestra con 5,6 % de Ag.

Además, en la muestra de mayor contenido de Ag se evidencia otra señal cerca de los 160 °C, que se debería a la aparición de otra población menos dispersa de Ag₂O. Esto es compatible con la disminución de la intensidad de la señal del óxido disperso a 115 °C en la muestra con el mayor contenido de Ag (Figura 21), lo cual es lógico considerando la gran cantidad de Ag presente. Este hecho concuerda con los estudios de DRX de la muestra Ag(14)Z donde se evidenció una señal de dicho óxido.

Como visión general de los perfiles de TPR se puede decir que existen al menos 4 tipos de especies catiónicas con diferente naturaleza y/o interacción con la matriz de la zeolita.

De los ensayos por TPR también se obtuvieron los consumos de totales de H_2 , que como se mencionó, están relacionados directamente con la cantidad de especies reducibles de Ag. Estos se presenta en la Tabla 14, en donde también teniendo en cuenta la masa de material analizado se estimaron % p/p de Ag en la zeolita por TPR. Puede verse una clara compatibilidad con los resultados obtenidos por AA, dado que normalmente no todo el material metálico presente disperso en una zeolita está sujeto de ser reducido. Además, la tendencia en la incorporación de Ag en la zeolita según la concentración de la solución de intercambio sigue la línea del consumo de H_2 (Figura 23), mostrando la buena correspondencia entre los resultados cuantitativos de TPR y AA.

La máxima relación molar entre el H_2 consumido y el contenido teórico de Ag debe ser 0,5 y puede verse en la Tabla 14 que esta relación es cercana a 0,3 y que se incrementa hasta 0,42 para la muestra de mayor contenido de Ag. Esto último puede deberse a que en la muestra con mayor carga una fracción importante del metal se reduce a temperaturas menores a 500 °C lo cual puede catalizar la disociación de H_2 y favorecer una mayor propiedad de reducción de iones $Ag(+)$.

También se analizaron los consumos parciales de H_2 , considerando las señales centradas en torno de 115 °C, 350 °C y 750 °C que fueron obtenidos por deconvolución de las señales de todos los perfiles de reducción (Anexo C). Se nota una incorporación progresiva de Ag en los sitios beta, al igual que en los sitios gamma, aunque para este último se nota una saturación en la muestra con mayor carga que coincide con la disminución en la fracción dispersa de Ag_2O . Esto refuerza la hipótesis de formación de una población menos dispersa de dicho óxido cuando los sitios de intercambio se encuentran cerca de su saturación.

Tabla 14: Consumos totales de H₂ (μmol) de las diferentes muestras de Ag-zeolita y consumo por cantidad Ag en μmol (determinado por AA) en el rango de temperatura analizado por TPR entre temperatura ambiente y 900 °C.

	Ag(4)-Z	Ag(6)-Z	Ag(10)-Z	Ag(14)-Z
μmol total H ₂	3, 22	4, 70	9,93	15,81
Masa sólido (mg)	29,98	30,10	30,83	30,25
μmol Ag	6,45	9,40	19,86	31,61
mg Ag	0,54	0,79	1,66	2,64
% p/p Ag por TPR	2,3	3,4	6,9	11,3
H ₂ total/Ag*	0,29	0,30	0,34	0,42

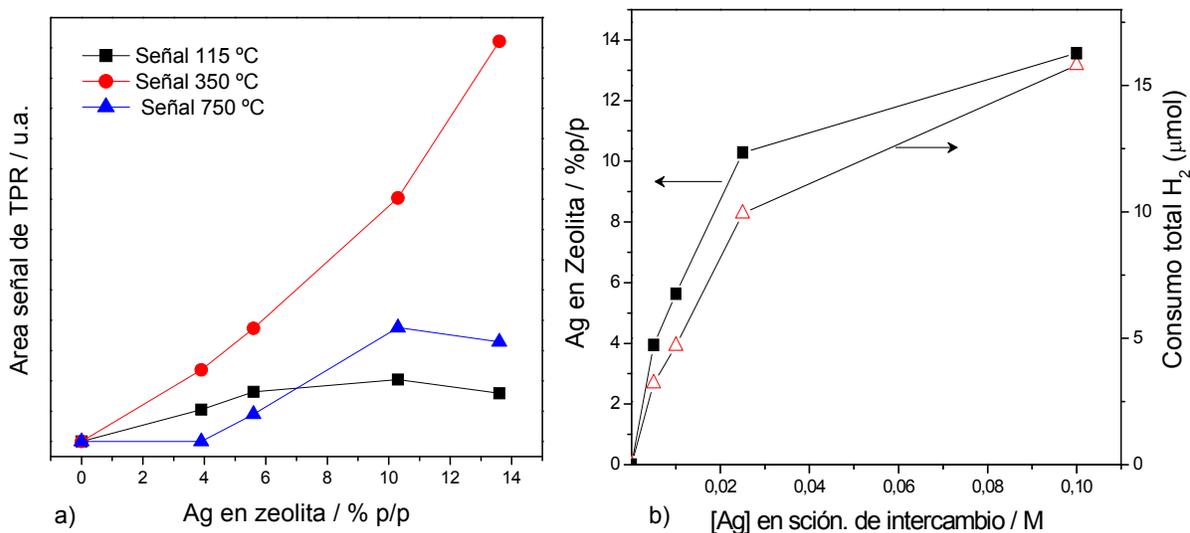


Figura 23: a) Consumos parciales de H₂ en cada región de TPR, respecto de la [Ag] en la zeolita; b) Carga % p/p de Ag en zeolita según AA y consumo de H₂ determinado por TPR, respecto a la [Ag] en la solución de intercambio.

III.2.3.5 Acción de Ag-mordenita contra los microorganismos.

De las caracterizaciones fisicoquímicas se verificó que el material preparado Ag(6)Z, está compuesto de diversas formas de especies catiónicas de Ag(I), incorporadas en la matriz zeolítica y en interacción con ésta. Dicha matriz, conserva su microestructura por lo que dichos iones pueden difundir a través de los poros de la zeolita al medio líquido y/o a las paredes celulares de los microorganismos. La diversificación de especies de Ag puede ser beneficiosa para una dosificación paulatina y controlada de iones Ag(I) al medio, liberándose algunas especies más rápido y otras con un mayor retardo. Esto ampliaría el período de efectividad. Se ha propuesto (Inoue, *et.al.*, 2002) que Ag-zeolitas en contacto con agua destilada liberan una muy baja o nula cantidad de Ag, necesiéndose que estén presentes iones en el medio de cultivo. El CEM utilizado en los ensayos antifúngicos, es un medio de cultivo complejo y sus componentes (sales) pueden intervenir en el mecanismo de intercambio de la Ag ocluida en la zeolita. Sin embargo los ensayos de Ag(6)Z en CEM mostraron una baja proporción de Ag.

Por otra parte, Matsumura, *et.al.* (2003) determinaron que la liberación de Ag a un medio de cultivo es mucho más acusada en presencia de un microorganismo (bacteria), con lo cual la acción de la Ag sería más directa, necesitando del contacto entre Ag-zeolita y el microorganismo. Esto también es soportado por los estudios de Ishitani, *et.al.* (1995) y de Kwakue-Awuah, *et.al.* (2007), quienes determinaron que la cantidad de Ag liberada por una Ag-zeolita al medio puede variar según el microorganismo. En nuestro caso, una interacción Ag-mordenita/microorganismo podría ser inducida por las cargas eléctricas en las superficies de ambos materiales. Ha sido determinado que el potencial Z de mordenita presenta valores (-) que decrece a menores pH mientras que las paredes de las bacterias también pueden poseer débiles cargas (-) (Kubota, *et.al.*, 2008). A pesar de esto, se ha demostrado que en condiciones ligeramente ácidas o neutras, se pueden dar interacciones bacteria-zeolita ocurriendo una adsorción entre éstas. En esto inciden las características del exterior de las paredes

celulares. Las bacterias Gram (-) están compuestas de lipopolisacáridos, mientras que las Gram (+) por capas de peptidoglicano. Entonces, se sugirió que las Gram (-) pueden aproximarse a las zeolitas, pero no se unen o adsorben sobre éstas ya que la afinidad entre el lipopolisacárido de la célula y la superficie de la zeolita es muy débil (Kubota, *et.al.*, 2008). La adsorción bacteria-zeolita se ha explicado principalmente debido a interacciones de la doble capa eléctrica y también a interacciones hidrofóbicas. Es posible que estos factores jueguen un papel en la adhesión de la Ag-mordenita y la pared de los hongos estudiados, que también presentan diferencias entre sí.

Dadas las condiciones de preparación de la Ag-mordenita y sus características fisicoquímicas como así también las condiciones de los ensayos microbiológicos con bajo tenor de oxígeno, es plausible que la acción inhibitoria observada se deba a la acción de formas catiónicas de Ag liberadas directamente a la paredes celulares de los mohos y levaduras. Para bacterias, se ha propuesto que los iones Ag(I) tienen afinidad por los grupos sulfhidrilo expuestos en las paredes de las bacterias y el grupo estable resultante S-Ag inhibe la transferencia de H₂ (sistema de transferencia de energía) (Davies y Etris, 1997).

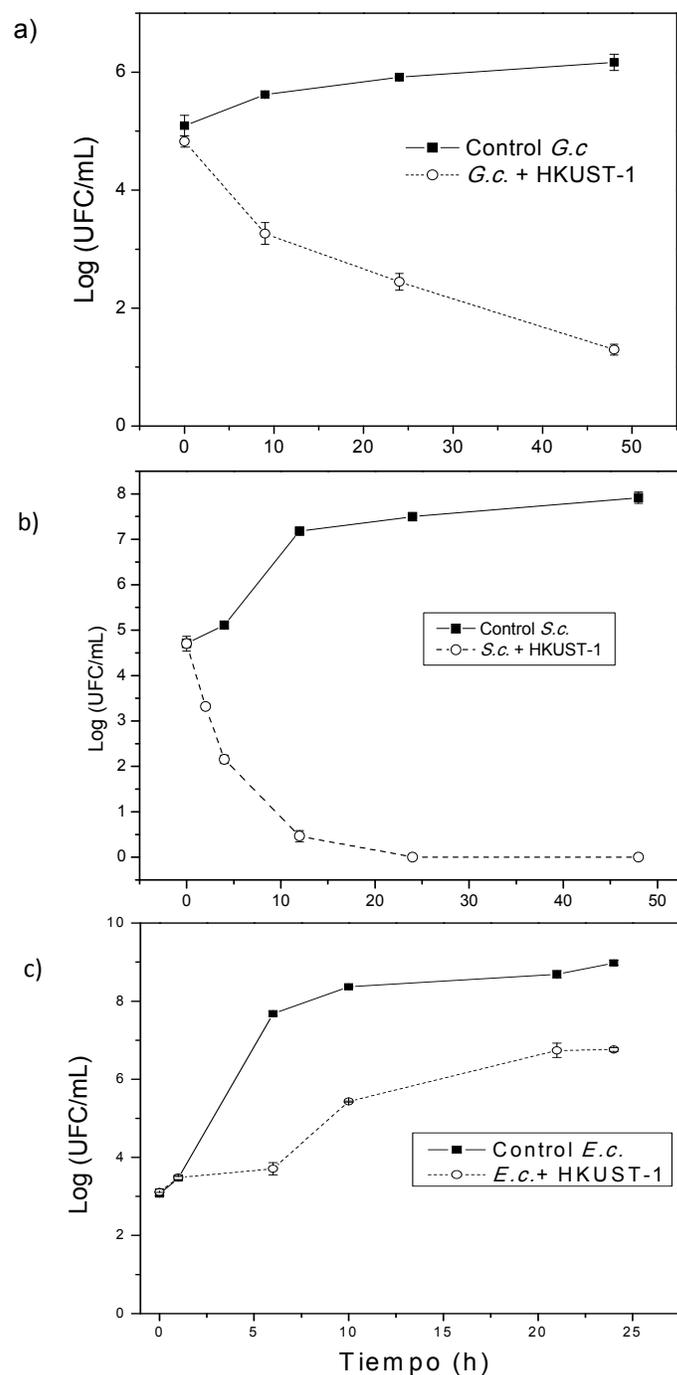
La influencia de iones Ag contra hongos es diferente. Estos microorganismos necesitan de bajas concentraciones de algunos iones como Cu y Zn para su crecimiento y tienen que ser transportados a través de su sistema de ingreso de iones. Este mecanismo de ingreso también podría ocurrir en el caso de los iones Ag(I), que presenta un radio atómico similar a los anteriores y tiene una mayor electronegatividad, aunque existe muy poca información sobre el mecanismo de acción de Ag en hongos, como así también las diferentes sensibilidades mostradas entre diferentes hongos. Tampoco es el objeto de estudio en esta Tesis. Se ha planteado que existe una gran variabilidad en la respuesta de hongos y levaduras a biocidas, siendo generalmente los hongos más resistente que las bacterias no esporuladas (excepto Mycobacteria) a dichos agentes (Russell *et.al.*, 1999).

En vista del efecto antifúngico notablemente más acusado para la Ag-zeolita respecto a iones Ag en solución, se puede suponer una mayor interacción

entre Ag-zeolita y la pared del hongo. Esta interacción además, permite una acción más directa hacia la pared celular haciendo más eficiente el efecto de los iones Ag dosificados por la zeolita. En tanto los iones Ag libres en solución en un medio de cultivo complejo como el CEM pueden ser acomplejados. De hecho, diferentes aminoácidos como L-cisteína, L-metionina, L-histidina, L-triptofano, albúmina pueden inhibir la acción de la Ag (Matsumura *et.al.*, 2003). Por lo tanto, además es posible que la menor acción de AgNO₃ contra los hongos se relacione con una menor cantidad de Ag(I) biodisponible para interactuar con estos microorganismos.

III.2.4 ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS EMPLEANDO HKUST-1.

III.2.4.1 Evaluación de la capacidad antimicrobiana del HKUST-1



Gráfica 11: Curvas de desarrollo de los microorganismos empleando HKUST-1, expresados en log (UFC/mL) vs. Tiempo (h) a) *Saccharomyces cerevisiae* (*S.c.*); b) *Geotrichum candidum* (*G.c.*); c) *Escherichia coli* (*E.c.*).

La gráfica 11 muestra las curvas de crecimiento para los tres microorganismos en el medio de cultivo adicionado con HKUST-1 empleando una relación de 100mg de MOF /100 mL de medio de cultivo. También se presentan las curvas de control sin agregado de HKUST-1.

