

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos Autor.

CICESE@ 2022. Todos los derechos reservados

**Centro de Investigación Científica y de Educación  
Superior de Ensenada, Baja California**



---

**Maestría en Ciencias  
en Nanociencias**

---

**Captura e inactivación de un modelo de SARS-CoV-2 mediante  
nanomateriales**

Tesis  
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias

Presenta:

**Kevin Alexis Hernández Hernández**

Ensenada, Baja California, México  
2022

Tesis defendida por  
**Kevin Alexis Hernández Hernández**

y aprobada por el siguiente Comité

---

**Dr. Rubén Darío Cadena Nava**  
Director de tesis

**Dr. Sergio Fuentes Moyado**

**Dra. Jimena Carrillo Tripp**

**Dr. Josué Elías Juárez Onofre**



---

**Dra. Catalina López Bastidas**  
Coordinadora del Posgrado en Nanociencias

---

**Dr. Pedro Negrete Regagnon**  
Director de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Kevin Alexis Hernández Hernández** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Nanociencias.

### **Captura e inactivación de un modelo de SARS-CoV-2 mediante nanomateriales**

Resumen aprobado por:

---

Dr. Rubén Darío Cadena Nava  
**Director de tesis**

El SARS-CoV-2 es actualmente uno de los virus más contagiosos que existen y el causante de la peor pandemia de este siglo que aún estamos afrontando, la COVID-19. Para evitar la propagación e infección en la población y proteger a los trabajadores de la salud, debemos de contar con un equipo de protección personal adecuado como lo son las mascarillas. La nanotecnología juega un papel muy importante en el desarrollo de equipo de protección personal adecuado y eficiente, a través del uso de materiales inteligentes con capacidad antiviral y antibacteriana, capaces de desinfectar superficies y que puedan ser incorporados en las mascarillas. De tal manera, una de las estrategias para combatir a los virus son los nanomateriales, debido a su tamaño, gran área superficial en relación con su volumen, y a sus propiedades químicas y físicas a esta escala. En este proyecto se estudiaron dos nanomateriales diferentes, zeolitas y carbonitruros para atrapar e inactivar virus, usando como modelo dos virus de plantas, el virus del mosaico del bromo (BMV) y el virus del moteado clorótico del caupí (CCMV); y el bacteriófago MS2. Además, se estudió su efecto antibacteriano contra bacterias gram positivas como *Staphylococcus aureus* y *Bacillus pumilus* y gram negativas como *Escherichia coli*. Se estudiaron 3 estructuras de zeolitas: chabazita, mordenita y faujasita. De igual manera se estudiaron carbonitruros que contenían diferentes concentraciones de cobre y plata. En este trabajo se hizo un screening de 46 nanomateriales. Entre los mejores nanomateriales se tuvieron aquellos que tenían plata y cobre en su estructura, sobre todo la faujasita con plata fue uno de los mejores candidatos, además de la zeolita con  $\text{TiO}_2$  y Praseodimio. Así mismo, se determinó el efecto fotocatalítico del  $\text{TiO}_2$  impregnado en diferentes textiles mediante microscopía electrónica de barrido. Se observó que a 5 minutos de exposición a luz UV con una longitud de onda de 254 nm, las bacterias no eran visibles. También, mediante espectrofotometría UV se determinó el porcentaje de adsorción del virus en las zeolitas y se observó que la faujasita que contenía plata a una concentración de 1 mg/ml adsorbió virus BMV hasta casi un 50%, a diferencia de la faujasita normal. Finalmente, en la búsqueda de nuevos materiales que puedan capturar e inhibir los virus, se estudió mediante acoplamiento molecular *in silico* la unión de diversos polímeros y polisacáridos a las proteínas virales del BMV, CCMV, MS2 y la RBD del SARS-CoV-2, siendo el quitosano y el dextrano los mejores candidatos con energías de unión de -7 y -6.2 kcal/mol, respectivamente.

**Palabras clave:** nanomateriales, mascarillas, actividad antibacteriana, actividad antiviral

Abstract of the thesis presented by **Kevin Alexis Hernández Hernández** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Nanoscience.

### **Capture and inactivation of a SARS-CoV-2 model using nanomaterials**

Abstract approved by:

---

Dr. Rubén Darío Cadena Nava  
**Thesis Director**

SARS-CoV-2 is currently one of the most contagious viruses in existence and the cause of the worst pandemic of this century that we are still facing, COVID-19. To prevent spread and infection in the population and protect health workers, we depend on having adequate personal protective equipment such as masks. Nanotechnology plays a very important role in the development of adequate and efficient personal protective equipment, through intelligent materials with antiviral and antibacterial capacity, capable of disinfecting surfaces and that can be incorporated into masks. Thus, one of the strategies to combat viruses are nanomaterials, due to their size, large surface area in relation to their volume, and their chemical and physical properties at this scale. In this project, two different nanomaterials, zeolites and carbonitrides, were studied to trap and inactivate viruses, using as a model two plant viruses, bromine mosaic virus (BMV) and cowpea chlorotic mottle virus (CCMV); and the bacteriophage MS2. In addition, its antibacterial effect against gram-positive bacteria such as *Staphylococcus aureus* and *Bacillus pumilus* and gram-negative bacteria such as *Escherichia coli* was studied. Three zeolite structures were studied: chabazite, mordenite and faujasite. Likewise, carbonitrides containing different concentrations of copper and silver were studied. In this work, a screening of 46 nanomaterials was made. Among the best nanomaterials were those that had silver and copper in their structure, especially faujasite with silver was one of the best candidates, in addition to zeolite with TiO<sub>2</sub> and Praseodymium. Likewise, the photocatalytic effect of TiO<sub>2</sub> impregnated in different textiles was determined by scanning electron microscopy. It was observed that after 5 minutes of exposure to UV light with a wavelength of 254 nm, the bacteria were not visible. Also, by means of UV spectrophotometry, the percentage of adsorption of the virus in the zeolites was determined and it was observed that the faujasite containing silver at a concentration of 1 mg/ml adsorbed BMV virus up to almost 50%, unlike the normal faujasite. Finally, in the search for new materials that can capture and inhibit viruses, the binding of various polymers and polysaccharides to the viral proteins of BMV, CCMV, MS2 and the RBD of SARS-CoV-2 was studied by means of *in silico* molecular docking, being chitosan and dextran the best candidates with binding energies of -7 and -6.2 kcal/mol, respectively.

**Keywords:** nanomaterials, masks, antibacterial activity, antiviral activity

## **Dedicatoria**

A mi padre Julio, mi madre Belén, mis tíos César y Rufi, mis hermanas Evelin y Julia, toda mi familia y mis amigos. Son el pilar que me sostiene.

“Concédeme la serenidad para aceptar las cosas que no puedo cambiar, valor para cambiar las cosas que puedo y sabiduría para reconocer la diferencia”. —Reinhold Niebuhr

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme el apoyo económico para poder dedicarme tiempo completo a la realización del posgrado.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) y al Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNyN-UNAM) por proporcionarme sus instalaciones y recursos para llevar a cabo esta investigación, gracias por todos los cursos impartidos y toda su enseñanza que hoy me llevo, gracias a todos sus investigadores y profesores.

Al proyecto PAPIIT IV100121 “Preparación de máscaras de protección contra el virus SARS-CoV-2 causante de la enfermedad COVID-19”, por proporcionarme los químicos, materiales y nanomateriales que se utilizaron para este proyecto.

A mi director de tesis el Dr. Rubén Cadena por haberme guiado a lo largo de este trabajo y aceptarme nuevamente como su estudiante, gracias por brindarme libertad a lo largo de este proyecto, por todos sus consejos y todas sus enseñanzas, gracias por inspirarme todos los días con su gran entusiasmo por la ciencia.

A mi comité de tesis: Dr. Sergio Fuentes Moyado, Dra. Jimena Carrillo Tripp y Dr. Josué Elías Juárez Onofre, por todos sus comentarios durante los avances de tesis, que permitieron mejorar la estructura de este trabajo, gracias por formar parte de esto. También un agradecimiento especial a los grupos del Dr. Sergio Fuentes Moyado, Dr. Luis Cedeño Caero, Dr. Vitalii Petranovskii, Dr. Gabriel Alonso Núñez y Dr. Uriel Caudillo Flores, por su apoyo con los nanomateriales estudiados.

Al departamento de Bionanotecnología por proveerme sus instalaciones y, en especial al técnico laboratorista Itandehui Betanzo por todo su tiempo, muchas gracias Ita. Muchas gracias también a Ceci, Paola y Sofía.

Al técnico de SEM del Departamento de Óptica, Alonso Cordero Humberto Fabián por las imágenes que obtuvimos de microscopía. A la Dra. Gabriela Guzmán Navarro por su apoyo en el análisis de los virus por medio de TEM.

Al Dr. Rees Garman de la Universidad Estatal de San Diego (SDSU) por proporcionarme el fago MS2 y la cepa que sirvió como hospedera *E. coli* (C3000).

# Tabla de contenido

|                                                                                             | Página    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Resumen en español.....                                                                     | ii        |
| Resumen en inglés.....                                                                      | iii       |
| Dedicatoria .....                                                                           | iv        |
| Agradecimientos.....                                                                        | v         |
| Lista de figuras.....                                                                       | viii      |
| Lista de tablas .....                                                                       | xi        |
| <b>Capítulo 1. Introducción .....</b>                                                       | <b>1</b>  |
| 1.1 Antecedentes .....                                                                      | 3         |
| 1.1.1 Virus y coronavirus.....                                                              | 3         |
| 1.1.2 SARS-CoV-2.....                                                                       | 3         |
| 1.1.3 Estrategias para inactivar la replicación del virus SARS-CoV-2 .....                  | 6         |
| 1.1.4 Efecto antiviral potencial de los nanomateriales .....                                | 7         |
| 1.1.5 Virus como modelo de estudio .....                                                    | 8         |
| 1.1.6 Nanomateriales .....                                                                  | 10        |
| 1.1.7 Superficies superhidrofóbicas .....                                                   | 12        |
| 1.1.8 Actividad fotocatalítica de los nanomateriales .....                                  | 13        |
| 1.1.9 Cubrebocas como protección ante microbios .....                                       | 14        |
| 1.1.10 Tipos de bacterias.....                                                              | 15        |
| 1.1.11 Propiedades bactericidas de los nanomateriales.....                                  | 15        |
| 1.1.12 Análisis por acoplamiento molecular.....                                             | 16        |
| 1.2 Hipótesis.....                                                                          | 18        |
| 1.3 Objetivos .....                                                                         | 18        |
| 1.3.1 Objetivo general.....                                                                 | 18        |
| 1.3.2 Objetivos específicos.....                                                            | 18        |
| <b>Capítulo 2. Metodología.....</b>                                                         | <b>19</b> |
| 2.1 Actividad antibacteriana de los nanomateriales en medio líquido.....                    | 19        |
| 2.2 Pruebas de susceptibilidad bacteriana .....                                             | 19        |
| 2.3 Pruebas de actividad antibacteriana en telas impregnadas con TiO <sub>2</sub> NPs ..... | 20        |
| 2.3.1 Estudio bactericida <i>in situ</i> por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) ..... | 20        |
| 2.4 Producción de partículas de BMV y CCMV.....                                             | 21        |

|                                |                                                                                                        |           |
|--------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.4.1                          | Inoculación de plantas .....                                                                           | 21        |
| 2.4.2                          | Extracción de partículas BMV y CCMV .....                                                              | 21        |
| 2.4.3                          | Purificación de partículas de BMV y CCMV .....                                                         | 22        |
| 2.5                            | Producción del bacteriófago MS2 .....                                                                  | 22        |
| 2.5.1                          | Infección de células hospederas .....                                                                  | 22        |
| 2.5.2                          | Cuantificación de MS2.....                                                                             | 23        |
| 2.6                            | Atrapamiento de virus con nanomateriales.....                                                          | 24        |
| 2.7                            | Acoplamiento molecular .....                                                                           | 24        |
| 2.7.1                          | Validación de acoplamientos moleculares.....                                                           | 24        |
| <b>Capítulo 3.</b>             | <b>Resultados .....</b>                                                                                | <b>26</b> |
| 3.1                            | Actividad antibacteriana de los nanomateriales en medio líquido.....                                   | 26        |
| 3.1.1                          | Actividad antibacteriana de zeolitas .....                                                             | 26        |
| 3.1.2                          | Actividad antibacteriana de carbonitruros .....                                                        | 32        |
| 3.2                            | Pruebas de susceptibilidad bacteriana .....                                                            | 33        |
| 3.3                            | Pruebas de inhibición en telas impregnadas con TiO <sub>2</sub> NPs .....                              | 35        |
| 3.4                            | Pruebas de actividad antibacteriana <i>in situ</i> en telas impregnadas con TiO <sub>2</sub> NPs ..... | 36        |
| 3.5                            | Purificación de BMV y CCMV.....                                                                        | 39        |
| 3.6                            | Producción del bacteriófago MS2 .....                                                                  | 41        |
| 3.7                            | Actividad de adsorción viral de los nanomateriales .....                                               | 42        |
| 3.8                            | Búsqueda de materiales para atrapar virus por medio de acoplamiento molecular .....                    | 44        |
| <b>Capítulo 4.</b>             | <b>Discusión.....</b>                                                                                  | <b>47</b> |
| <b>Capítulo 5.</b>             | <b>Conclusiones .....</b>                                                                              | <b>50</b> |
| <b>Literatura citada .....</b> |                                                                                                        | <b>51</b> |
| <b>Anexos .....</b>            |                                                                                                        | <b>57</b> |

## Lista de figuras

| Figura                                                                                                                                                                                                                          | Página |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1 Evaluación propuesta para el desarrollo de mejores mascarillas.....                                                                                                                                                           | 2      |
| 2 Representación del virión del SARS-CoV-2 .....                                                                                                                                                                                | 4      |
| 3 Ciclo de replicación del SARS-CoV-2.....                                                                                                                                                                                      | 5      |
| 4 Ciclo de vida viral del SARS-CoV-2 y posibles blancos de los nanomateriales.....                                                                                                                                              | 6      |
| 5 Representación del virión del Bromovirus.....                                                                                                                                                                                 | 9      |
| 6 Representación del virión de Emesvirus.....                                                                                                                                                                                   | 9      |
| 7 Nanomateriales utilizados en el proyecto. Se utilizaron tres estructuras diferentes de zeolitas con diferentes concentraciones de metales. Los carbonitruros se doparon con diferentes concentraciones de plata y cobre ..... | 10     |
| 8 Estructuras de chabazita, mordenita y faujasita.....                                                                                                                                                                          | 11     |
| 9 Estructura de (a) triazina y (b) tris-s-triazina (heptazina) de g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> .....                                                                                                                         | 12     |
| 10 Diagrama tridimensional que muestra las interacciones de acoplamiento molecular de (a) Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> y (b) Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> con los aminoácidos clave en el S-RBD del SARS-CoV-2 .....        | 17     |
| 11 Ensayos que se llevaron a cabo para determinar las propiedades antibacterianas de los nanomateriales .....                                                                                                                   | 26     |
| 12 Porcentaje de inhibición de <i>E. coli</i> a 16 h con FAU con zinc y plata y MOR con Zn, Fe y Cu ...                                                                                                                         | 27     |
| 13 Crecimiento de <i>E. coli</i> hasta 24 h con FAU CBV-600 a la izquierda, a la derecha se muestra el comportamiento con el NM y la determinación de la IC <sub>50</sub> .....                                                 | 28     |
| 14 Porcentaje de inhibición de <i>S. aureus</i> a 16 h con FAU con zinc y plata, y MOR con Zn, Fe y Cu .....                                                                                                                    | 29     |
| 15 Crecimiento de <i>E. coli</i> con AgCBV-600 (izquierda) y crecimiento de <i>S. aureus</i> con AgCBV-600 (derecha).....                                                                                                       | 29     |
| 16 Porcentaje de inhibición de <i>E. coli</i> a 16 h con zeolitas chabazita .....                                                                                                                                               | 30     |
| 17 Porcentaje de inhibición de <i>S. aureus</i> a 16 h con zeolitas chabazita.....                                                                                                                                              | 31     |
| 18 Crecimiento de <i>E. coli</i> con CTP15 (izquierda) y con ZC25 (derecha).....                                                                                                                                                | 32     |
| 19 Porcentaje de inhibición de <i>E. coli</i> a 16 h con carbonitruros, matrices primarias T1, T2 y T3. *El carbonitruro T3 fue el único que se dopó con Ag y Cu a diferentes concentraciones. ....                             | 33     |