En las curvas obtenidas empleando HKUST-1, puede observarse una actividad biocida remarcable contra hongos, siendo más sensible *S. cerevisiae* y alcanzando una rápida reducción en las colonias viables (Gráf. 11b). Luego de 24 h de incubación se observó una inhibición total del crecimiento, mientras que las colonias de control alcanzaron 7,5 log (UFC mL⁻¹). Para *G. candidum* (Gráf. 11a) también se observó un fuerte efecto de inhibición que se incrementó con el tiempo de incubación. Se observó una reducción de 3,9 log en el desarrollo de dicho microorganismo luego de 48 h de incubación. El marcado perfil logarítmico decreciente de las curvas de crecimiento obtenidas con la adición de HKUST-1 tanto para *S. cerevisiae* como para *G. candidum*, indica un fuerte efecto inhibitorio causado por el MOF. En tanto para *E. coli* (Gráf. 11c) no se observa una inhibición importante, pero sí un efecto bacteriostático a las 6 h de incubación.

III.2.4.2 Evaluación de la capacidad antimicrobiana del Ácido Trimesico (BTC).

Los resultados obtenidos con el ácido trimésico presentaron comportamientos similares a las curvas de control de los microorganismos ensayados motivo por el cual no fue necesario graficarlas. Esto demuestra que el ácido trimésico no presenta acción inhibitoria por sí sola.

En vista de establecer una correlación entre los efectos observados y las propiedades del sólido a continuación se condujeron estudios fisicoquímicos.

III.2.4.3 Caracterizaciones fisicoquímicas del HKUST-1

a) Difracción de rayos X (DRX)

La Figura 24a muestra el patrón de difracción de rayos X de HKUST-1 simulado a partir de los datos cristalográficos (CCDC112954) y se puede observar

que el material sintetizado (Figura 24b) presentó todas las señales de difracción indexadas para HKUST-1 (Chui *et.al*, 1999). La menor intensidad relativa de la reflexión (002) con respecto a la de (222) en comparación con las del patrón simulado, es debida a una hidratación parcial de HKUST-1 (Schlichte *et.al.*, 2004). Además, la superficie específica BET y el volumen de microporos (a partir de las isothermas de adsorción de N₂ fueron 608 m²/g y 0,253 cm³/g, respectivamente, lo que indica una correcta evacuación disolvente que deja accesible la porosidad MOF. Mientras tanto, los patrones de DRX del MOF luego de estar en contacto por 24 y 48 h con CEM (Figura 24c y d) mostraron una disminución en la intensidad de todas las señales, lo cual aumenta con el tiempo de contacto, e indica una pérdida gradual de la cristalinidad del MOF (Tabla 15). Debe tenerse en cuenta que ninguna de las muestras analizadas presentaron señales DRX obvias de CuO o Cu₂O másico, que podrían ser posibles sub-productos de la degradación del MOF.

Tabla 15: Resultados de estudios fisicoquímicos mediante XRD, AAS y XPS de muestras de HKUST-1 fresca y sometidas a ensayos de estabilidad química.

Muestra	Cristal. Rel. (%) ^a	[Cu] en sol. (ppm) ^b	Cu2p _{3/2} /Cu2p _{3/2} sat. ^c	Rel. Cu(II)/Cu(I) ^d
HKUST-1	100	-	4,2	∞
HK-24	70	183	9,1	3,7
HK-48	48	184	7,7	2,9

- a. La cristalinidad de los sólidos usados se calculó considerando los picos principales de difracción y tomando 100% para el MOF recién sintetizado.
- b. Determinado por AA luego del filtrado de la suspensión MOF/CEM.
- c. Relación entre la señal del pico Cu2p_{3/2} y su pico satélite.
- d. Relación superficial de Cu(II)/Cu(I) calculada de las señales XPS.

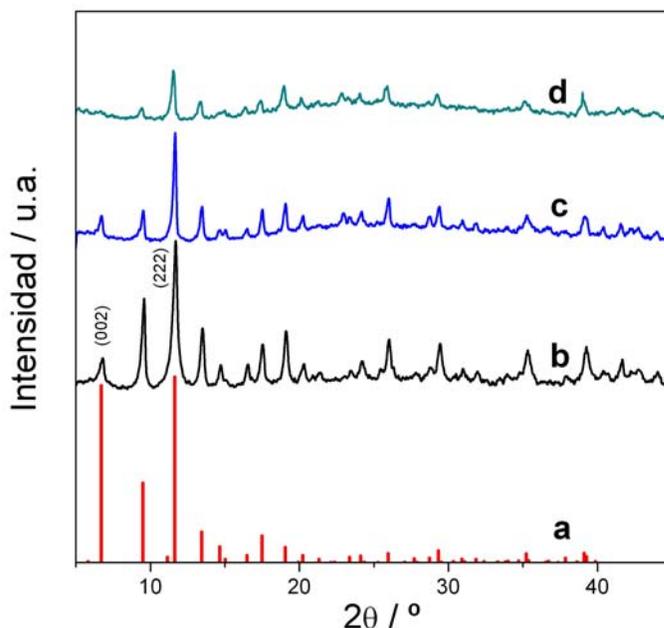


Figura 24: Patrones de difracción de rayos X. a) patrón simulado a partir del archivo cristalográfico CCDC de HKUST-1; b) HKUST-1 recién sintetizado; c) HKUST-1 luego de 24 h en contacto con CEM, d) HKUST-1 luego de 48 h en contacto con CEM.

b) Espectroscopía de absorción atómica (AA).

Los análisis de los filtrados de las muestras en contacto con el medio de cultivo, indicaron una lixiviación de Cu desde el MOF que alcanzó una concentración constante luego de 24 h (Tabla 15). Sin embargo, para una muestra MOF mantenida en agua destilada durante 48 h, la cantidad de cobre disuelto fue mucho menor (39 ppm). La mayor degradación MOF en CEM puede estar relacionada con ciertos componentes del medio de cultivo que promueve la disolución del material.

c) Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS)

El espectro de XPS de HKUST-1 fresco (Figura 25) presentó dos señales principales de niveles Cu $2p_{3/2}$ y Cu $2p_{1/2}$ a energías de enlace (EE) de 933,6 y 953,4 eV, respectivamente, que son características de Cu (II). Además, la presencia de picos satélites en el espectro confirma la presencia de esta especie (Chanquia *et.al.*, 2010; Biesinger *et.al.*, 2010). Mientras que para las muestras

puestas en contacto con el medio de cultivo (HK-24 y HK-48), las señales 2p fueron más angostas (es decir, que disminuyó el ancho a la altura media, FWHM) y las intensidades de los picos satélite se redujeron. Se conoce que las señales 2p del Cu (I) son más angostas que las de Cu (II) y también que el Cu (I) no tiene picos satélite (Biesinger *et.al.*, 2010).

Las proporciones más altas de la señal de $2p_{3/2}$ y su pico satélite para las muestras usadas (Tabla 15) junto con el estrechamiento de sus señales 2p, indican la presencia de Cu (I) en la superficie del MOF. De hecho, las bandas que se encuentran cerca de 933 y 952 eV son típicas de Cu (I). Por otra parte, se observó un mayor enriquecimiento de Cu (I) en la superficie para la muestra HK-48 (Tabla 15).

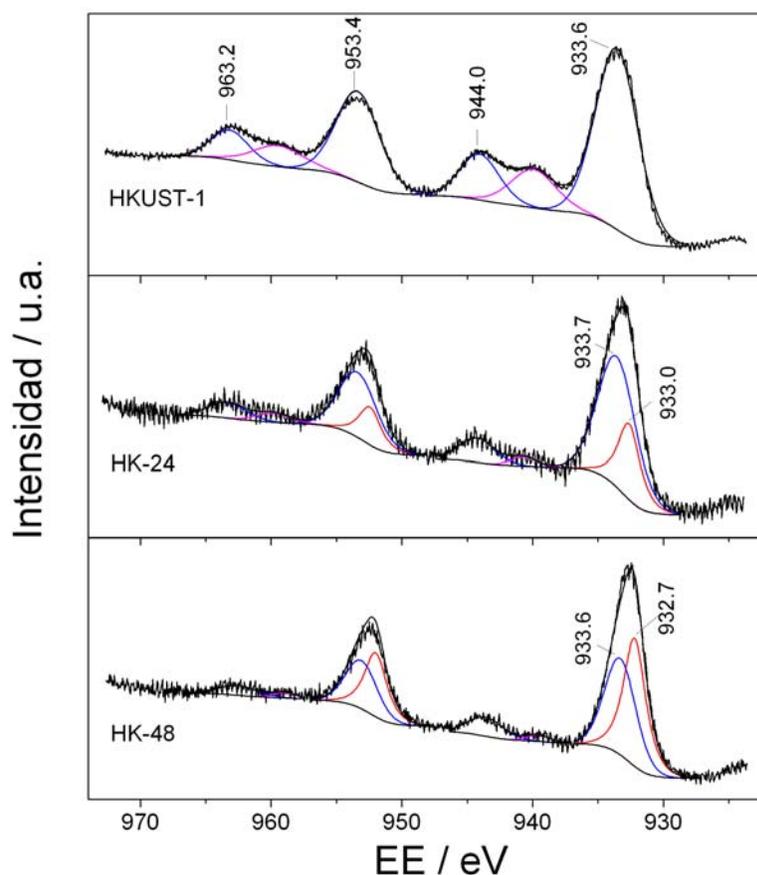


Figura 25: Análisis espectroscópico por XPS de muestras fresca y usadas de HKUST-1. Espectros procesados en la región Cu2p.

d) Espectroscopía Laser Raman (LRS)

La presencia de Cu(I) en las muestras usadas fue confirmada por LRS (Fig. 26). A pesar de la alta fluorescencia debido a los residuos orgánicos, se observó la señal Raman típica del sobretono de segundo orden de Cu_2O a 220 cm^{-1} (Solache-Carranco *et.al*, 2009). Además, se observó una marcada disminución de las señales del MOF debido a una pérdida de la integridad estructural. Los modos de vibración de Cu(II) en el MOF (504 cm^{-1} ; $200\text{-}170\text{ cm}^{-1}$) y de flexión (C-H) fuera del plano del anillo (746 cm^{-1} ; 829 cm^{-1}) (Prestipino *et. al.*, 2006), se redujeron.

La generación de tales especies de Cu (I) fue probablemente causada por componentes reductores en el medio de cultivo, tales como azúcares. Además, la baja presión parcial de O_2 en las condiciones de ensayo podría contribuir a la estabilidad de esta especie. Entonces, La presencia de este cobre extrared en la estructura amorfizada del MOF está disponible para ser liberado al medio de cultivo, según lo determinado por AA.

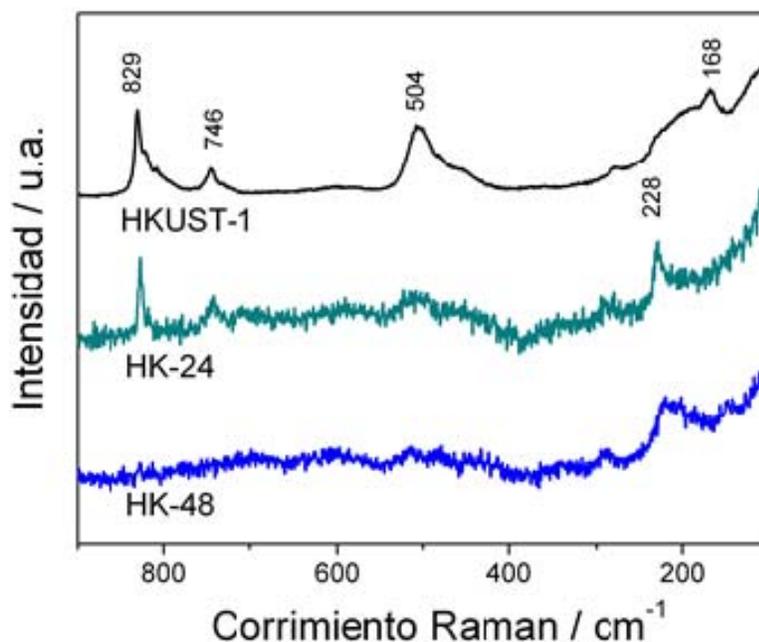


Figura 26: Espectros Laser Raman de muestra fresca y usada de HKUST-1

e) *Microscopía electrónica de barrido (SEM) y Microanálisis químico elemental de rayos X por sonda de electrones (EPMA)*

Los cristales de MOF recién sintetizados (Figura 27a) mostraron una morfología poliédrica típica con una superficie lisa (Gascon *et.al.*, 2008). Mientras tanto, después de haber sido utilizado durante 24 h en los ensayos microbiológicos, se observó una superficie erosionada, con cráteres que penetraron en el cristal (Figura 27b). Por otro lado, el análisis EPMA en pequeñas áreas seleccionadas sobre los microorganismos, como se muestra por *S. cerevisiae* (Figura 27c), reveló la presencia de Cu en la célula. Además, también se observó S y P proveniente de los componentes celulares (Figura 27d).

Se sabe que los iones de Cu pueden unirse a las paredes celulares de los hongos, interrumpiendo el transporte de nutrientes e inhibiendo las enzimas intracelulares (Freeman *et.al*, 2008). Además, las paredes fúngicas difieren entre ellas en función del grupo taxonómico (Gonzalez *et.al*, 2009) lo cual puede explicar la sensibilidad variable de *S. cerevisiae* y *G. candidum* frente a HKUST-1.

En cuanto a la acción antibacteriana del HKUST-1 se conoce que el cobre tiene una acción muy similar a la plata, aunque la acción del cobre depende mucho del género, especie y cepa en estudio como así de las condiciones ambientales en que se lleva a cabo el ensayo (Ruparelía *et.al.*, 2008; Malachová *et.al.*, 2011).

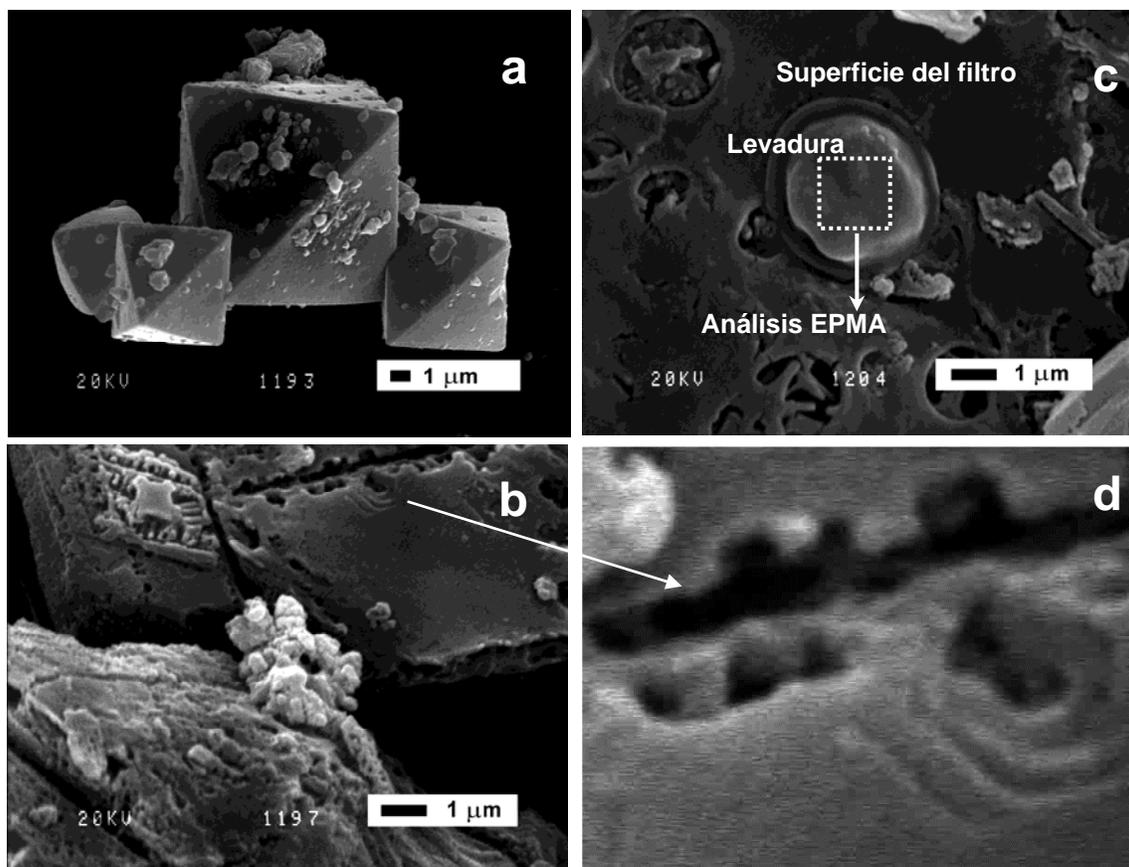


Figura 27: Imágenes SEM de HKUST-1 (a) cristales de HKUST-1 recién sintetizados; (b) cristales de HKUST-1 recuperados luego de 24 h del ensayo microbiológico; (c) espécimen de *S. cerevisiae* luego de 24 h del ensayo microbiológico con HKUST-1; d) ampliación de superficie del cristal usado.

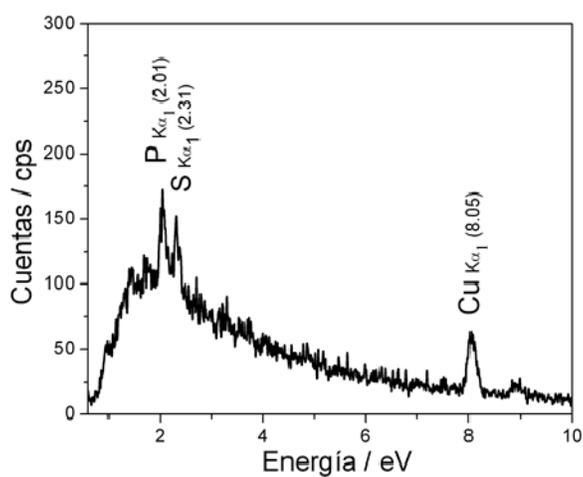


Figura 28: Análisis EPMA efectuado en una pequeña área seleccionada sobre *S. cerevisiae* luego del ensayo con HKUST-1 (indicado en la Figura anterior).

En función de los ensayos microbiológicos y las caracterizaciones fisicoquímicas realizadas se demostró que HKUST-1 es un material que ejerce una fuerte actividad inhibitoria frente al crecimiento de *S. cerevisiae* y *G. candidum*. La actividad antifúngica es debida a la habilidad del MOF de liberar iones a partir de su propia estructura, la cual se degrada lentamente produciendo Cu(I) extrared en la superficie. La posibilidad de regulación de conectividad y tipos de enlaces en los MOFs indican el potencial empleo de otros MOFs basados en cobre para un control de la velocidad de liberación de iones Cu biológicamente activos.

CONCLUSIONES

Se aislaron e identificaron las especies fúngicas de *Rhizopus oryzae*, *Mucor circinelloides* y *Geotrichum candidum*, obtenidas a partir de productos lácteos que desarrollan a baja tensión de oxígeno. Se reactivaron las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces rouxii* y *Debaryomyces hansenii*. Estas cepas presentan relevancia, puesto que son contaminantes habituales de alimentos, obtenidas de jugos de frutas de industrias de nuestra región.

Se determinaron las curvas de crecimiento de las distintas cepas, identificándose el final de las fases de crecimiento exponencial tardío y el comienzo de la fase exponencial estacionaria. Con esto, se fijaron los tiempos adecuados de cosechas de conidias y células de levaduras para realizar los ensayos antifúngicos.

Se efectuaron ensayos antifúngicos empleando soluciones de nitrato de plata, para analizar el efecto del ión metálico libre en solución y posteriormente compararlo con dicho metal incorporado en la zeolita. Se encontró que si bien la Ag(I) en solución presenta en general un efecto inhibitorio del crecimiento, existe una variabilidad según las características de cada especie:

- *G.candidum* fue el moho que mayor resistencia presentó frente a la acción de AgNO₃ incluso a concentraciones de 555 µM.
- *M. circinelloides* y *R. oryzae*, presentaron una alta sensibilidad a la Ag en solución, que llevó a una inhibición de su crecimiento con la solución más diluida empleada 55.4 µM, tras 48 h de incubación.
- La inhibición de las levaduras fue mucho menos efectiva comparada a los mohos. La especie más sensible fue *S. cerevisiae* que redujo su desarrollo en un 99.8 %, empleando una concentración de 170 µM de AgNO₃.

Se prepararon satisfactoriamente materiales microporosos conteniendo Ag y Cu dispersos en su estructura, para ser ensayados como biocidas contra los mohos y levaduras estudiados. Estos fueron Ag-mordenita y la red organometálica

(MOF) HKUST-1, los cuales se analizaron en sus características fisicoquímicas mediante diversas técnicas de caracterización para conocer sus cualidades estructurales y químicas. En las condiciones de preparación de Ag-mordenita, se obtuvo un material que presentó una acción muy efectiva contra los distintos microorganismos. Esta, presentó formas catiónicas de Ag dispersas que pueden ser dosificadas hacia los microorganismos en un medio de cultivo como CEM. Los resultados se aplican a las condiciones de ensayo empleadas (bajo tenor de oxígeno en este medio de cultivo y con los microorganismos ensayados). Se observaron los siguientes efectos antifúngicos:

- Na-mordenita no presenta acción inhibitoria por sí misma y la acción observada en Ag-mordenita se debe a los iones Ag^{+} que son dosificados por la matriz zeolítica.
- Todos los hongos y levaduras se mostraron sensibles a la acción de Ag-mordenita y en todos los casos la acción fue más efectiva que el equivalente de Ag libre en solución (AgNO_3). Esta mayor efectividad fue mucho más acusada para el caso de las levaduras.
- Las levaduras resultaron más sensibles a la Ag-mordenita que los mohos.
- *S. cerevisiae* fue el más sensible de todos los microorganismos ensayados frente la Ag-mordenita, obteniéndose una fuerte y rápida acción inhibitoria tras 4 h de incubación empleando tan sólo 10 mg de Ag_6Z .
- *G. candidum* fue el moho que mayor resistencia presentó frente a la acción de la Ag-mordenita.

Se sintetizó la red organometálica (MOF) HKUST-1 conteniendo iones de Cu en su estructura y que fue empleada satisfactoriamente como material biocida. Se determinó que HKUST-1 presenta una buena acción inhibitoria contra mohos y levaduras, pero que ejerce poco efecto contra *E. coli* (organismo procarionta). Los

resultados demostraron por primera vez la potencialidad del empleo de un MOF basado en cobre como un biocida que permite una dosificación de iones Cu biológicamente activos.

- HKUST-1 mostró un fuerte efecto antifúngico contra *S. cerevisiae* cuyo crecimiento fue completamente inhibido tras 24 h de incubación y también contra *G. candidum* que redujo sensiblemente las colonias viables respecto al control en un 99,98% tras 48 h de incubación.
- Contra *E. coli* (organismo procarionta) se observó un bajo efecto inhibitorio, presentando una acción bacteriostática a bajos tiempos de incubación (6 h).
- La acción del material se asocia a una degradación progresiva de su estructura en el medio de cultivo, que involucra la formación superficial de Cu_2O y la subsiguiente liberación iones Cu que ejercen el efecto antimicrobiano.

ACTIVIDADES FUTURAS

Las actividades realizadas en esta Tesis alientan a continuar investigando el empleo de este tipo de materiales microporosos como agentes antifúngicos. Se plantean una serie de cuestiones y actividades de interés, que se derivan concretamente de los resultados alcanzados:

Preparar y estudiar otras Ag-zeolitas empleando matrices más hidrofóbicas (ZSM-5) y también más hidrofílicas (Zeolita Y) que la mordenita. Esto puede tener un efecto en la adsorción e interacción con las paredes de los mohos y levaduras estudiados.

Explorar la acción antifúngica de un MOF basado en Zn, que es otro metal con actividad biológica, considerando la síntesis de dicho Zn-MOF por ej. ZIF-8.

Trasladar los materiales microporosos a formas estructuradas como ser:

- Desarrollar, caracterizar y evaluar superficies antifúngicas basadas en recubrimientos de Ag-zeolita o HKUST-1 sobre materiales de uso habitual en equipos de la industria de alimentos como acero inoxidable y otros empleados en los envases de alimentos (plásticos, tetrapack).
- Desarrollar materiales compuestos de tipo polímero/Ag-zeolita y polímero/MOF mediante la conformación de una matriz polimérica (polímeros solubles tipo polisulfona y poliimida) y una fase de Ag-zeolita o MOF dispersa en ésta.

Combinar los materiales anteriores y/o películas de los mismos, de forma que liberen simultáneamente Cu, Zn y Ag y otorguen mayor espectro y/o tiempo de acción antimicrobiana.

BIBLIOGRAFIA

Alexopoulos, C.J. (1996). Introductory mycology 4 ed.. John Wiley & sons, Inc., Nueva York, E.U.A.

Aspromonte S. G.; Serra R. M.; Miró E. E.; Boix A.V. (2011). AgNaMordenite catalysts for hydrocarbon adsorption and deNOx processes. Applied Catalysis A: General 407: 134-144

Auerbach, S.M.; Corrado K.; Dutta P. (2003). Handbook of Zeolite Science and Technology. Marcel Dekker Inc. New York.

Basilico, J.C; Chiericatti, C.; Zapata, M.Z.; Vinderola, G. (2001). Characterization and control of thread mould in an Argentinean cheese factory. Letters in Applied Microbiology, 32: 419 – 423.

Basilico, M.Z. (2005). Prevención y control de hongos en la industria y los alimentos. Disertación en X Congreso Argentino de Micología. Buenos Aires, 22-25 mayo.

Berchel, M.; Le Gall, T.; Denis, C.; Le Hir, S.; Quentel, F.; Elleouet, C.; Montier, T.; Rueff, J.M.; Salaun, J.Y.; Haelters, J.P.; Hix, G.B.; Lehn, P.; Jaffres, P.A. (2011). A silver-based metal–organic framework material as a ‘reservoir’ of bactericidal metal ions. New Journal Chemical. 35: 1000–1003.

Bhabra, G.; Sood, A.; Fisher, B.; Cartwright, L.; Saunders, M.; Evans, W.H.; Case, C.P. (2009). Nanoparticles can cause DNA damage across a cellular barrier. Nature nanotechnology, 4(12), 876.

Biesinger, M. C.; Lau, L. W.; Gerson, A. R.; Smart, R. S. C. (2010). Resolving surface chemical states in XPS analysis of first row transition metals, oxides and hydroxides: Sc, Ti, V, Cu and Zn. Applied Surface Science, 257(3), 887-898.

Block, S.S. (2001). Disinfection, Sterilization and Preservation. Antimicrobial in food sanitation and preservation. Five editions.

Bloomfield, S.; Loneley, E. (1992). Evaluation of repeatability and reproducibility of European suspension test methods of antimicrobial activity of disinfectants and antiseptics. Journal of Applied Bacteriology 73 pp: 87 – 93

Boutrou, R.; Guéguen, M. (2005). Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology. International Journal of Food Microbiology 102: 1-20

Bowler, P.G.; Jones, S.A.; Walker, M. (2004). Microbicidal properties of a silver- containing hydrofiber dressing against a variety of burn wound pathogens. J Burn Care Rehabilitation 25:192-196.

Bragg, P.D.; Rainnie, D.J. (1974). The effect of silver ions on the respiratory chain of *Echerichia coli*. Canadian Journal Microbiology 20:883-889.

Breck D.W. (1974). Zeolite Molecular Sieves: Structure, Chemistry and Use. John Wiley and Sons, New York. York London Sydney Toronto, pp. 29

Brul, S.; Klis, F.M. (1999). Mechanistic and mathematical inactivation studies of food spoilage fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 27: 199-208.

Carlile, M.J., Watkinson, S.C. and Gooday, G.W. (2001). *The Fungi* (2nd edn). Academic, London.

Carlile, M.J.; Watkinson, Sarah C.; Goodday Grahan, W. (2007). *The Fungi*. Elsevier Academic Press, Amsterdam. pp.: 588

Carmichael, J.W., Kendrick, W.B., Conners, I.L., Sigler, L. (1980). *Genera of Hyphomycetes*. Univ. Alberta Press.

Carreras, E. (2006). Preventing exposure to moulds. *Clinical Microbiology and Infection*, 12: 77-83.

Castellano, J., Hafii, S., Ko, F., Donate, G., Wright, T., Mannari, R., Payne, W., Smith, D. and Robson, M. (2007). Comparative evaluation of silver-containing antimicrobial dressings and drugs. *International Wound journal*. 4: 114–122.

Chanquía, C. M.; Andriani, L.; Fernández, J. D.; Crivello, M. E.; Requejo, F. G.; Herrero, E. R., Eimer, G. A. (2010). Nature and Location of Copper Nanospecies in Mesoporous Molecular Sieves. *The Journal of Physical Chemistry C*, 114(3), 1481-1490.

Cheng, Q.; Li, C.; Pavlinek, V.; Saha, P.; Wang, H. (2006). Surface-modified antibacterial TiO₂/Ag⁺ nanoparticles: Preparation and properties. *Applied Surface Science*, 252: 4154-4160.

Cho, K. H., Park, J. E.; Osaka, T.; Park S. G. (2005). The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. *Electrochimica Acta*, 51, 956–960.

Chui, S.S.Y.; Lo, S.M.F.; Charmant, J.P.H.; Orpen, A.G.; Williams, I.D. (1999). A Chemically Functionalizable Nanoporous Material [Cu₃(TMA)2(H₂O)₃]_n. *Science* 283: 1148-1150.

Concepción-Rosabal, B.; Rodríguez-Fuentes, G.; Bogdanchicova, N.; Bosch, P.; Avalos, M.; Lara, V.H. (2005). Comparative study of natural and synthetic clinoptilolites containing silver in different states. *Microporous Mesoporous Materials*. 86, 249–255.

Davies, R.L.; Etris, S. F. (1997). The development and functions of silver in water purification and disease control. *Catalysis Today*, 36: 107-114.