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |    |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 20 | Porcentaje de inhibición de <i>S. aureus</i> a 16 h con carbonitruros, matrices primarias T1, T2 y T3. *El carbonitruro T3 fue el único que se dopó con Ag y Cu a diferentes concentraciones. ....                                                                                                                                                                          | 34 |
| 21 | Pruebas de susceptibilidad bacteriana <i>E. coli</i> (izquierda), <i>S. aureus</i> (derecha).....                                                                                                                                                                                                                                                                           | 34 |
| 22 | Actividad fotocatalítica de TiO <sub>2</sub> NPs impregnadas en tela a diferentes tiempos de radiación con una longitud de onda de 254 nm .....                                                                                                                                                                                                                             | 35 |
| 23 | <i>E. coli</i> sobre textil indiolino blanco. A la izquierda un aumento de 370X, a la derecha un aumento de 2000X.....                                                                                                                                                                                                                                                      | 36 |
| 24 | <i>E. coli</i> sobre textil indiolino blanco tratado con TiO <sub>2</sub> NPs sin exposición a la luz UV. A la izquierda un aumento de 370X, a la derecha un aumento mayor de 1400X .....                                                                                                                                                                                   | 36 |
| 25 | <i>B. pumilus</i> sobre textil indiolino blanco. A la izquierda un aumento de 270X, a la derecha un aumento mayor de 2000X.....                                                                                                                                                                                                                                             | 37 |
| 26 | <i>B. pumilus</i> sobre textil indiolino blanco tratado con TiO <sub>2</sub> NPs sin exposición a la luz UV. A la izquierda un aumento de 370X, a la derecha un aumento mayor de 1300X .....                                                                                                                                                                                | 37 |
| 27 | A la izquierda <i>E. coli</i> sobre textil indiolino blanco impregnado con TiO <sub>2</sub> NPs a un tiempo de exposición total de 5 minutos con UV (254 nm) a un aumento de 2000X; a la derecha <i>B. pumilus</i> sobre textil indiolino blanco impregnado con TiO <sub>2</sub> NPs a un tiempo de exposición con UV por 5 minutos, a un aumento de 370X. ....             | 38 |
| 28 | <i>S. aureus</i> y bacterias gram (-) sobre textil indiolino blanco sin exposición a luz UV. A la izquierda un aumento de 1300X, a la derecha un aumento mayor de 4500X. ....                                                                                                                                                                                               | 38 |
| 29 | <i>S. aureus</i> y bacterias gram (-) sobre textil indiolino blanco tratado con TiO <sub>2</sub> NPs sin exposición a la luz UV. A la izquierda un aumento de 906X, a la derecha un aumento mayor de 3500X. ....                                                                                                                                                            | 39 |
| 30 | Ensayos que se llevaron a cabo para determinar las propiedades antivirales de los nanomateriales .....                                                                                                                                                                                                                                                                      | 39 |
| 31 | Diámetro hidrodinámico obtenido para BMV y CCMV, debajo se muestran los espectros de absorción por UV-Vis.....                                                                                                                                                                                                                                                              | 40 |
| 32 | Micrografías electrónicas de transmisión de partículas de BMV. a) Magnificación a 40kX y b) 70kX.....                                                                                                                                                                                                                                                                       | 40 |
| 33 | Micrografías electrónicas de transmisión de partículas de CCMV. a) Magnificación a 40kX y b) 70kX.....                                                                                                                                                                                                                                                                      | 41 |
| 34 | Cuantificación en placa del bacteriófago MS2. a) Placas con diluciones 10 <sup>-2</sup> , 10 <sup>-4</sup> , 10 <sup>-6</sup> y 10 <sup>-8</sup> en donde era difícil poder llevar a cabo el conteo de colonias a diferencia de b) una dilución en placa de 10 <sup>-5</sup> en donde se cuantificó el número de colonias obteniendo un pfu de 10 <sup>8</sup> por mL. .... | 41 |
| 35 | Micrografías TEM de partículas del virus MS2. a) Magnificación a 40k y b) 70k.....                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 42 |
| 36 | Porcentaje de adsorción de partículas de BMV por diferentes nanomateriales. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 43 |

|    |                                                                                                                                                                                       |    |
|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 37 | Porcentaje de adsorción de partículas de CCMV por diferentes nanomateriales.....                                                                                                      | 43 |
| 38 | Porcentaje de adsorción de partículas de MS2 por diferentes nanomateriales. ....                                                                                                      | 44 |
| 39 | Energías de unión obtenidas mediante acoplamiento molecular para RBD, MS2, CCMV y BMV.<br>.....                                                                                       | 45 |
| 40 | Interacción de los compuestos acoplados con la proteína RBD del SARS-CoV-2 (PDB: 6LZG). 46                                                                                            |    |
| 41 | Porcentaje de inhibición de <i>E. coli</i> a 24 h con FAU con zinc y plata y MOR con Zn, Fe y Cu. ..                                                                                  | 58 |
| 42 | Porcentaje de inhibición de <i>S. aureus</i> a 24 h con FAU con zinc y plata y MOR con Zn, Fe y Cu.<br>Las muestras con MOR se hicieron con el microorganismo <i>B. pumilus</i> ..... | 58 |
| 43 | Porcentaje de inhibición de <i>E. coli</i> a 24 h con zeolitas chabazita. ....                                                                                                        | 59 |
| 44 | Porcentaje de inhibición de <i>S. aureus</i> a 24 h con zeolitas chabazita.....                                                                                                       | 59 |
| 45 | Porcentaje de inhibición de <i>E. coli</i> a 24 h con carbonitruros, matrices primarias T1, T2 y T3. 60                                                                               |    |
| 46 | Porcentaje de inhibición de <i>S. aureus</i> a 24 h con carbonitruros, matrices primarias T1, T2 y T3.<br>.....                                                                       | 60 |

## Lista de tablas

| Tabla                                                                    | Página |
|--------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1 Textiles impregnados con $\text{TiO}_2$ NPs .....                      | 20     |
| 2 Polímeros y polisacáridos propuestos para acoplamiento molecular. .... | 25     |
| 3 Energías de unión proteína-ligando, expresadas en kcal/mol. ....       | 61     |

## Capítulo 1.      **Introducción**

---

En noviembre de 2019, se presentaron diversos casos de neumonía de procedencia desconocida en China y a inicios de enero de 2020 se anunció oficialmente que eran provocados por una nueva cepa de coronavirus. Posteriormente, se denominó al virus como coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2) y se definió como el agente causante de la patología coronavirus 2019 (COVID-19). Pese a los intentos intensivos y a gran escala para contener la enfermedad en China, el virus se extendió por todo el planeta en un periodo récord, por lo cual la Organización Mundial de la Salud (OMS) la declaró una pandemia global el 11 de marzo de 2020 (Ludwig y Zarbock, 2020). La historia contemporánea ha visto la propagación de otras pandemias virales como la gripe H2N2 (1956-1958), la gripe H3N3 (1968), el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) con su pico más alto registrado en 2004 con un deceso de 1.84 millones de personas, el SARS y H1N1 (2009), mientras que el síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS) de 2012 y el Ébola de 1975 aún se encuentran en una fase prepandémica (Reina et al., 2020).

A partir de que se declaró una pandemia mundial, la enfermedad de COVID-19 ha devastado a la mayoría de los países, colapsando sus sistemas de salud. Además, esta pandemia ha causado la pérdida de empleos y cierres prolongados o definitivos de empresas, ocasionando un efecto dominó en la economía mundial. Aun cuando se tiene una mejor comprensión del SARS-CoV-2 y el manejo de COVID-19, la propagación de este virus se ha convertido en un asunto de creciente inquietud, debido a que el SARS-CoV-2 continúa ocasionando estragos en todo el mundo, y muchos países padecen una segunda o cuarta ola de brotes de esta patología viral atribuida primordialmente a la aparición de variantes del virus (Casella et al., 2021).

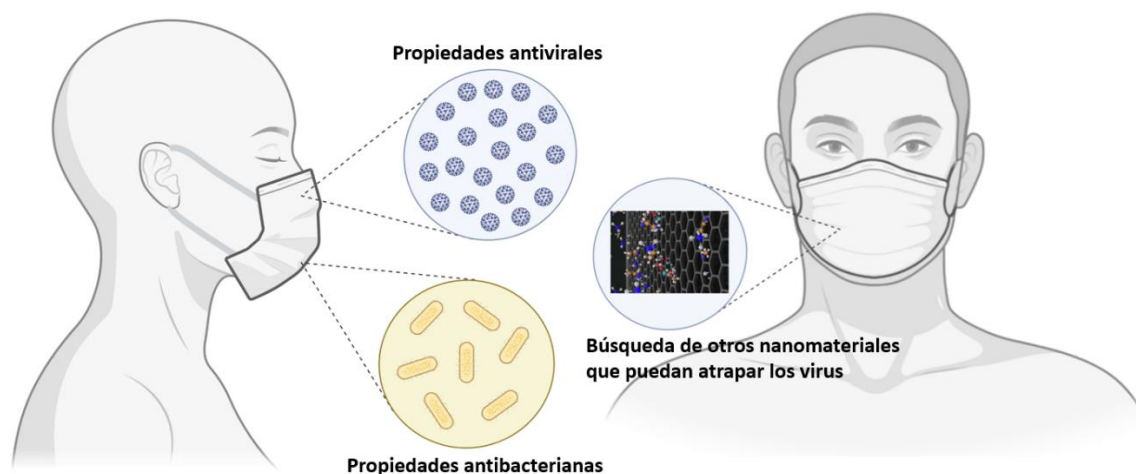
De acuerdo con Wilson y Zumla, (2019) se deben de considerar tres aspectos para frenar la propagación de COVID-19: controlar la fuente de infección, cortar las vías de transmisión y proteger a las personas susceptibles. Los virus y bacterias pueden ser transportados por el aire y concentrarse en una matriz líquida, lo que evita su daño por secado y facilita la propagación. Es por eso que las mascarillas juegan un rol fundamental en la prevención del SARS-CoV-2 y enfermedades que se transmiten por aire.