De la Rosa-Gómez, I.; Olguín, M.; Alcántara, D. (2007). Antibacterial behavior of silver-modified clinoptilolite–heulandite rich tuff on coliform microorganisms from wastewater in a column system. *Journal of Environmental Management*, 88: 853–863.

De Ruiter, G.A.; Notermans, S.H.W.; Rombouts, F. M. (1993). New methods in food mycology. *Trends in Food Science & Technology*, 4: 91-97.

Deacon, J. W. (2000). *Modern Mycology*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford.

- Deacon, J. (2006). Fungal Biology. 4th Edition. Blackwell Publishing Ltd., Oxford.
- Deák, T. (1991). Foodborne Yeasts. *Advances in Applied Microbiology*, 36: 179-278.
- Deák, T. (1995). Methods for the detection and identification of yeasts in foods. *Trends Food Science and Technology*. 6: 287-292.
- Deak, T. Y. and Beuchat, L.R. (1996). Handbook of food spoilage yeast. CRC, Boca Ratón, New York, London, Tokyo.
- Domsch, K. H., Gams, W., and Anderson, T. H. (1980). Compendium of soil fungi. Volume 2. Academic Press, London.
- DOUE. Diario Oficial de la Unión Europea (2005). Reglamento 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo. Higiene de los productos alimenticios (DOUE de 25 de junio de 2004).
- Drelich, J.; Li, B.; Bowen, P.; Hwang, J.; Mills, O.; Hoffman, D. (2011). Vermiculite decorated with copper nanoparticles: Novel antibacterial hybrid material. *Applied Surface Science*, 257: 9435-9443
- Duran, G.M.; Marshall, D.L. (2002). Rapid determination of sanitizer concentration impedance-based methods. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 65: 1422-1427.
- Duran, N.; Marcato, P.D.; De Souza, G.I.; Álvarez, O.L.; Esposito, E. (2007). Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment. *Journal Biomedic Nanotechnology* 3: 203-208.
- Faraldos, M.; Goberna, C. (2002). Técnicas de análisis y caracterizaciones de materiales. Eds. CSIC, Madrid, España.
- Feng, Q.L.; Wu, J.; Chen, G.Q.; Cui, F.Z.; Kim, T.N.; Kim, J.O. (2000). A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical Materials Research* 52:662-668.
- Férey, G. (2008). Hybrid porous solids: past, present, future. *Chemical Society Reviews*. 37, 1:191-214.
- Ferreira L.; Fonseca, A.; Botelho, G.; Almeida- Aguiar, C.; Neves, I. (2012). Antimicrobial activity of faujasite zeolites doped with silver. *Microporous and Mesoporous Materials* 160: 126–132.
- Fleet, G. H. (1992). Spoilage yeasts. *Critical Reviews Biotechnology* 12: 1-44.
- Fleet, G.H. (1999). Microorganisms in food ecosystems. *International Journal of Food Microbiology* 50: 101-117.
- Flores-Lopez, N.; Castro-Rosas, J.; Ramirez-Bon, R.; Mendoza-Cordova, A; Larios-Rodriguez, E.; Flores-Acosta, M. (2012). Synthesis and properties of crystalline silver

nanoparticles supported in natural zeolite chabazite. *Journal of Molecular Structure* 1028: 110–115.

Freeman M.H.; McIntyre C.R. (2008). A comprehensive review of copper-based wood preservatives: with a focus on new micronized or dispersed copper systems. *Forest Products Journal*. 58: 6–27.

Frisvad, J.C.; Andersen, B.; Samson, R.A. (2007). Association of moulds to foods. Cap. 11. En: *Food Mycology. A multifaceted approach to fungi and food*. Dijksterhuis J. and Samson R.A. (Ed.), 1st edition. Taylor and Francis Group. Boca Raton, 199 – 239.

Gascon, J.; Aguado, S.; Kapteijn, F. (2008). Manufacture of dense coatings of $\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ (HKUST-1) on α -alumina. *Microporous and Mesoporous Materials*, 113(1), 132-138.

Ghannoum, M.A.; Rice, L.B. (1999). Antifungal agents: Mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12: 501-517.

Gillet, A. (2002). Mecanismo de acción de los desinfectantes y sus formulaciones. En manual técnico de higiene, limpieza y desinfección. Edit. Leveau, J.Y.; Bouix, M. Mundi-Prensa, Madrid. pp: 283-302.

Girardin, H. (1997). Detection of filamentous fungi in foods. *Sciences des Aliments*, 17: 3-19.

Gonzalez, M.; De Groot, P.W.J.; Klis, F.M.; Lipke, P.N. (2009). Glycoconjugate structure and function in fungal cell walls. *Microbial Glycobiology: Structures, Relevance, and Applications*, 169-183.

Goodhew, P.; Humphreys, J.; Bealand, R. (2001). *Electron microscopy and analysis*, Ed. Taylor and Francis, Londres.

Gots, R.E.; Layton, N. J.; Pirages, S. W. (2003). Indoor health: Background levels of fungi. *AIHA Journal*, 64: 427-438.

Guerola, P.M. (2006). Desarrollo y aplicación de sistemas rápidos para la detección, identificación y caracterización de las levaduras alterantes de alimentos. Universidad de Valencia. España. Servei Publicacions. I.S.B.U.: 84-370-6512-7

Guía institucional para uso de antisépticos y desinfectantes. (2005). <http://www.info.ccss.cr/germed/gestamb/samb08d2.htm>

Haefili, C.; Franklim, C., Hardy, K. (1984). Plasmid-determined silver resistance in *Pseudomonas stutzeri* isolated from silver mine. *Journal Bacteriology*. 158: 389-392.

Haile, T. and Nakhla, G. (2010). The inhibitory effect of antimicrobial zeolite on the biofilm of *Acidithiobacillus thiooxidans*. *Biodegradation*, 21: 123-134.

Hammond, S.M.; Carr, J.G. (1976). The antimicrobial activity of SO₂-with particular reference to fermented and non-fermented fruit juices. In: Skinner FA, Hugo WB (eds) Inhibition and inactivation of vegetative microbes. Academic, London, pp 89–110

Hibbett D, Binder M, Bischoff J, Blackwell M, Cannon F, Eriksson O, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lücking R, Thorsten Lumbsch H, Lutzoni F, Matheny PB, McLaughlin D, Powell MJ, Redhead S, Schoch CL, Spatafora JW, Stalpers JA, Vilgalys R, Aime MC, Aptroot A, Bauer R, Begerow D, Benny GL, Castlebury LA, Crous PW, Dai YC, Gams W, Geiser DM, Griffith GW, Gueidan C, Hawksworth DL, Hestmark G, Hosaka K, Humber RA, Hyde KD, Ironside JE, Koljalg U, Kurtzman CP, Larsson KH, Lichtwardt R, Longcore J, Miadilowska J, Miller A, Moncalvo JM, Mozley-Standridge S, Oberwinkler F, Parmasto E, Reeb V, Rogers JD, Roux C, Ryvarden L, Sampaio JP, Schüßler A, Sugiyama J, Thorn RG, Tibell L, Untereiner WA, Walker C, Wang Z, Weir A, Weiss M, White MM, Winka K, Yao YJ, Zhang N. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*. 111: 509–547.

Holah, J.T. (1995). Special Needs for Disinfectants in Foods-Handling Establishments. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties*, 14: 95-104.

Hrenović, J.; Zeljezić, D.; Kopjar, N.; Sarpolac, A.; Bronić, J.; Sekovanić, L. (2012). Antimicrobial activity of commercial zeolite A on *Acinetobacter junii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Hazardous Materials* 183: 655–663.

Hrenovic, J.; Milenkovic, J.; Goic-Barisic, I.; Rajic, N. (2013). Antibacterial activity of modified natural clinoptilolite against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Microporous and Mesoporous Materials*. (169): 148–152.

Hu, Z.; Zhang, J.; Chan, W.; Szeto, Y. (2006). Suspension of Silver Oxide Nanoparticles in Chitosan Solution and its Antibacterial. *Materials Research Society Symp. Proc.* 920, 0920-S02-03.

Hugo, W.B. and Russell A.D. (1981). Types of antimicrobial agents. In: Russell AD, Hugo WB, Ayliffe GAJ, ed. *Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization*. 3rd ed.

Ignatova, M.; Starbova, K.; Markova, N.; Manolova, N.; Rashkov, I. (2006). Electrospun nanofibre mats with antibacterial properties from quaternised chitosan and polyvinyl alcohol. *Carbohydrate Research*. 341: 2098–2107

Inoue Y.; Hoshino M.; Takahashi H.; Noguchi T.; Murata T.; Kanzaki Y.; Sasatsu, M. (2002). Bactericidal activity of Ag-zeolite mediated by reactive oxygen species under aerated conditions. *Journal of inorganic biochemistry*, 92(1), 37-42.

Ishitani T. (1995). Active packaging for food quality preservation in Japan. In: Ackerman P, Jagerstad M, Ohlsson T, editors. *Food and food packaging materials-chemical interactions*. Cambridge: Royal Society of Chemistry. p 177-88.

Jarvis, B.; Seiler, D.A.L.; Ould, A.J.L.; Williams, A.P. (1983). Observations on the enumeration of moulds in food and feedingstuffs. *Journal of Applied Bacteriology*, 55: 325-336

Jennigs, D.H.; Lysek G. (1999) "Fungal Biology, understanding the fungal lifestyle". Ed. by Andrea Boshier. Bios Scientific Publisher Ltd Oxford, UK.

Juven, B.J.; Kanner, J.; Weisslowicz, H. (1978). Influence of orange juice composition on the thermal resistance of spoilage yeasts. *Journal Food Science*. 43: 1074–1076, 1080.

Kaucký D.; Vondrová A.; Dedecek J. (2000). Activity of Co Ion Sites in ZSM-5, Ferrierite, and Mordenite in Selective Catalytic Reduction of NO with Methane. *Wichterlová Journal of Catalysis* 194: 318-329.

Kavanagh, K. (2005). *Fungi: Biology and Applications*. Department of Biology National University of Ireland Maynooth. Co. Kildare. Ireland. Ed. John Wiley and Sons Ltd. England.

Kawahara, K.; Tsuruda, K.; Morishita, M.; Uchida, M. (2000). Antibacterial effect of silver-zeolite on oral bacteria under anaerobic conditions. *Dental materials*, 16: 452-455.

Kawashita, M.; Tsuneyama, S.; Miyaji, F.; Kokubo, T.; Kozuka, H.; Yamamoto, K. (2000). Antibacterial silver-containing silica glass prepared by sol-gel method. *Biomaterials* 21: 393-398.

Kiermeier, F.; Wildbrett, G.; Mrozek, H. (2000). Productos químicos auxiliares para la limpieza y desinfección. En: *Limpieza y desinfección en la industria alimentaria*. Ed. Wildbrett, Acibia, Zaragoza. pp.: 21-66.

Klasen, H. J. (2000). Historical review of the use of silver in the treatment of burns. I. Early uses. *Burns* 26: 117–130.

Klueh, U.; Wagner, V.; Kelly, S.; Johnson, A.; Bryers, J.D. (2000). Efficacy of silver-coated fabric to prevent bacterial colonization and subsequent device-based biofilm formation. *Journal Biomedical Materials Research* 53:621-631.

Krishnani, K.; Zhang, Y.; Xiong, L.; Yan, Y.; Boopathy, R.; Mulchandani, A. (2012). Bactericidal and ammonia removal activity of silver ion-exchanged zeolite. *Bioresource technology* 117: 86-91.

Kubota M.; Nakabayashi T.; Matsumoto Y.; Shiomi T.; Yamada Y.; Ino K.; Yamanokuchi, H.; Matsui M.; Tsunoda T.; Mizukami F.; Sakaguchi K. (2008). Selective adsorption of bacterial cells onto zeolites. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 64: 88-97

Kurtzman, C.P.; Fell, J.W. (1998). *The yeasts, a taxonomic study* 4th edn, Elsevier Science, Amsterdam.

Kwakye-Awuah, B.; Williams, C.; Kenward M. and Radecka, I. (2007). Antimicrobial action and efficiency of silver-loaded zeolite X. *Journal of Applied Microbiology* ISSN 1364-5072.

León, K.; López, A.; Gago, J. (2011). Síntesis del óxido de cobre nanoestructurado asistida con irradiación gamma o ultrasonido y sus propiedades antimicrobianas. *ECIPerú*. ISSN 1813-0194.

Lalueza, P.; Monzón, M.; Arruebo, M.; Santamaría, J. (2011). Bactericidal effects of different silver-containing materials. *Materials Research Bulletin*. 46: 2070–2076.

Li, B.; Yu, S.; Hwang, J.Y.; Shi, S.; Miner, J. (2002). *Materials Characterization Engineering*. 1:61-68

Liau, S.Y.; Read, D.C.; Pugh, W.J.; Furr, J.R.; Russell, A.D. (1997). Interaction of silver-nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions. *Letters Applied Microbiology* 25:279-283.

López, L.; Romero, J.; Ureta, F. (2001). Tratamiento de desinfección de lechugas (*Lactuca sativa*) y Frutilla (*Fragaria chiloensis*). ALAN V.51 N4 Caracas. Venezuela.

Loureiro, V.; Querol, A. (1999). The prevalence and control of spoilage yeasts in foods and beverages. *Trends Food Science and Technology* 10: 356-365.

Lu, L.; Luo, Y.; Ng, W.J.; Zhao, X.S. (2009). Bactericidal activity of silver nanoparticles supported on microporus titanosilicate ETS-10. *Microporus and Mesoporus Materials* 120:304–309.

Ludemann V.; Pose G.; Moavro A.; Maliaviabarrena M.G.; Fandiño R.; Ripole G.; Basílico J.C.; Pardo A.G. (2009). Toxicological assessment of *Penicillium nalgiovense* strains for use as starters cultures in the manufacture of dry fermented sausages. *J. Food Prot.*, 72: 1666 – 1670.

Lv, L.; Luo, Y.; Ng, W. J.; Zhao, X. (2009). Bactericidal activity of silver nanoparticles supported on microporous titanosilicate ETS-10. *Microporous and Mesoporous Materials*, 120: 304-309.

McDonnell, G; Russell, A.D. (1999). Antiseptics and disinfectants: Activity, action and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*: 12: 147- 179.

Magaña, S.; Quintana, P.; Aguilar, D.; Toledo, J.; Angeles-Chavez, C.; Cortes, M., Sánchez, R. M. (2008). Antibacterial activity of montmorillonites modified with silver. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 281: 192-199.

Mahendra, R.; Alka, Y.; Aniket, G. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*. Elsevier. 27. 76-83.

Malachová, K.; Praus, P.; Rybková, Z.; Kozák, O. (2011). Antibacterial and antifungal activities of silver, copper and zinc montmorillonites. *Applied Clay Science* 53: 642–645.

Manivannan, G. (2008). “Disinfection and decontamination. Principles, applications and related issues”. Taylor and Francis Group, CrC Press, Boca Raton, USA.

Manual de instrucciones de microscopio de barrido electrónico JEOL JSM-35C, JEOL LTD./ Tokyo, Japan.

Matsumura, Y.; Yoshikata, K.; Kunisaki, S.; Tsuchido, T. (2003). Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. *Applied and Environment Microbiology* 69 (2003) 4278–4281.

Matsuura, T., Y. Abe, Y. Sato, K. Okamoto, M. Ueshige, and Y Akagawa. (1997). Prolonged antimicrobial effect of tissue conditioners containing silver-zeolite. *Journal of dentistry*. 25:373-377

Maukonen, J.; Matto, J.; Wirtanen, G.; Raaska, L.; Mattila-Sandholm, T.; Salo, S.; Saarela, M. (2003). Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 30: 327-356.

McLaughlin, D.J.; McLaughlin, E.G.; Lemke, P.A. (2001). *The Mycota: a comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research. Systematics and evolution.* Springer-Verlag New York Inc.; New York.

Miller, D.D.; Golding, N.S. (1949). The gas requirements of molds. V. The minimum oxygen requirements for normal growth and for germination of six mold cultures. *Journal of dairy science*, 32: 101:110

Moore-Landecker E. (1990). *Fundamentals of the Fungi*, 3 ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ, E.U.A.

Morones, J.R.; Elechiguerra, J.L.; Camacho, A.; Holt, K.; Kourj, J.B.; Tapia-Ramirez, J.; Yacaman, M.J. (2005). The bacterial effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16: 2346-2353.

Moss, M.O. (1999). Spoilage problems – Problems Caused by Fungi. En: *Encyclopedia of Food Microbiology*. Editor: Richard, K. R. Elsevier, Oxford. pp: 2056-2062.

Müller, G. (1981). *Microbiología de los alimentos vegetales*. Acribia, Zaragoza. Oxford: Blackwell Science; 1999. p. 5-94.

National center for biotechnology information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.

Nikawa, H., Yamamoto, T., Hamada, T., Rahardjo, M. B., Murata, H., & Nakanoda, S. (1997). Antifungal effect of zeolite-incorporated tissue conditioner against *Candida albicans* growth and/or acid production. *Journal of oral Rehabilitation*, 24: 350-357.

Ohashi, F.; Oya, A.; Duclaux, I.; Beguin, F. (1998). Structural model calculation of antimicrobial and antifungal agents derived from clay minerals. *Applied Clay Science*. 12: 435-445.

Oyanedel-Craver, V.A.; Smith, J.A. (2008). Sustainable colloidal-silver-impregnated ceramic filter for point-of-use water treatment. *Environmet Science and Technology* 42: 927:933.

Pal, S.; Tak, Y.K.; Song, J.M. (2007). Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environment Microbiology*, 73 (6), 1712-1720.

Petica, A.; Gavrilu, S.; Lungu, M.; Burutea, N.; Panzuru, C. (2008). Colloidal silver solutions with antimicrobial properties. *Materials Science and Engineering: B*, Volume 152, Issues 1–3, Pages 22-27

Pitt J.I.; Hocking A.D. (2009). *Fungi and Food Spoilage*. 3rd Ed. Blackie Academic & Professional. London.

PQ Corporation's Zeolites and Catalysts Division, *Zeolites and the environment: the year 2000*, Abbey Newsletter, vol.20, N°7 (1996).

Praphailong, W. and Fleet, G.H. (1997). The effect of pH, sodium chloride, sucrose, sorbate and benzoate on the growth of food spoilage yeasts. *Food Microbiology*. 14: 459–468.

Prestipino, C.; Regli, L.; Vitillo, J. G.; Bonino, F.; Damin, A.; Lamberti, C.; Bordiga, S. (2006). Local structure of framework Cu (II) in HKUST-1 metallorganic framework: spectroscopic characterization upon activation and interaction with adsorbates. *Chemistry of materials*, 18(5), 1337-1346.

Rabo, J. (1976). *Zeolite Chemistry an Catalysis*, ACS monograph 171, American Chemical Society.

Ray, B. (2004). *Fundamental Food Microbiology*. 3^{er}. Ed.CRC Press, Boca Raton.

Reij, M.W.; Den Aantrekker, E.D. (2004). Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *International Journal of Food Microbiology*, 91: 1-11.

Rivera-Garza, M.; Olguín, M.T.; García-Sosa, I.; Alcántara, D.; Rodríguez-Fuentes, G. (2000). Silver supported on natural Mexican zeolite as an antibacterial material *Microporus and Mesoporus Material*,39: 431–444.

Rosenkranz, H.S.; Carr, H.S. (1972). Silver sulfadiazine: effect on the growth and metabolism of bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2:367-372.

Ruparelia J.; Chatterjee A.; Dutttagupta S.; Mukherji S. (2008). Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Acta Biomaterialia* 4: 707-716.

Russell, A.D.; Hugo, W.B.; Ayliffe, G.A.J. (1992). *Disinfection, Preservation and Sterilization*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.

Russell, A.; Hugo, W.; Ayliffe, G. (1999). *Principles and practice of disinfection, preservation, and sterilization*. Third Edition. Wiley – Blackwell.

Samson, R.A.; Hoekstra, E. S.; Frisvad, J. C.; Filtenborg, O. (2000). *Introduction to food and airborne fungi*. 6th. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures

Samson, R.A.; Houbraeken, J.; Thrane, U.; Frisvad, J.C.; Andersen B. (2010). *Food and indoor fungi*. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre Utrecht, The Netherlands.

Sapers, G. (2001). Efficacy of Washing and Sanitizing Methods for Disinfections of Fresh Fruit and Vegetable Products. *Food Technology Biotechnology* 39 (4), pp: 305 – 311

Schlichte, K.; Kratzke, T.; Kaskel, S. (2004). Improved synthesis, thermal stability and catalytic properties of the metal-organic framework compound $\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$. *Microporous and Mesoporous Materials*, 73(1), 81-88.

Schreurs, W.J.; Rosenberg, H. (1982). Effect of silver ions on transport and retention of phosphate by *Escherichia coli*. *Journal Bacteriology* 152:7-13.

Seijger, G.B.F.; Van Kooten Niekerk, P.; Krishna, P.; Calis, H.P.A.; Van Bekkum, H.; Van den Bleek, C.M. (2003). Screening of silver and cerium exchanged zeolite catalysts for the lean burn reduction of NOx with propene, *Applied Catalysis B: Environmental* 40: 31–42

Silvestry-Rodriguez, N.; Sicairos-Ruelas, E. E.; Gerba, C.P.; Bright, K.R. (2007). Silver as a disinfectant. *Reviews Environmental Contamination Toxicology* 191:23–45.

Singh, J. (2005). Toxic moulds and indoor air quality. *Indoor and Built Environment*, 14: 229-234.

Skoog, D.; Holler, J.; Nieman, T. (2001). *Principios de análisis instrumental*. 5ta. Edición, Mc Graw-Hill, Madrid, España.

Solache-Carranco, H., Juárez-Díaz, G., Esparza-García, A., Briseño-García, M., Galván-Arellano, M., Martínez-Juárez, J. & Peña-Sierra, R. (2009). Photoluminescence and X-ray diffraction studies on Cu_2O . *Journal of Luminescence*, 129(12), 1483-1487.

Soykan, C.; Coskun, R.; Kirbag, S. (2007). Policrotonic acid-co-2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid–metal complexes with copper(II), cobalt(II), and nickel(II): Synthesis, characterization and antimicrobial activity. *European Polymer Journal*, 43: 4028–4036.

Stratford, M. (2005). Food and beverage spoilage yeasts. En: “The Yeast Handbook: Yeasts in Food and Beverages”. Ed: A., Querol, y G., Fleet. Springer-Verlag. Heidelberg, Germany.

Structure Comission of the International Zeolite Association:
<http://www.iza.structure.org/database>.

Thomas, D.S. (1993). Yeasts as spoilage organisms in beverages. En: *The yeasts*, Vol. 5: Yeast technology, 2dn. Edit. Academic London. pp: 435-516.

Top, A.; Ülkü, S. (2004). Silver, zinc, and copper exchange in a Na-clinoptilolite and resulting effect on antibacterial activity. *Applied Clay Science*, 27: 13-19.

Tresner, H.D.; Hayes, J.A. (1971). Sodium chloride tolerance of terrestrial fungi. *Applied Microbiology*. 22: 210–213

Tornai-Lehoczki, J.; Dlauchy, D. (2000). Delimitation of brewing yeast strains using different molecular techniques. *International Journal Food Microbiology* 562: 37-45

Vincent, J. (2002). La química de la limpieza En: Manual técnico de higiene, limpieza y desinfección. Ed. Leveau-Bouix. Mundi prensa, Madrid. pp.: 205-246.

Walker, G. M. (1998). Yeast Physiology and Biotechnology. Wiley, Chichester.

Walker, G.M. (2004). Metals in yeast fermentation processes. Advances in Applied Microbiology 54: 197–229.

Wang, Q.; Yu, H.; Zhong, L.; Liu, J.; Sun, J.; Shen, J. (2006). Incorporation of Silver Ions into Ultrathin Titanium Phosphate Films: In Situ Reduction to Prepare Silver Nanoparticles and Their Antibacterial Activity. Chemical Materials 18: 1988- 1994.

Wright, J.B.; Lam, K.; Hansen, D. (1999). Efficacy of topical silver against fungal burn wound pathogens. American Journal Infection Control 27:344-350

Yamamoto, T.; Uchida, M. and Kurihara, Y. (1991). The anti-microbial effect of metal-exchanged zeolite. J. Antibacterial Antifungal Agents 19(1), 425–431 (1991).

Yamanaka, M.; Hara, K.; Kudo, J. (2005). Bactericidal actions of a silver ion solution on *Escherichia coli*, studied by Energy-Filtering transmission Electron Microscopy and Proteomic Analysis. Applied Environmental Microbiology 71 (11): 7589-93.

Yoshinobu, M.; Yoshikata, K.; Kunisaki, S.; Tsuchido, T. (2003). Mode of Bactericidal Action of Silver Zeolite and Its Comparison with That of Silver Nitrate. Applied Environmental Microbiology, 69 (7): 4278–4281.

Zhuang, W., Yuan, D.; Li, J.R.; Luo, Z.; Zhou, H.C.; Bashir, S.; Liu, J. (2012). Highly Potent Bactericidal Activity of Porous Metal-Organic Frameworks. Adv. Healthcare Materials 1: 225–238.

Medios de cultivos○ Agua de peptona

Peptona	1 g
Agua destilada	1000 mL

Esterilizar en autoclave 15 minutos a 121°C y 1 atm.

○ Agar diclorán, rosa de bengala, cloranfenicol (DRBC)

Glucosa	10 g
Peptona	5 g
K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 mL
Rosa de bengala (5%P/V en agua, 0.5 mL)	25 mg
Diclorán (0.2% P/V en metanol, 1 mL)	2 mg
Cloranfenicol	100 mg

Esterilizar en autoclave 15 minutos a 121°C y 1 atm.

○ Agar extracto de malta (MEA)

Extracto de malta	20 g
Peptona	1 g
Agar	20 g
Glucosa	20 g
Agua destilada	1000 mL

Esterilizar en autoclave 15 minutos a 121°C y 1 atm.

- Czapeck concentrado

NaNO ₃	30 g
KCl	5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	5 g
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0.1 g
Agua destilada	100 mL
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.1 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.05 g

No es necesaria esterilizar ya que no posee fuente carbonada.

- Agar extracto de levadura-Czapek (CYA)

K ₂ HPO ₄	1 g
Czapek concentrado	10 mL
Extracto de levadura	5 g
Sacarosa	30 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 mL

Esterilizar en autoclave 15 minutos a 121°C y 1 atm.

- Agar nitrato glicerol 25% (G25N)

K ₂ HPO ₄	0.75 g
Czapeck concentrado	7.5 mL
Extracto de levadura	3.7 mL
Glicerol	250 mL
Agar	12 g
Agua destilada	750 g

Esterilizar en autoclave 15 minutos a 121°C y 1 atm

○ Caldo extracto de malta (CEM)

Extracto de malta	20 g
Peptona	1 g
Glucosa	20 g
Agua destilada	1000 mL

Esterilizar en autoclave 15 minutos a 121°C y 1 atm

○ Agar Spezieller Nährstoffarmer (SNA)

K_2HPO_4	1 g
KNO_3	1 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5 g
KCl	0.5 g
Sacarosa	0.2 g
Glucosa	0.2 g
Agar	15 g
Agua destilada	750 g

Esterilizar en autoclave 15 minutos a 121°C y 1 atm.

○ Extracto de levadura, peptona, dextrosa (YPD)

Extracto de levadura	5 g
Peptona	5 g
Glucosa	40 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 mL

Medio de cultivo para conservar las cepas de levaduras: Cultivar la levadura en 10 mL de YPD durante 12 a 20 hs, luego transferir una alícuota a tubos Eppendorff estéril y lavar 2 veces con agua destilada estéril (5000 rpm, 5 min). Por último agregar 1 ml de glicerol 30% (glicerol: agua destilada). Frisados a -20°C .