Una estrategia que se ha estudiado en conjunto a las mascarillas es el uso de nanomateriales, lo cual implica la explotación de materiales, dispositivos o metodologías en la escala nanométrica. En general, el desarrollo de nanomateriales se divide en dos áreas principales: síntesis de nuevos nanomateriales y desarrollo de dispositivos para investigar su efecto en sistemas biológicos (Steinmetz y Evans, 2007). Dentro del sin número de posibles aplicaciones de los nanomateriales, una de sus posibilidades es su uso

para bloquear la propagación viral. Los nanomateriales pueden utilizarse en diferentes etapas de la infección viral: bloquear la entrada del virus, obstaculizar la interacción con células hospederas infectadas y modular las respuestas inmunes. Algunos nanomateriales debido a su composición central (por ejemplo, óxidos metálicos, metales nobles), pueden tener una importante actividad antiviral bloqueando proteínas específicas de la cápside o desregulando la homeostasis radical de las partículas virales. Además, la funcionalización de su superficie puede aumentar sensiblemente la actividad antiviral del nanomaterial, al imitar las células hospederas permitiendo de esta manera atrapar eficientemente a los virus (L. Chen y Liang, 2020).

Por otra parte, se conoce que la boca humana contiene uno de los microbiomas más diversos del cuerpo humano, incluidos virus, hongos y bacterias. Y en este sentido los nanomateriales también pueden ser utilizados para evitar el crecimiento de bacterias. Azam et al., (2012) probaron nanomateriales de óxidos metálicos contra bacterias gram positivas y gram negativas y se observó que el ZnO mostraba la mayor actividad antibacteriana.

Considerando lo anteriormente expuesto, en este trabajo se estudiaron y evaluaron nanomateriales para atrapar virus que afecten nuestra salud, tomando como modelo diferentes virus; dos virus de plantas: el virus del mosaico del bromo (BMV) y el virus del moteado clorótico del caupí (CCMV), y el bacteriófago MS2. Además, se evaluó la actividad antibacteriana de estos nanomateriales, con la finalidad de impregnarlos en telas y para la posible fabricación de cubrebocas. Por otro lado, de manera *in silico* se realizó la búsqueda de otros materiales poliméricos y polisacáridos que pudieran atrapar diferentes modelos de virus como una alternativa de otro tipo de nanomateriales antivirales (Figura 1).



**Figura 1.** Evaluación propuesta para el desarrollo de mejores mascarillas. Se espera que estas mascarillas puedan, además de atrapar e inactivar virus, tener propiedades antibacterianas. Figura creada con BioRender.com.

## 1.1 Antecedentes

Las infecciones virales representan un importante problema de salud pública, con impactos negativos no solo en la atención médica sino también en numerosos aspectos socioeconómicos. Como parte de esta tesis se hace la revisión acerca de los virus, nanomateriales utilizados y el acoplamiento molecular para la búsqueda de nanomateriales antivirales. El acoplamiento molecular es una técnica que predice la orientación preferida, la afinidad y la interacción de un ligando en el sitio de unión de una proteína. Estos modelos nos ayudan a predecir si una molécula pudiera ser un buen candidato o no para atrapar virus.

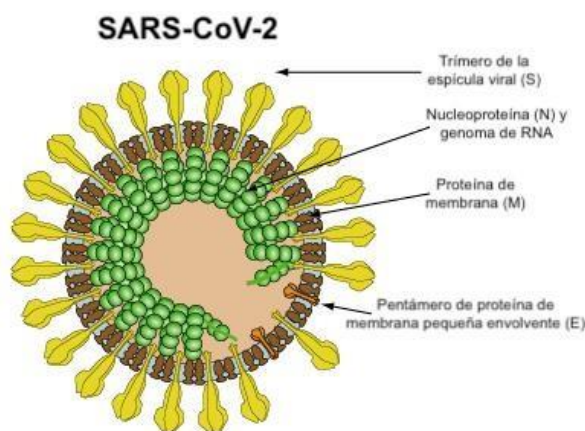
### 1.1.1 Virus y coronavirus

Los virus pueden clasificarse como virus no envueltos, en donde el genoma está rodeado por una cápside proteica; y envueltos, donde la nucleoproteína está rodeada por una envoltura de membrana que contiene proteínas y lípidos (Reddy y Sansom, 2016).

Los coronavirus (orden *Nidovirales*, familia *Coronaviridae*, subfamilia *Coronavirinae*) son virus envueltos con un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo. Tienen tamaños de genoma que oscilan entre 26 y 32 kilobases (kb) de longitud; los coronavirus tienen los genomas más grandes de los virus de ARN (Fauquet 2008). Se clasifican en cuatro géneros: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus*. Los coronavirus alfa y beta infectan a mamíferos, los coronavirus gamma infectan a especies de aves y los coronavirus delta infectan a especies de mamíferos y aves (Li, 2016). Todos los coronavirus codifican una glicoproteína de superficie, la proteína S, que media la entrada a la célula huésped al unirse al receptor celular.

### 1.1.2 SARS-CoV-2

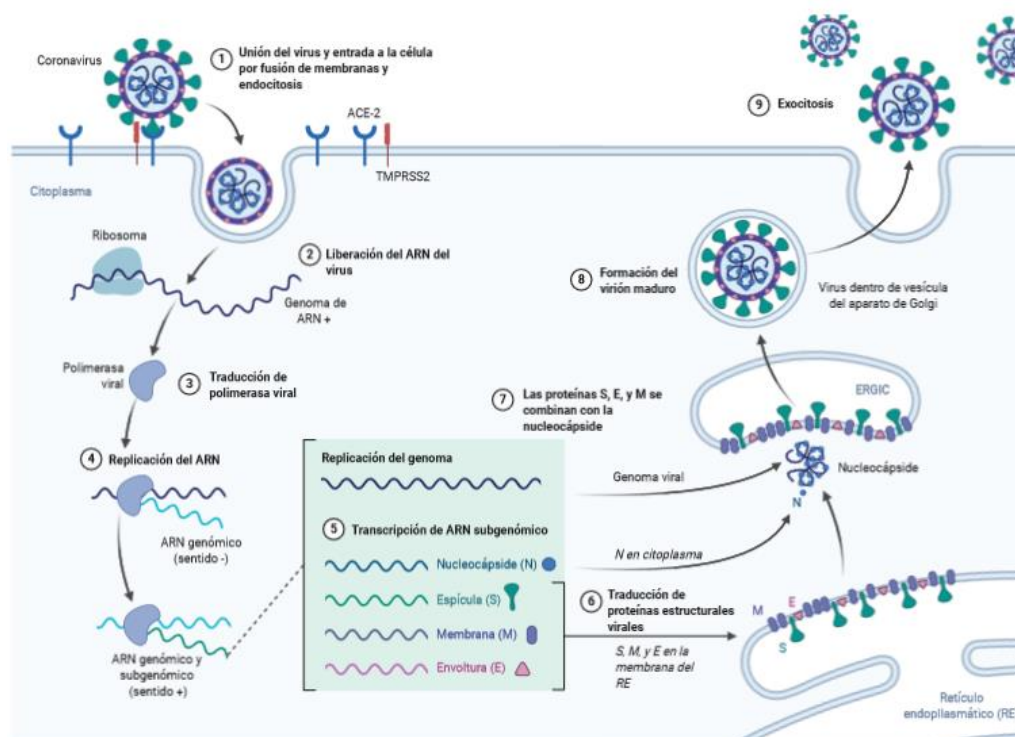
El genoma del SARS-CoV-2 es un ácido ribonucleico (RNA) monocatenario con polaridad positiva (ssRNA+), lo que significa que la secuencia que se encuentra dentro del virión corresponde al RNA mensajero (mRNA) (Schmidt et al., 2021). Además, tiene una serie de proteínas no estructurales, incluida la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp). El RNA viral codifica 4 proteínas estructurales esenciales (Figura 2), la proteína nucleocápside (N) que rodea el genoma del RNA y 3 proteínas de membrana: la glucoproteína S, la proteína de membrana (M) y la proteína de la envoltura (E) (ViralZone, 2020).



**Figura 2.** Representación del virión del SARS-CoV-2. La partícula viral tiene una envoltura, con morfología esférica de unos 120 nm de diámetro. El genoma del RNA se asocia con la nucleoproteína (N) para formar la nucleocápside (Imagen modificada de ViralZone, 2020).

La glicoproteína de la espícula de superficie (S) está ubicada en la superficie externa del virión, dando la apariencia de una corona, se divide en una subunidad S1 amino (N)-terminal, la cual facilita la incorporación del virus en la célula hospedera y una subunidad S2 carboxilo (C)-terminal que contiene un péptido de fusión, un dominio transmembrana y un dominio citoplásmico, que es responsable de la fusión de la membrana entre el virus y la célula (Du et al., 2009). La subunidad S1 del SARS-CoV-2 tiene un dominio de unión al receptor (RBD) que reconoce específicamente la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) como su receptor y emplea la serina proteasa celular TMPRSS2 para el cebado de la proteína S (Hoffmann et al., 2020; Scialo et al., 2020).