- o Glicerol- agua (18 % p/p)

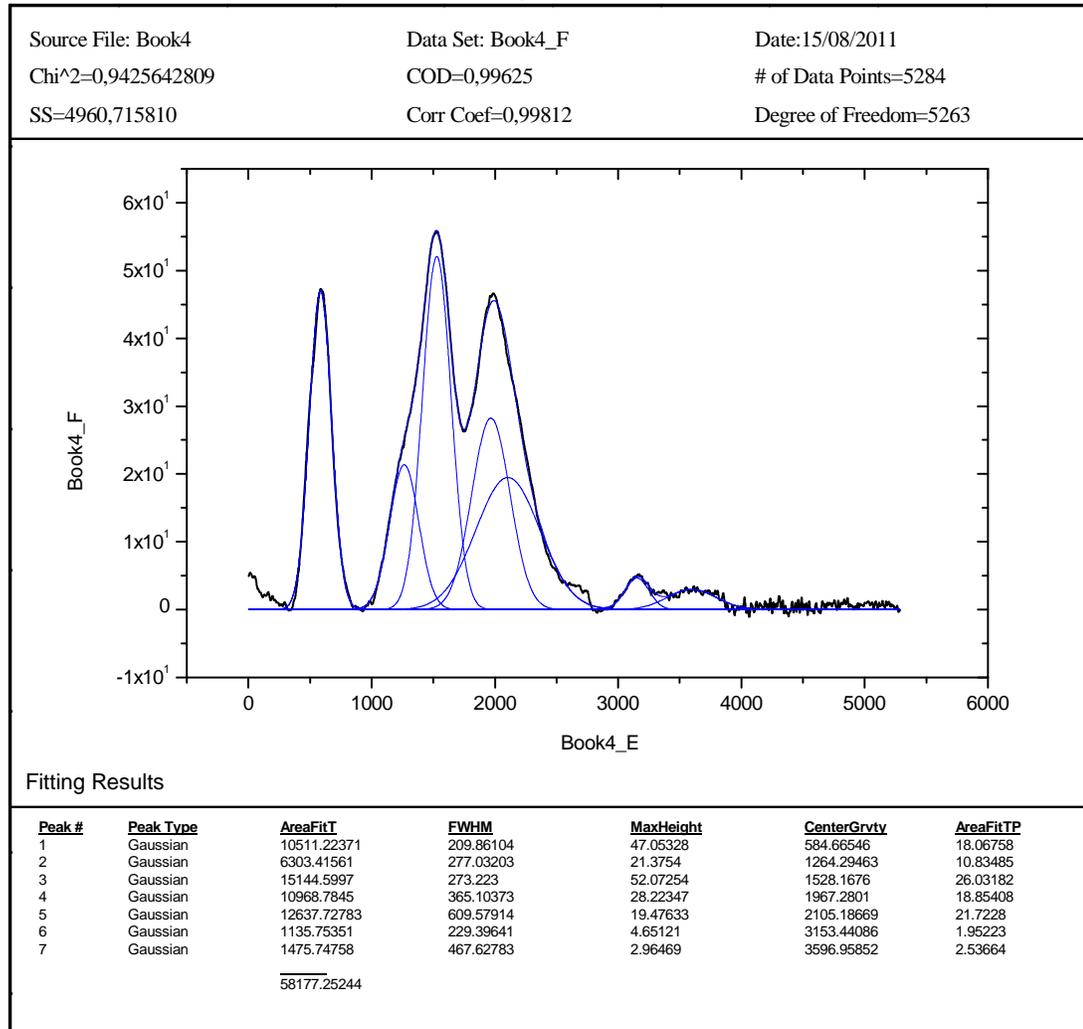
Medio de cultivo utilizado para la conservación de las cepas de hongos filamentosos en tubos Eppendorff, frizados a -20°C .

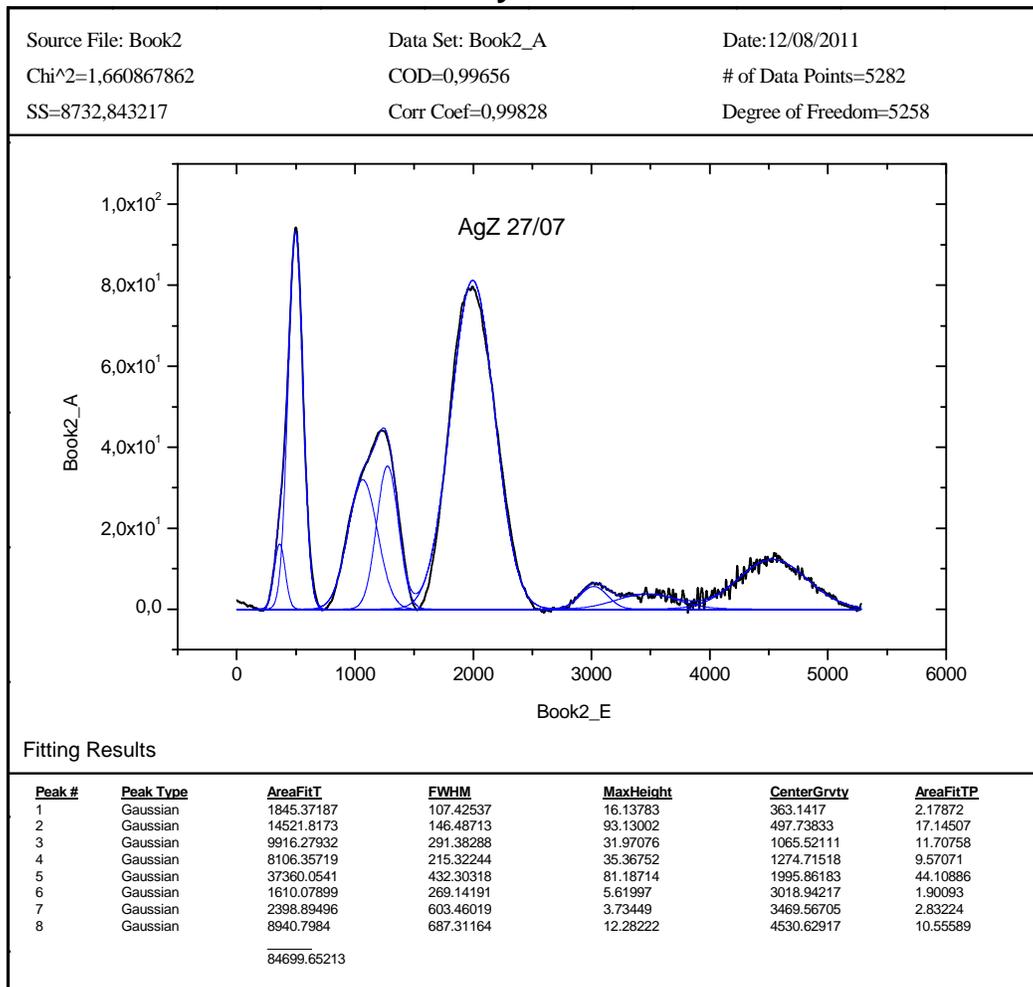
Modelo de Baranyi y Roberts

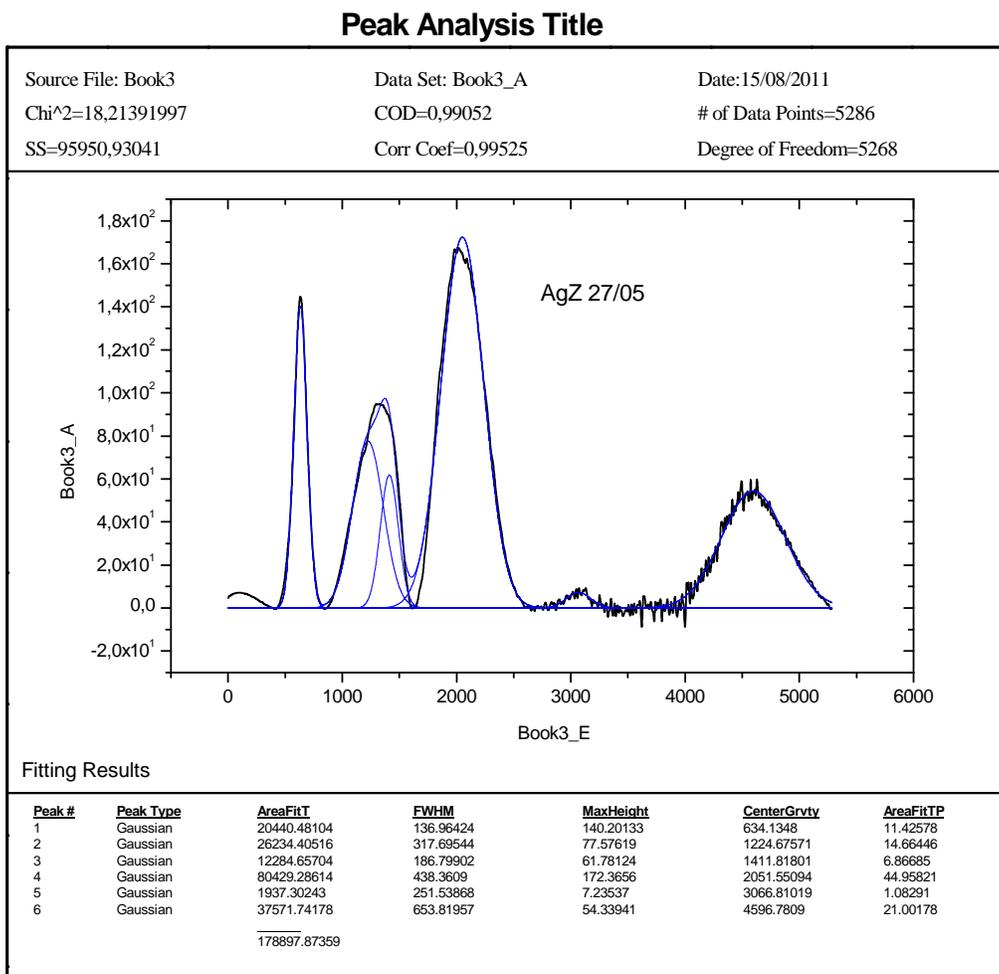
La velocidad de crecimiento se obtuvo a partir de los radios (y , cm) medidos a diferentes tiempos (t , días/h), modelándolos con la ecuación de Baranyi y Roberts, utilizando el software DMFiT (DM: Dynamic Modelling 2.1)

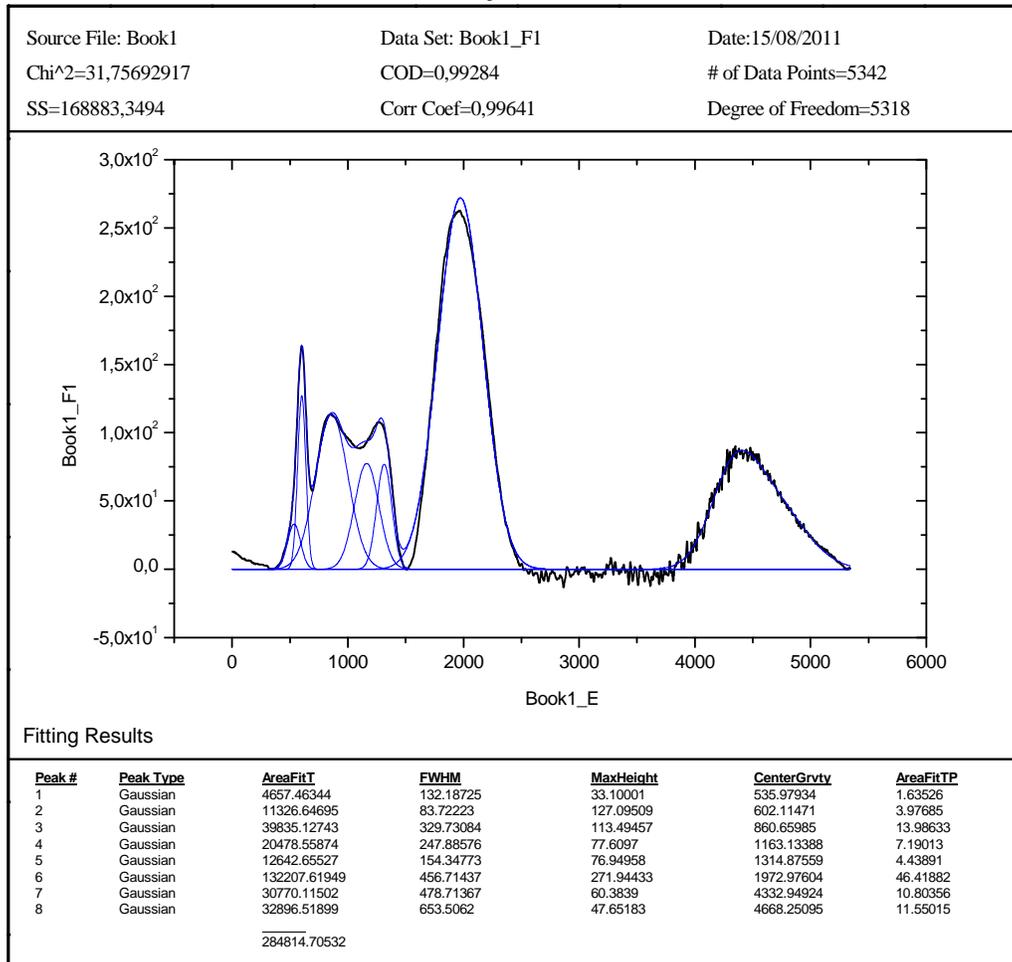
$$y(t) = y_0 + \mu_{max} t + \frac{1}{\mu_{max}} \ln(e^{-\nu t} + e^{\nu h_0} - e^{-\nu t + \nu h_0}) - \frac{1}{m} \ln \left(1 + \frac{e^{\frac{\mu_{max}}{m} (t - t_0) - \nu h_0}}}{e^{\mu_{max} (t - t_0)}} - 1 \right)$$

Dónde: $y(t)$ es el radio (cm), t tiempo (d), y_0 radio de la colonia al tiempo o número inicial de células $t = 0$ (cm, Log (UFC/mL)), μ_{max} radio máximo de la colonia o velocidad específica de crecimiento (cm d⁻¹), m , ν parámetros de curvatura para caracterizar la transición de la fase exponencial; h_0 parámetro adimensional que cuantifica el estado fisiológico inicial de las células, y_{max} radio máximo de la colonia o número final de células (cm, Log (UFC/mL)).

Deconvolución de señales TPR de la muestra Ag(4)Z**Peak Analysis Title**

Deconvolución de señales TPR de la muestra Ag(6)Z**Peak Analysis Title**

Deconvolución de señales TPR de la muestra Ag(10)Z

Deconvolución de señales TPR de la muestra Ag(14)Z**Peak Analysis Title**

Señales de rayos X de EPMA (Electron probe microanalysis)

Elemento	Señal	Energía (keV)	Intensidad relativa (%)
Si	K _{α1}	1,739	50
	K _{α2}	1,740	100
Al	K _{α1}	1,487	100
	K _{α2}	1,486	50
Ag	L _{α1}	2,984	100
	L _{α1}	2,978	50
Na	K _{α1}	1,041	100

Estimación del % de intercambio de plata en mordenita

Estructura de celda unitaria de mordenita (Breck,1974):



Equivale a:



Considerando que la relación Si/Al determinada por EPMA fue Si/Al = 5,7:

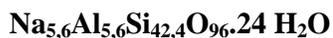
$$y/x = 5,7 \rightarrow y = 5,7 x$$

$$x = 48-(5,7 x)$$

$$x = 273,6 - 48 x$$

$$\mathbf{x = 5,58}$$

$$y = 48-5,58 = 42,4$$



$$\text{PM mordenita} = 22,9 \cdot 5,6 + 26,98 \cdot 5,6 + 96 \cdot 16 + 28,08 \cdot 42,4 + 24 \cdot 18$$

$$\text{PM mordenita} = 3437,92 \text{ g/mol}$$

Contenidos de Ag (% p/p por AA): 13,6; 10,3; 5,6; 3,9

13,6 %p/p Ag

$$13,6 \text{ g Ag} \text{ -- } 100 \text{ g Ag-mor}$$

$$136 \text{ mg Ag} \text{ -- } 1 \text{ g Ag-mor} \text{ -- } 864 \text{ mg mor}$$

$$107,87 \text{ mg Ag} \text{ -- } 1 \text{ mmol Ag}$$

$$136 \text{ mg Ag} \text{ --- } x = 1,2608 \text{ mmol Ag}$$

$$3437,92 \text{ mg mor} \text{ -- } 1 \text{ mmol}$$

$$864 \text{ mg mor} \text{ --- } x = 0,2513 \text{ mmol mor}$$

$$1,2608 \text{ mmol Ag} \text{ --- } 0,2513 \text{ mmol mor}$$

$$5,017 \text{ mmol Ag} \text{ -- } 1 \text{ mmol mor}$$

$$5,7 \text{ mmol Ag} \text{ -- } 100 \% \text{ intercambio}$$

$$5,017 \text{ mmol Ag} \text{ -- } x = \mathbf{88 \%}$$

10,3 %p/p Ag

$$10,3 \text{ g Ag} \text{ -- } 100 \text{ g Ag-mor}$$

$$103 \text{ mg Ag} \text{ -- } 1 \text{ g Ag-mor} \text{ --- } 897 \text{ mg mor}$$

$$107,87 \text{ mg Ag} \text{ -- } 1 \text{ mmol Ag}$$

103 mg Ag --- $x = 0,9548$ mmol Ag

3437,92 mg mor-- 1 mmol
897 mg mor--- $x = 0,2609$ mmol mor

0,9548 mmol Ag---0,2609 mmol mor
3,66 mmol Ag--1 mmol mor

5,7 mmol Ag--100 % intercambio
3,66 mmol Ag-- $x = 64,2$ %

5,6 %p/p Ag

5,6 g Ag – 100 g Ag-mor
56 mg Ag--1g Ag-mor--944 mg mor

107,87 mg Ag---1 mmol Ag
56 mg Ag ---- $x = 0,519$ mmol Ag

3437,92 mg mor--- 1 mmol
944 mg mor--- $x = 0,2746$ mmol mor

0,519 mmol Ag---0,2746 mmol mor
1,89 mmol Ag--1 mmol mor

5,7 mmol Ag--100 % intercambio
1,89 mmol Ag-- $x = 33,1$ %

3,9 %p/p Ag

3,9 g Ag – 100 g Ag-mor
39 mg Ag---1g Ag-mor---961 mg mor

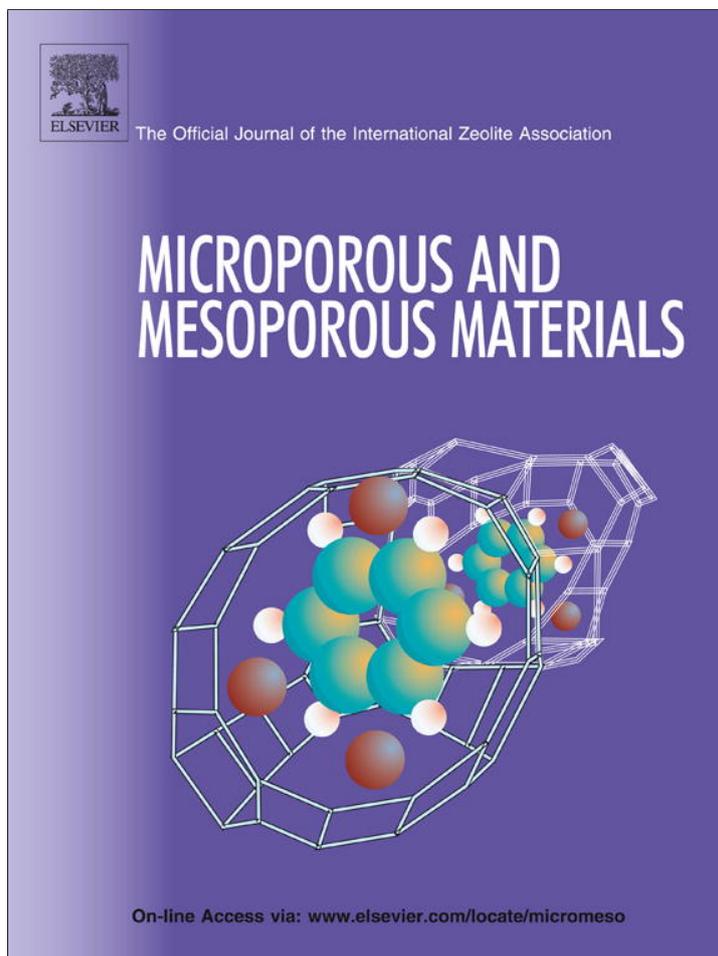
107,87 mg Ag---1 mmol Ag
39 mg Ag ---- $x = 0,3615$ mmol Ag

3437,92 mg mor--- 1 mmol
961 mg mor---- $x = 0,2795$ mmol mor

0,3615 mmol Ag---0,2795 mmol mor
1,46 mmol Ag---1 mmol mor

5,7 mmol Ag---100 % intercambio
1,46 mmol Ag--- $x = 25,6$ %

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



(This is a sample cover image for this issue. The actual cover is not yet available at this time.)

This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Microporous and Mesoporous Materials

journal homepage: www.elsevier.com/locate/micromeso

Short Communication

Novel application of HKUST-1 metal–organic framework as antifungal:
Biological tests and physicochemical characterizationsCarolina Chiericatti^a, Juan Carlos Basílico^a, María L. Zapata Basílico^a, Juan Manuel Zamaro^{b,*}^a Cátedra de Microbiología, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santiago del Estero 2829, (3000) Santa Fe, Argentina^b Instituto de Investigaciones en Catálisis y Petroquímica, INCAPE (FIQ, UNL-CONICET), Santiago del Estero 2829, (3000) Santa Fe, Argentina

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 March 2012

Received in revised form 2 May 2012

Accepted 6 June 2012

Available online 15 June 2012

Keywords:

Metal–organic framework

HKUST-1

Antifungal activity

Copper release

ABSTRACT

The HKUST-1 metal–organic framework (MOF) was successfully applied as a biocidal material against representative yeast and mold. The synthesized MOF showed a strong antifungal effect against *Saccharomyces cerevisiae* for which the growth was completely inhibited, whereas the growth of *Geotrichum candidum* was reduced from 6.16 to 1.29 CFU mL⁻¹. The antifungal action was related to copper ions released into the culture medium due to a progressive degradation of the crystalline structure of the material that involved the formation of surface extra-framework Cu(I). This study shows the potential of using copper-based metal–organic frameworks for a controlled release of biologically active copper ions.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Cu compounds in solution such as CuSO₄ and Cu(OH)₂ are traditionally used for the control of contamination by microorganisms, but they should be added in high levels. In the search for alternatives, numerous studies for dosing Cu have been published, e.g. the use of Cu-exchanged zeolites to gradually supply Cu(II) ions [1,2] or the use of dispersed Cu(0) and CuO nanoparticles [3,4]. This latter approach has the disadvantage of particles aggregation. Moreover, inorganic–organic materials as polymer–metal complexes based on Cu(II) have also been applied for a more flexible dosification of ions [5–7]. A relatively new family of these hybrid materials are metal–organic frameworks (MOFs). MOFs have become of interest for a wide range of applications [8], but the unusual features of these materials suggest that they could be used in other areas so far unexplored. MOFs are being actively explored for biomedicine as imaging agents and as delivery vehicles for therapeutic agents [9]. Moreover, the search for new materials that allow a controlled release of ions with antimicrobial activity is an area in which MOFs could also be very promising. In this sense, it has been recently reported that a silver-based MOF presents good bactericidal action due to the release of ions of its own structure [10]. Most recently, a cobalt-based metal–organic framework also showed a high activity by itself against *Escherichia coli* [11]. HKUST-1 has an open pore system with accessible binuclear copper centers in which the Cu ions are interconnected in the threedimensional

net. Then these atoms could be disconnected and the MOF act as a source of biologically active ions.

In this study, we first show that HKUST-1 has a strong antifungal activity against a prototypical yeast and mold which are commonly found in the industries of food processing. Then, based on characterizations, a possible action mechanism of the material is proposed.

2. Experimental

The synthesis of HKUST-1 was carried out following a reported procedure [12] with slight variations. Basically, 0.875 g of Cu(NO₃)₂·3H₂O (Sigma–Aldrich, 99%) were dissolved in 12 mL of distilled water and separately, 0.42 g of trimesic acid (Sigma–Aldrich 99%) were dissolved in 12 mL of ethanol (Cicarelli). Subsequently, both solutions were mixed, kept under stirring for 60 min and then placed in a Teflon-lined autoclave at 120 °C for 16 h. Finally, turquoise crystals were recovered and dried at 120 °C for 10 h.

The microorganisms selected for the microbiological assays were the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae* (LMFIQ444) and the coenocytic eukaryote *Geotrichum candidum* (LMFIQ269); they were isolated from spoiled food products and the strains were stored in the culture collection at the Universidad Nacional del Litoral. The tests were performed under fermentative conditions adding 9 mL of culture medium, 10 mg of HKUST-1 and 1 mL of freshly prepared inoculum suspension, and subsequently incubated in malt extract broth (MEB) – malt extract 2.0%; peptone bacteriological 0.1%, Glucose 2%, w/v in distilled water- (Biokar

* Corresponding author. Tel./fax: +54 0342 4536861.

E-mail address: zamaro@fiq.unl.edu.ar (J.M. Zamaro).

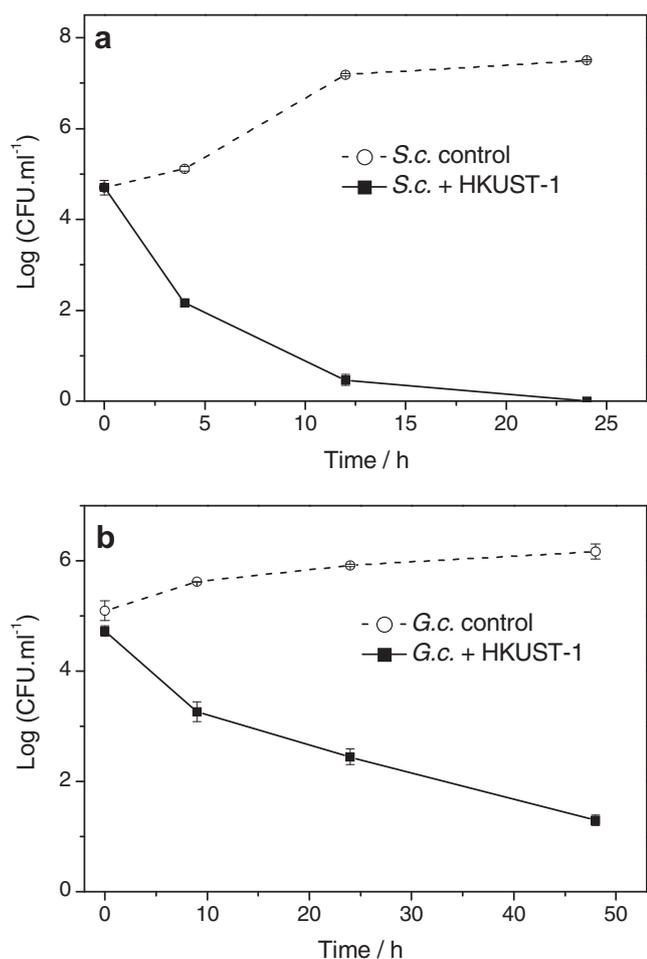


Fig. 1. Viable colony counting at different times with and without the addition of HKUST-1 for: (a) *S. cerevisiae*; (b) *G. candidum*.

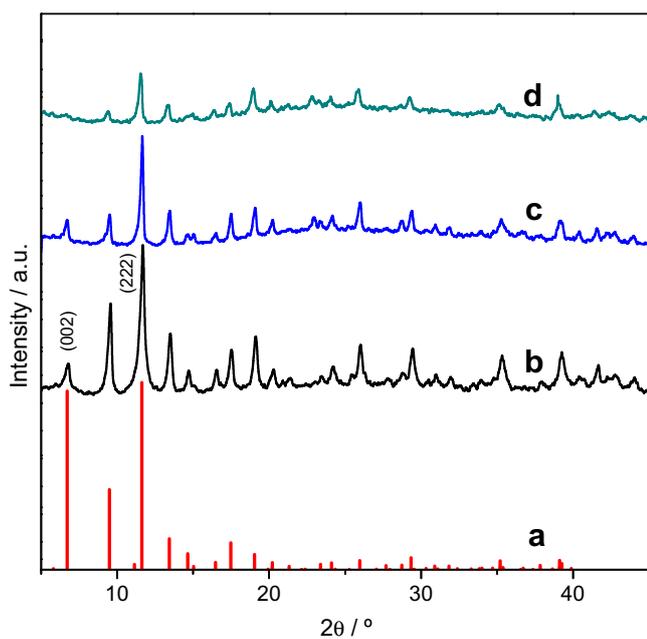


Fig. 2. X-ray diffraction: (a) simulated pattern using Diamond software with CCDC archive for HKUST-1; (b) as-synthesized HKUST-1; (c) HKUST-1 after 24 h in MEB; (d) HKUST-1 after 48 h in MEB.

Table 1
 Results from XRD, AAS and XPS data.

Sample	Crystallinity (%)	[Cu] in sol. (ppm)	Cu ₂ p _{3/2} /Cu ₂ p _{3/2} sat.	Surface Cu(II)/Cu(I)
HKUST-1	100	–	4.2	∞
HK-24	70	183	9.1	3.7
HK-48	48	184	7.7	2.9

Diagnostics, Beauvais, France) at 25 °C for 48 h. In parallel, the respective control growths were conducted. Each of the tests was performed in quadruplicate. After incubation, counts using decimal dilutions in MEB-agar (1.2% w/v) were conducted.

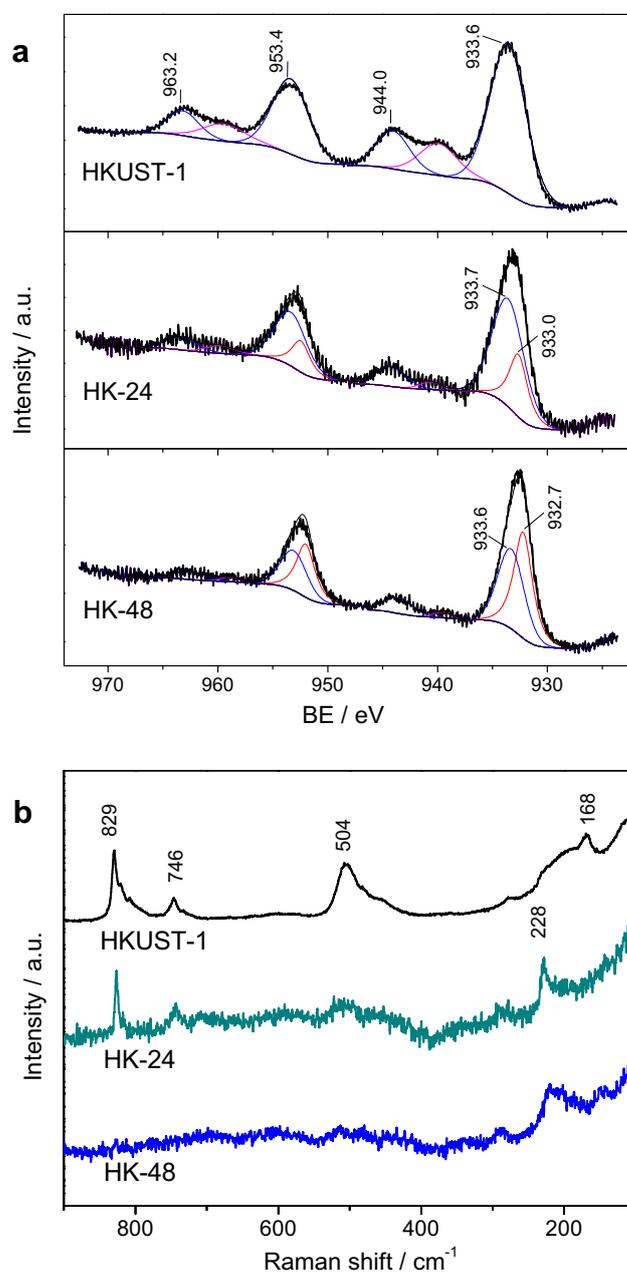


Fig. 3. Spectroscopic analyses of fresh and used HKUST-1 samples: (a) processed XPS spectra in Cu_{2p} region; (b) LRS spectra.