La naturaleza esencial de todos los virus es infectar una célula huésped, replicarse, empaquetar su ácido nucleico y salir de la célula; normalmente los virus se ensamblan a partir de subunidades repetitivas para formar arquitecturas ordenadas simétricamente y homogéneas, presentando diferentes tamaños y variedades de formas que van desde 18 a 500 nm para estructuras icosaédricas y más de 2  $\mu\text{m}$  de longitud para virus filamentosos o en forma de bastón (Douglas y Young, 2006). El SARS-CoV-2 tiene su entrada en las células del hospedero al unir la espícula del SARS-CoV-2 o la proteína S (S1) a los receptores ACE2 abundantes en el epitelio respiratorio (Figura 3), como las células epiteliales alveolares de tipo II. Además del epitelio respiratorio, los receptores ACE2 también se expresan en otros órganos como la parte superior del esófago, los enterocitos del íleon, las células del miocardio, las células tubulares proximales del riñón y las células uroteliales de la vejiga (Xu et al., 2020).



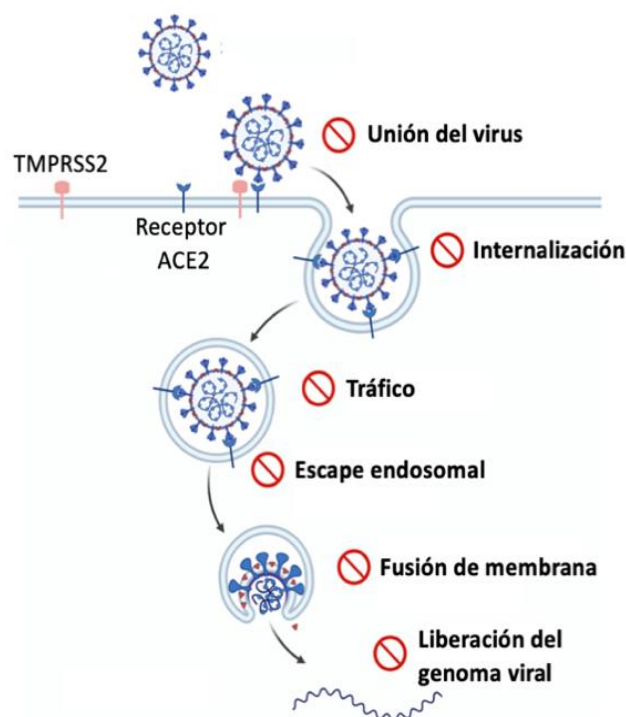
**Figura 3.** Ciclo de replicación del SARS-CoV-2. 1. La unión de la proteína S viral a los receptores del hospedero media la endocitosis del virus en la célula huésped, una vez que el virus ha entrado se lleva a cabo la fusión de la membrana del virus con la membrana endosomal (probablemente mediada por S2), 2. El genoma de ssRNA (+) se libera en el citoplasma y se da la síntesis y escisión proteolítica de la poliproteína replicasa (RdRp). 3 y 4. Un intermediario de dsRNA se sintetiza a partir del ssRNA genómico (+) para iniciar la transcripción/replicación, proporcionando así mRNA virales/nuevos genomas de ssRNA (+). 5 y 6. Después se lleva a cabo la síntesis de proteínas estructurales codificadas por ARNm subgenómicos para que se ensamblen en las membranas del RE y salgan de la célula por exocitosis. 7,8 y 9. Imagen tomada de Cascella et al., 2021.

A medida que se acelera la pandemia de la enfermedad de COVID-19, los sistemas de atención médica globales se han visto abrumados por pacientes potencialmente infecciosos que buscan pruebas y atención. La prevención de la propagación de la infección hacia y desde los trabajadores de la salud y los pacientes depende del uso eficaz de equipo de protección personal (EPP): guantes, mascarillas, purificadores de aire, gafas protectoras, protectores faciales y batas. Debido a la pandemia de COVID-19, el EPP es ahora un bien escaso y muy apreciado para atender a pacientes altamente infecciosos. Un aumento en el suministro de EPP en respuesta a esta nueva demanda requiere de un gran aumento en la fabricación de EPP, un proceso que llevará tiempo que muchos sistemas de atención médica no tienen, dado el rápido aumento de pacientes enfermos de COVID-19 (Livingston et al., 2020). El EPP es muy importante para prevenir la transmisión del virus. Por lo que, la búsqueda de una solución económica simple es imprescindible en todos los países en desarrollo, así como el proporcionar el EPP a todos para evitar la propagación de COVID-19.

Debido a estos hechos, existe una notable urgencia en el desarrollo de tratamientos virales para evitar el riesgo de nuevas pandemias. En particular, la posibilidad de tener materiales antivirales inteligentes capaces de desinfectar superficies de manera eficiente, bloquear la propagación viral, mejorar la supervivencia de personas infectadas y la inmunización de refuerzo son muy deseables (van Doremalen et al., 2020). Así también, la búsqueda y desarrollo de nuevos materiales que permitan la fabricación de EPP especializado es un reto a nivel mundial para afrontar la actual pandemia y las futuras pandemias, debido a la posible aparición de nuevos virus. En este sentido la nanotecnología y bionanotecnología juegan un papel clave en el desarrollo de EPP.

### 1.1.3 Estrategias para inactivar la replicación del virus SARS-CoV-2

En la Figura 4 se muestra el primer evento de la infección, la interacción del virus con las células diana que expresan ACE2, con la ayuda de TMPRSS2. Además, se muestran otras vías que se han estudiado para evitar la replicación del virus (Weiss et al., 2020).



**Figura 4.** Ciclo de vida viral del SARS-CoV-2 y posibles blancos de los nanomateriales. La proteína S del SARS-CoV-2 se une a los receptores de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) en la superficie de la célula hospedera. La TMPRSS2 facilita la entrada celular a través de la actividad de la proteasa. Posteriormente, las partículas virales se internalizan y entran en los endosomas, debido a su bajo pH, las partículas virales se descubren y el genoma viral se libera para la síntesis de proteínas. Imagen modificada de Weiss et al., 2020.

#### 1.1.4 Efecto antiviral potencial de los nanomateriales

La confirmación de la infección debe realizarse mediante la detección de secuencias conservadas de ácido ribonucleico (RNA) del SARS-CoV-2. La detección del RNA del virus se basa en las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real (rRT-PCR), dirigida a los genes N, E, S y RdRp (World Health Organization, 2020).

Tras el brote de SARS-CoV-2, cuando los pacientes con COVID-19 tosen, estornudan o incluso hablan, pueden arrojar partículas virales al aire, y la transmisión por esta vía puede darse a 1 m de distancia de los pacientes con COVID-19 (Ren et al., 2020). Los coronavirus humanos más comunes pueden sobrevivir o persistir en superficies de objetos hasta por un mes. Las muestras respiratorias y fecales pueden mantener la infectividad durante bastante tiempo a temperatura ambiente mientras que el riesgo de transmisión del SARS-CoV al tocar papel contaminado es bajo (Lai et al., 2005). Las estrategias preventivas adecuadas, como lavarse las manos y usar cubrebocas, son fundamentales para contener la propagación de COVID-19.

En un estudio más reciente por Ong et al., (2020), se evaluó la contaminación del aire, superficies y el equipo de protección personal por el SARS-CoV-2 de un paciente sintomático. Antes de la limpieza, los resultados de la reacción de RT-PCR demostraron que las pequeñas gotas cargadas de virus pueden ser desplazadas por los flujos de aire y depositadas en equipos como los conductos de ventilación. Muestras de la taza del inodoro y del lavabo fueron positivas, lo que sugiere que los viriones en las heces podrían ser una vía potencial de transmisión. Las muestras posteriores a la limpieza con dicloroisocianurato de sodio (1000 - 5000 ppm) fueron negativas, lo cual indica que las medidas de descontaminación son suficientes.

Existen algunos desafíos y brechas de conocimiento sobre el diseño de nanomateriales antivirales, que serían utilizados para terapia, desinfectantes y cobertura de superficies antivirales (por ejemplo, para cubrebocas y recubrimientos, para uso público), los cuales permanecen aún en desarrollo. De acuerdo con Y. Chen et al., (2020), los nanomateriales antivirales tienen aplicación mediante tres estrategias: a) interacciones del receptor de la superficie de la célula hospedera con el virus, b) administración de agentes antivirales y c) nanovacunas.

Se pueden utilizar nanoagentes antivirales para interrumpir el ciclo de replicación viral. La envoltura, la cápside y los ácidos nucleicos son los blancos principales en el diseño de nanomateriales antivirales. Sin

embargo, las interacciones entre los nanomateriales y estos blancos siguen sin estar claras, lo que dificulta una comprensión más profunda de los mecanismos mediante los cuales se inhiben la infección por virus. Por lo que deben aclararse los posibles mecanismos de interacción, incluido el daño causado por la unión directa de los nanomateriales a los virus, la alteración de las interacciones entre el virus y la célula hospedera o los efectos indirectos sobre la activación de la inmunidad innata y adaptativa. Otras estrategias contra el SARS-CoV-2 y otros patógenos relacionados son: inactivarlos una vez que entran al organismo, herramientas para la detección del virus como biosensores y herramientas para inactivar al patógeno por diferentes medios fuera del organismo.

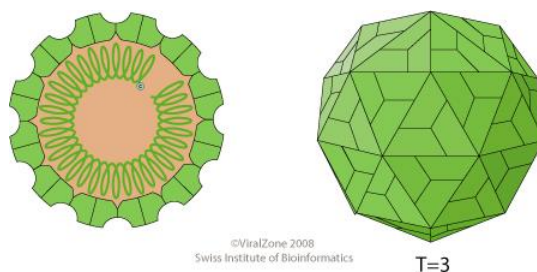
### 1.1.5 Virus como modelo de estudio

De acuerdo a los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (2020) los cultivos de SARS-CoV-2 que involucren altas concentraciones de virus vivos (por ejemplo, propagación o aislamiento), o grandes volúmenes de muestras infecciosas deben realizarse en no menos de un entorno BSL-3. El uso de virus sustitutos con propiedades biofísicas y estructura genómica similares permite la evaluación de la eficacia viricida de materiales. El uso de los virus sustitutos ayuda en el caso de necesitar un nivel de contención que no está fácilmente disponible. Por ejemplo, el virus del SARS-CoV-2 que requiere un alto nivel de seguridad en el laboratorio (BSL-3). Este tipo de laboratorios son más especializados y permiten contener cualquier riesgo de difusión de aerosoles o salpicaduras de fluidos o líquidos corporales.

Existen diversos estudios para el SARS-CoV-2 en donde se utilizan a otros virus como sustitutos. Como ha sido el caso del bacteriófago MS2. El bacteriófago MS2 se ha utilizado con frecuencia como sustituto de virus patógenos en estudios de aerosolización y se utilizó para aproximar la dispersión en el aire del SARS-CoV-2 (Turgeon et al., 2014). Existen otros trabajos, por ejemplo, en donde también se utiliza al bacteriófago MS2 como sustituto del SARS-CoV-2, Domingues et al., (2022) incorporan aceites esenciales antivirales como la hierba de limón o el eucalipto dentro de esteras fibrosas electrohiladas de policaprolactona para ser utilizadas como capas intermedias en mascarillas, con la finalidad de inhibir al virus MS2. Por otra parte, Desai et al., (2022) evalúan un compuesto patentado de trietilenglicol (TEG) llamado Grignard Pure™ (GP), este estudio caracteriza la eficacia de GP para inactivar el bacteriófago MS2, un virus sin envoltura ampliamente utilizado como sustituto de SARS-CoV-2. Es por ello que se llevó a cabo el uso de virus sustitutos para el estudio de este trabajo los cuales se detallan a continuación.

### 1.1.5.1 Bromovirus BMV y CCMV

Los virus del mosaico del bromo (BMV) y el virus del moteado clorótico del caupí (CCMV) pertenecen a la familia *Bromoviridae*, al género *Bromovirus*. Su virión no cuenta con envoltura (Figura 5), miden alrededor de unos 26 nm de diámetro con simetría icosaédrica T=3, compuesto por 180 proteínas de la cápside: 12 pentámeros y 20 hexámeros (ViralZone, 2008).

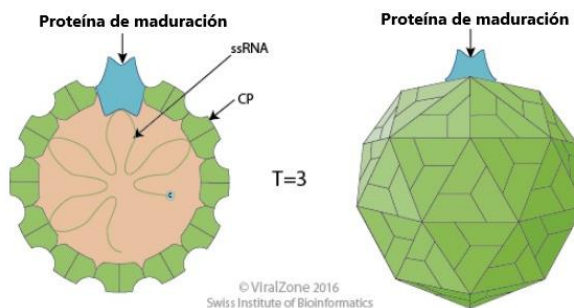


**Figura 5.** Representación del virión del Bromovirus. Tiene un genoma de RNA monocatenario positivo (Imagen modificada de ViralZone, 2008).

Su hospedero natural son las plantas, principalmente la planta de cebada (*Hordeum vulgare*), para BMV y las plantas de caupí (*Vigna unguiculata*) para CCMV. La infección se lleva a cabo mediante una inoculación mecánica en la planta.

### 1.1.5.2 Bacteriófago MS2

El bacteriófago MS2 es un virión esférico sin envoltura de unos 26 nm de diámetro con simetría icosaédrica T=3 compuesto por 178 proteínas CP, pertenece a la familia *Fiersviridae*, genero *Emesvirus* (Figura 6). Su hospedero natural es *Escherichia coli*.



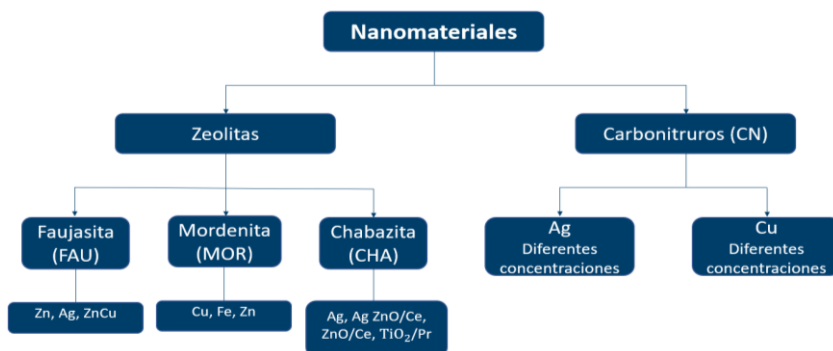
**Figura 6.** Representación del virión de Emesvirus. Cuenta con un genoma de RNA monocatenario positivo. (Imagen modificada de ViralZone, 2016).

### 1.1.6 Nanomateriales

A lo largo de esta búsqueda bibliográfica se buscan respuestas acerca de qué estructuras a nanoescala muestran un potencial efecto anti-coronavirus para el control de COVID-19 o cuáles son los modos de acción para inhibir la infección viral y los tipos de interacciones entre la superficie viral y el nanosistema propuesto por diferentes autores para la inactivación viral. Sin embargo, ningún estudio descarta la importancia del distanciamiento social, la higiene y medidas de precaución para disminuir el riesgo de infección y propagación del SARS-CoV-2 o cualquier otro patógeno.

Los nanomateriales son materiales con al menos una de su dimensión externa mide aproximadamente de 1 a 100 nm y desempeñan un papel importante en la fabricación de muchos dispositivos debido a sus propiedades físicas y químicas únicas, como una gran relación superficie-volumen y su alta resistencia mecánica (Saleh y Gupta, 2016).

Algunos de los nanomateriales son creados usando nanopartículas y estas difieren en varias dimensiones, formas y tamaños además de su composición (Cho et al., 2013). De acuerdo a Ealias y Saravanakumar, (2017) una nanopartícula puede ser: a) de dimensión cero, donde la longitud, el ancho y la altura se fijan en un solo punto, por ejemplo, puntos cuánticos, b) unidimensional, en donde puede poseer solo un parámetro, por ejemplo, grafeno, c) bidimensional, donde tiene longitud y anchura, por ejemplo, carbono nanotubos o d) tridimensionales, donde tiene todos los parámetros como largo, ancho y alto, por ejemplo, nanopartículas de oro. Y en general, los nanomateriales se pueden clasificar en cuatro tipos: (I) nanomateriales inorgánicos; (II) nanomateriales a base de carbono; (III) nanomateriales orgánicos; y (IV) nanomateriales compuestos. En este trabajo se utilizaron dos tipos de nanomateriales inorgánicos y nanomateriales compuestos, las zeolitas y los carbonitruros con distintos dopajes como la plata, el cobre y el zinc (Figura 7), estos materiales se discutirán más adelante.

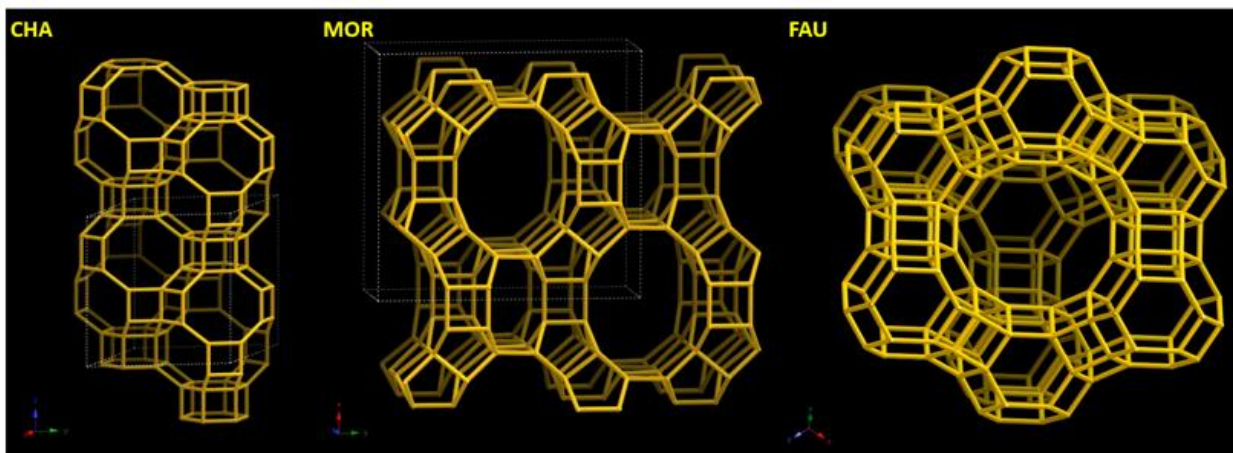


**Figura 7.** Nanomateriales utilizados en el proyecto. Se utilizaron tres estructuras diferentes de zeolitas con diferentes concentraciones de metales. Los carbonitruros se doparon con diferentes concentraciones de plata y cobre.