Characterization through X-ray diffraction (XRD) was performed with a Shimadzu XD-D1 instrument in a Bragg–Brentano configuration (CuK α radiation, $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$, 30 kV, 40 mA, 2° min^{-1} , 100 mg sample). Crystallinity of used solids was calculated considering the main peaks and taking 100% for the as-synthesized MOF. Atomic absorption spectroscopy (AAS) was performed on filtrates (Sartorius 0.45 μm membrane filters) with a Perkin Elmer 3110 flame emission instrument (324.8 nm). X-ray photoelectronic spectroscopy (XPS) analyses were carried out in a SPECS system (Mg K α X-ray source, 200 W and 12 kV; C 1s peak at 284.8 eV as internal reference). The data processing and peaks deconvolution were performed using the Casa XPS software (splitting of the Cu 2p $_{3/2}$ and Cu 2p $_{1/2}$ signals was 19.8 eV; peaks were fitted by a Gaussian–Lorentzian component wave-form (GL = 30 for Cu(I) and GL = 80 for Cu(II)). Laser Raman spectroscopy (LRS) was conducted with a Horiba-Jobin–Yvon coupled to an Olympus confocal microscope (30 mW, 532 nm). Scanning electron microscopy (SEM) was performed with a JEOL JSM-35C instrument (20 kV; Au coating). Electron probe micro analyses (EPMA) were performed with a dispersive instrument coupled to the SEM (graphite coating).

3. Results and discussion

3.1. Microorganisms growth assays

Fig. 1 shows the growth curves for the microorganisms in the culture media added with HKUST-1. The control growth curves are also depicted. The curves using trimesic acid (not shown) were similar to the control curves. It should be remarked that in all experiments there were no significant differences in the initial conidia concentration. A remarkable biocidal activity of the MOF was

noticed for both microorganisms, *S. cerevisiae* being the most sensitive and achieving a fast reduction in the viable counts (Fig. 1a). After 24 h of incubation a total inhibition of the growth was observed while for the control the colony reached $7.5 \pm 0.2 \log \text{ CFU mL}^{-1}$. For *G. candidum* there was also a strong inhibition effect which increased with incubation time. A reduction from 6.2 ± 0.1 to $1.3 \pm 0.1 \log \text{ CFU mL}^{-1}$ was observed in the microorganism development after 48 h. The marked decreasing logarithmic profile of the growth curves obtained with the addition of HKUST-1 both for *S. cerevisiae* and *G. candidum* indicates a strong inhibitory effect caused by the MOF. In order to try to establish the mode of antifungal action, physicochemical studies were conducted.

3.2. Physicochemical studies

Fig. 2a shows the XRD pattern of HKUST-1 simulated from crystallographic data (CCDC112954) and it can be observed that the as-synthesized HKUST-1 (Fig. 2b) presented all the indexed diffraction signals for this material [12]. The lower relative intensity of the (002) reflection with respect to that of (222) compared with the simulated pattern is due to a partial hydration HKUST-1 [13]. Moreover, the BET surface area and the micropore volume (from N $_2$ adsorption isotherms) were $608 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ and $0.253 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$, respectively, indicating a correct solvent evacuation that leaves the MOF porosity available. Meanwhile, the XRD patterns of the MOF upon 24 and 48 h in MEB (Fig. 2c and d) showed a decrease in the intensity of all signals which increased with contact time, indicating a gradual loss of the MOF crystallinity (Table 1). It should be noticed that none of the analyzed samples presented obvious signals from bulk CuO or Cu $_2$ O, which could be possible by-products of the MOF degradation. On the other hand, the AAS

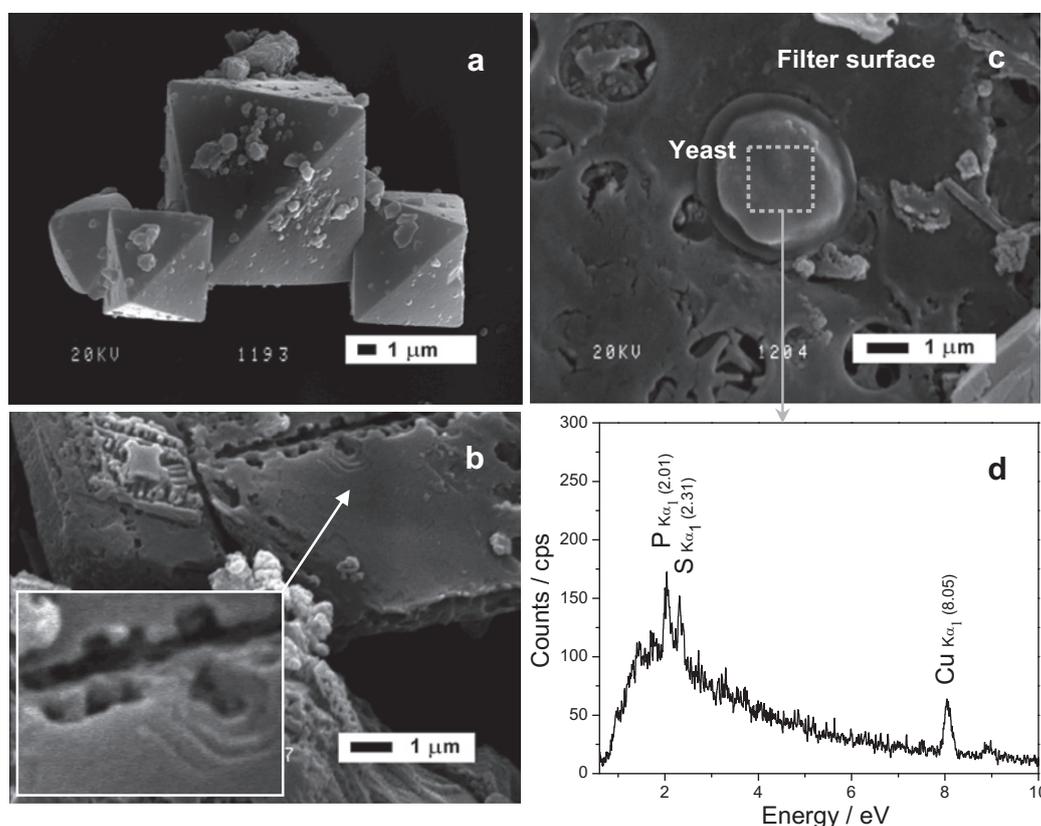


Fig. 4. SEM images of: (a) fresh HKUST-1 crystals; (b) HKUST-1 crystals recovered after 24 h of the growth assay; (c) specimen of *S. cerevisiae* after 24 h of the microbiological test with HKUST-1; (d) EPMA analysis in a small selected area on *S. cerevisiae* (indicated in Fig. 4c).

analyses of the filtrates of these samples indicated a leaching of Cu from the MOF which reached a concentration almost invariant after 24 h (Table 1). However, for a MOF sample maintained in water for 48 h, the amount of dissolved copper was of 39 ppm. The higher MOF degradation in MEB should be related to certain components of the culture medium that promoted the dissolution of Cu.

XPS spectra of a fresh HKUST-1 sample (Fig. 3a) presented two main signals from Cu 2p_{3/2} and Cu 2p_{1/2} levels with BE of 933.6 and 953.4 eV, respectively, which are characteristic of Cu(II). In addition, the presence of satellite peaks confirmed this species [14,15]. Whereas for the used samples (HK-24 and HK-48), the 2p signals became slender (i.e. the FWHM decreased) and the intensities of the satellite peaks were reduced. It is known that 2p signals of Cu(I) are narrower than those of Cu(II) and also that Cu(I) has no satellite peaks [15]. The higher ratios of the 2p_{3/2} signal and their satellite peak for used samples (Table 1) coupled with the narrowing of their 2p signals indicates Cu(I) on the MOF surface. In fact, the bands found at BE near 933 and 952 eV are typical of Cu(I). Moreover, a higher enrichment of surface Cu(I) for the HK-48 sample was observed (Table 1). The presence of Cu(I) in the used samples was confirmed by LRS (Fig. 3b). Despite the high fluorescence due to organic residues, the typical Raman signal of a second-order overtone at 208 cm⁻¹ from Cu₂O [16] was observed. In addition, a marked decrease MOF signals due to a loss of the structural integrity was noticed. The vibrational modes of Cu(II) in the MOF (504 cm⁻¹; 200–170 cm⁻¹) and from out-of-plane ring (C–H) bending (746 cm⁻¹; 829 cm⁻¹) [17], were reduced. The generation of such Cu(I) species was most likely caused by reducing components of the culture medium, such as sugars. In addition, the low partial pressure of O₂ under the test conditions could contribute to their stability. Then, this extra-framework copper in the amorphized structure of the MOF is available to be released to the culture medium, as determined by AAS.

The as-synthesized MOF crystals (Fig. 4a) showed a typical polyhedral morphology with a smooth surface [18]. Meanwhile, after being used for 24 h in the microbiological assays an eroded surface was observed, with craters that penetrated into the crystal (Fig. 4b). On the other hand, EPMA analysis in small selected areas of the microorganisms, as shown for *S. cerevisiae* (Fig. 4c), revealed the presence of Cu in the cell. Moreover, S and P from cellular components were also observed (Fig. 4d). It is known that Cu ions can bind to fungal cell walls, disrupting the transport of nutrients and inhibiting intracellular enzymes [19]. Moreover, fungal walls differ between them depending on the taxonomic group [20] that may explain the variable sensitivity to HKUST-1 for *S. cerevisiae* and *G. candidum*.

4. Conclusions

It was shown that HKUST-1 is a material that exerts a strong inhibitory activity against *S. cerevisiae* and *G. candidum*. The anti-fungal action is due to the ability of the MOF to release Cu ions from its own structure, which slowly degrades producing extra-framework surface Cu(I). The possibility of regulation of connectivity and type of bonds in MOFs show the potential of using other copper-based MOFs for a controlled-release rate of active copper ions.

Acknowledgements

The financial support from CONICET, ANPCyT and Universidad Nacional del Litoral is acknowledged. Thanks are also given to Eng. Fabio Fontanarrosa for the technical assistance and to Elsa I. Grimaldi for the English language editing.

References

- [1] A. Top, S. Ulku, *Appl. Clay Sci.* 27 (2004) 13–19.
- [2] Y. Zhou, M. Xia, Y. Ye, C. Hu, *Appl. Clay Sci.* 27 (2004) 215–218.
- [3] J.P. Ruparelia, A.K. Chatterjee, S.P. Duttagupta, S. Mukherji, *Acta Biomater.* 4 (2008) 707–716.
- [4] J. Ramyadevi, K. Jeyasubramanian, A. Marikani, G. Rajakumar, A. Rahuman, *Mater. Lett.* 71 (2012) 114–116.
- [5] S.A. Khan, N. Nishat, S. Parveen, R. Rasool, *Spec. Acta A* 81 (2011) 290–295.
- [6] C. Soykan, R. Coskun, S. Kirbag, *Eur. Polym. J.* 43 (2007) 4028–4036.
- [7] R.S. Kumar, S. Arunachalam, *Eur. J. Med. Chem.* 44 (2009) 1878–1883.
- [8] G. Férey, *Chem. Soc. Rev.* 37 (2008) 191–214.
- [9] A.C. McKinlay, R.E. Morris, P. Horcajada, G. Férey, R. Gref, P. Couvreur, C. Serre, *Angew. Chem. Int. Ed.* 49 (2010) 6260–6266.
- [10] M. Berchel, T. Le Gall, C. Denis, S. Le Hir, F. Quentel, C. Elléouet, T. Montier, J.M. Rueff, J.Y. Salaün, J.P. Haelters, G.B. Hix, P. Lehn, P.A. Jaffrès, *New J. Chem.* 35 (2011) 1000–1003.
- [11] W. Zhuang, D. Yuan, J.-R. Li, Z. Luo, H.-C. Zhou, S. Bashir, J. Liu, *Adv. Healthcare Mater.* 1 (2012) 225–238.
- [12] S.S.Y. Chui, S.M.F. Lo, J.P.H. Charmant, A.G. Orpen, I.D. Williams, *Science* 283 (1999) 1148–1150.
- [13] K. Schlichte, T. Kratzke, S. Kaskel, *Micropor. Mesopor. Mater.* 73 (2004) 81–88.
- [14] C.M. Chanquía, K. Sapag, E. Rodríguez-Castellón, E.R. Herrero, G.A. Eimer, *J. Phys. Chem. C* 114 (2010) 1481–1490.
- [15] M.C. Biesinger, L.W.M. Lau, A.R. Gerson, R.S.C. Smart, *Appl. Surf. Sci.* 257 (2010) 887–898.
- [16] H. Solache-Carranco, G. Juárez-Díaz, A. Esparza-García, M. Briseño-García, M. Galván-Arellano, J. Martínez-Juárez, G. Romero-Paredes, R. Peña-Sierra, *J. Lumin.* 129 (2009) 1483–1487.
- [17] C. Prestipino, L. Regli, J.G. Vitillo, F. Bonino, A. Damin, C. Lamberti, A. Zecchina, P.L. Solari, K.O. Kongshaug, S. Bordiga, *Chem. Mater.* 18 (2006) 1337–1346.
- [18] J. Gascon, S. Aguado, F. Kapteijn, *Micropor. Mesopor. Mater.* 113 (2008) 132–138.
- [19] M.H. Freeman, C.R. MacIntyre, *For. Prod. J.* 58 (2008) 6–27.
- [20] M. González, P.W.J. de Groot, F.M. Klis, P.N. Lipke, in: O. Holst, P.J. Brennan, M. von Itzstein (Eds.), *Microbial Glycobiology*, Elsevier, Netherlands, 2009, pp. 169–183.