### 1.1.6.1 Zeolitas

Las zeolitas son aluminosilicatos cristalinos con una composición estructural tridimensional que forma poros de dimensiones moleculares de tamaño uniforme. Como los poros adsorben preferentemente moléculas que encajan perfectamente dentro de los poros y excluyen moléculas que son demasiado grandes, pueden actuar como tamices a escala molecular (Maesen, 2007).

La Comisión de Estructura de la Asociación Internacional de Zeolitas (IZA) ha compilado la mayoría de las zeolitas conocidas y otras estructuras de tamices moleculares y ha asignado códigos oficiales de tres letras para las estructuras conocidas, hasta el momento tienen registradas alrededor de 256 (Baerlocher et al., 2007). Se puede ver la clasificación de acuerdo con el tamaño de poro, el área superficial y la relación Si:Al. En este proyecto se utilizaron tres estructuras diferentes (Figura 8), chabazita (CHA, con  $a = 13.6750 \text{ \AA}$ ,  $b = 13.6750 \text{ \AA}$  y  $c = 14.7670 \text{ \AA}$ ), mordenita (MOR, con  $a = 18.2560 \text{ \AA}$ ,  $b = 20.5340 \text{ \AA}$  y  $c = 7.5420 \text{ \AA}$ ) y faujasita (FAU, con  $a = 24.3450 \text{ \AA}$ ,  $b = 24.3450 \text{ \AA}$  y  $c = 24.3450 \text{ \AA}$ ). Los valores  $a$ ,  $b$  y  $c$  corresponden a los parámetros de la celda.

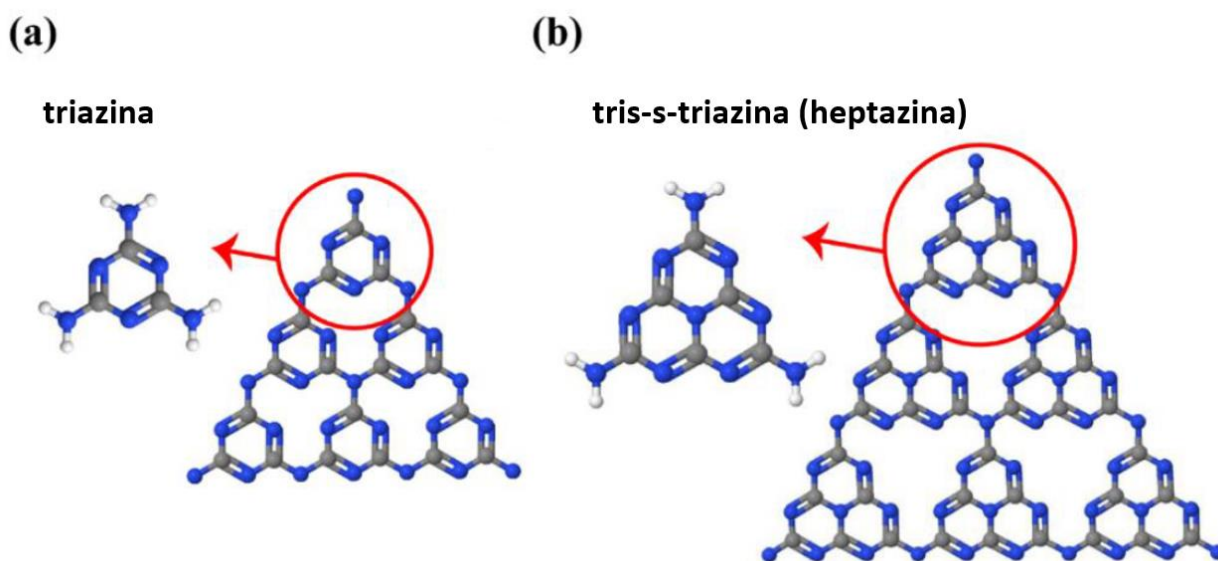


**Figura 8.** Estructuras de chabazita, mordenita y faujasita. Imágenes tomadas de Baerlocher et al., (2007).

### 1.1.6.2 Carbonitruros

Los carbonitruros, también llamados nitruros de carbono ( $C_3N_4$ ) son los polímeros sintéticos más antiguos. Los nitruros de carbono poliméricos fueron descubiertos a fines del siglo XIX con fórmula general de  $C_xN_yH_z$  con alta relación N:C, los cuales poseen un comportamiento atractivo debido a sus propiedades únicas en almacenamiento electrónico para aplicaciones electro y fotocatalíticas (Murali et al., 2022). Las

propiedades de los materiales de nitruro de carbono (CN) están controladas por su estructura y propiedades cristalinas. Según su nanoestructura se clasifican en cinco estructuras diferentes, que son el nitruro de carbono gráfico bidimensional (2D)  $C_3N_4$  (g- $C_3N_4$ ) y las estructuras tridimensionales como a- $C_3N_4$ , b- $C_3N_4$ , cúbico- $C_3N_4$  y pseudocúbico- $C_3N_4$  (Murali et al., 2022). Entre ellos el nitruro de carbono gráfico (g- $C_3N_4$ ) es una estructura en capas que es estable y similar a las estructuras gráficas. El nitruro de carbono es una de las formas más conocidas de los carbonitruros, es un material polimérico que consta de C, N y alguna impureza de H (Figura 9), conectados a través de patrones basados en tris-triazina (Alaghmandfard y Ghandi, 2022; Zhu et al., 2014). Dado que el g- $C_3N_4$  polimérico consiste en elementos de nitrógeno y carbono abundantes en la Tierra, es versátil y se puede alterar su actividad superficial sin cambiar manifiestamente la estructura y composición teóricas. Debido a la característica polimérica del g- $C_3N_4$ , la química de la superficie se puede modular fácilmente mediante la ingeniería de superficies a nivel molecular por lo cual podemos doparlo con algunas otras estructuras (W.-J. Ong et al., 2016).



**Figura 9.** Estructura de (a) triazina y (b) tris-s-triazina (heptazina) de g- $C_3N_4$ . Las esferas grises, azules y blancas corresponden a carbón, nitrógeno e hidrógeno, respectivamente. Imagen modificada de Alaghmandfard y Ghandi, (2022).

### 1.1.7 Superficies superhidrofóbicas

Meguid y Elzaabalawy, (2020) plantean la hipótesis de que las superficies superhidrofóbicas en instalaciones públicas y sanitarias pueden proteger y reducir el potencial de transmisión del virus. Debido a que el SARS-CoV-2 se propaga principalmente a través de gotas y superficies contaminadas; es posible que las superficies recubiertas o creadas a partir de un nanocompuesto superhidrofóbico puedan combatir

la transmisión del virus a través de una estrategia de 3 pasos. Primero, las gotas que entran en contacto con superficies superhidrofóbicas mantendrán su forma esférica y existirán en un estado de humectación de Cassie-Baxter, que reduce la exposición de la superficie al virus por encapsulación. En segundo lugar, las gotas que chocan contra una superficie superhidrófoba rebotarán o caerán sin dejar rastro del virus, resultando en la supresión de la contaminación. Finalmente, para las gotas repelidas o en casos extremos donde algunos rastros del virus inevitablemente contaminan la superficie, el nanocompuesto con propiedades antivirales y antibacterianas inactivará el virus. Sin embargo, sugieren que es necesario realizar el estudio con otro tipo de nanopartículas para probar su efectividad antiviral. Por lo tanto, se puede decir que los análisis *in silico* son especialmente útiles para guiar el diseño de nuevas formulaciones de nanomateriales necesarios para combatir el SARS-CoV-2.

#### 1.1.8 Actividad fotocatalítica de los nanomateriales

Otro enfoque que se ha estudiado es el uso de nanopartículas con actividad fotocatalítica. El trabajo de Darnell et al., (2004) señala que el SARS-CoV es altamente estable a temperatura ambiente y a 4 ° C, pero se inactiva con luz ultravioleta a 254 nm, condiciones altamente alcalinas o ácidas de pH > 12 o pH < 3, respectivamente, o por breves periodos de tratamiento térmico a 65 ° C (p. Ej., 5 min). Debido a su relación con el SARS-CoV-2, se espera que este último sea igualmente sensible.

La inactivación fototérmica de los virus es un ejemplo del uso de metales nobles para la desinfección, las NPs y nanobarras de Ag y Au tienen la capacidad de inducir calentamiento cuando se iluminan a una longitud de onda óptima, correspondiente a la condición de resonancia de plasmón, en un proceso llamado tratamiento fototérmico plasmónico. La resonancia de plasmón es dependiente de la forma y organización de las NPs (Govorov y Richardson, 2007). Por otro lado, se ha estudiado también la inactivación del SARS-CoV-2 por nanopartículas fotocatalíticas.

La actividad fotocatalítica es una función comúnmente investigada de las nanopartículas semiconductoras. Una de las formas más estudiadas de nanopartículas fotocatalizadoras es el dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>). Las nanopartículas de TiO<sub>2</sub> además de que se consideran inertes, tienen baja toxicidad y no son susceptibles a la fotocorrosión (Maeda y Domen, 2007). Las nanopartículas de TiO<sub>2</sub> tienen un amplio espectro de actividad, incluso contra bacterias Gram negativas y Gram positivas. Como la banda prohibida óptica entre las bandas de valencia y conducción de la anatasa-TiO<sub>2</sub> es de 3,2 eV, se absorbe luz con una longitud de onda inferior a 388 nm y el TiO<sub>2</sub> produce huecos de electrones que migran a la superficie de los

nanomateriales de  $\text{TiO}_2$ . En la superficie, los huecos fotogenerados reaccionan con las moléculas de agua adsorbidas para generar radicales hidroxilo altamente reactivos, mientras que los electrones reaccionan con las vacantes de oxígeno para generar iones superóxido. Tales especies reactivas de oxígeno reaccionan y descomponen fácilmente las moléculas orgánicas, incluidas las de las células, cuando se encuentran, lo que conduce a la muerte microbiana (Nabika y Unoura, 2016).

En un estudio de Khaiboullina et al., (2021) utilizaron un pariente genético cercano del SARS-CoV-2, el coronavirus humano HCoV-NL63 y mostraron la eficacia viricida de  $\text{TiO}_2$  de tamaño nanométrico, depositada en un cubreobjetos de vidrio e inducidos con radiación UV. La irradiación ultravioleta de  $\text{TiO}_2$  nanométrico da como resultado la excitación de un electrón que conduce a la formación de un par específico “electrón-hueco ( $e^- - h^+$ )” y a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Los huecos de electrones ( $h^+$ ) catalizan los procesos de oxidación y convierten las moléculas de agua / hidróxido en radicales peróxido / hidroxilo, mientras que los electrones ( $e^-$ ) inducen reacciones de reducción y reaccionan con el oxígeno molecular para generar radicales superóxido. Las ROS resultantes, por lo tanto, tienen la capacidad de inactivar al virus HCoV-NL63 a través de daño oxidativo.

### 1.1.9 Cubrebocas como protección ante microbios

El cubrebocas o mascarilla es una tecnología que ha permitido el control de COVID-19. La OMS ha elaborado un documento titulado “Consejos sobre el uso de mascarillas en el contexto de COVID-19”, publicado en junio de 2020 y actualizado hasta diciembre de 2020, que destaca los posibles daños y riesgos que deben tenerse en cuenta al usar mascarillas, como: “autocontaminación debido a la manipulación de la mascarilla por manos contaminadas; potencial autocontaminación que puede ocurrir si las mascarillas médicas no se cambian cuando están mojadas, sucias o dañadas; posible desarrollo de lesiones en la piel de la cara, dermatitis irritante o acné que empeora cuando se usa con frecuencia durante largas horas; incomodidad en su uso; falsa sensación de seguridad, lo que conduce a un posible menor cumplimiento de las medidas preventivas como el distanciamiento físico y la higiene de las manos; riesgo de transmisión de gotitas y de salpicaduras a los ojos si el uso de mascarillas no se combina con protección ocular; desventajas o dificultad para usarlos por poblaciones vulnerables específicas, como aquellos con trastornos de salud mental, discapacidades del desarrollo, la comunidad de personas sordas o con problemas de audición y los niños; dificultad para usarlas en ambientes cálidos y húmedos” (World Health Organization, 2020a).

En este contexto, se ha convertido en una prioridad el desarrollo de nuevas mascarillas médicas, no desechables y de alta calidad, fabricadas con nanomateriales antipatógenos virales y microbianos funcionales para el personal sanitario. Se espera que el desarrollo de este proyecto tenga diferentes impactos, el más importante es que los nanomateriales implementados en las mascarillas den la mayor protección a los trabajadores de salud.

#### 1.1.10 Tipos de bacterias

La envoltura celular de las bacterias es una estructura compleja de varias capas que sirve para proteger a estos organismos de su entorno. Las envolturas celulares de la mayoría de las bacterias se dividen en uno de dos grupos principales. Las bacterias gram negativas están rodeadas por una delgada pared celular de peptidoglicano, que a su vez está rodeada por una membrana externa que contiene lipopolisacárido. Las bacterias gram positivas carecen de una membrana externa, pero están rodeadas por capas de peptidoglicano muchas veces más gruesas que las que se encuentran en las gram negativas. Atravesando estas capas de peptidoglicano se encuentran polímeros aniónicos largos, llamados ácidos teicoicos (Silhavy et al., 2010).

*E. coli* es una bacteria gram negativa, con forma de bastón (2,0 - 6,0  $\mu\text{m}$  de longitud). *B. pumilus* es una bacteria gram positiva, con forma de bastón (0,5 - 10  $\mu\text{m}$  de longitud). Y las células de *S. aureus* son gram positivas de igual manera, pero estas tienen forma esférica, miden aproximadamente 0.5-1.5  $\mu\text{m}$  de diámetro, inmóviles y no forman esporas.

En resumen, las bacterias gram positivas tienen una capa gruesa de peptidoglicano y no tienen una membrana lipídica externa, mientras que las bacterias gram negativas tienen una capa delgada de peptidoglicano y una membrana lipídica externa.

#### 1.1.11 Propiedades bactericidas de los nanomateriales

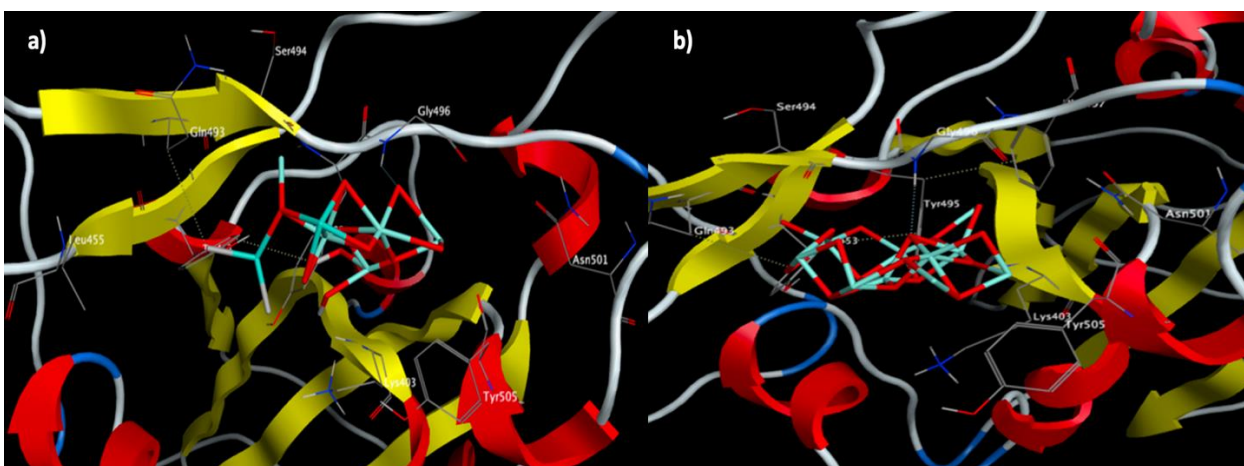
Los materiales de tamaño nanométrico se caracterizan por un área de superficie aumentada, lo que mejora su reactividad química y movilidad. Debido a su reactividad mejorada y su tamaño adecuadamente pequeño, algunas nanopartículas se utilizan como agentes antibacterianos y antifúngicos. Las nanopartículas exhiben potencial antibacterianos a través de mecanismos multifacéticos. La adhesión de

nanopartículas a las células microbianas, las especies reactivas de oxígeno, y su penetración dentro de las células han sido reconocidas como los modos más prominentes de acción antimicrobiana (Staron y Długosz, 2021).

### 1.1.12 Análisis por acoplamiento molecular

Como primera aproximación, los análisis computacionales son de mucha utilidad para el tratamiento y control de enfermedades. Pueden ayudar a determinar la interacción de los nanomateriales con los sistemas biológicos. Aunque existen agentes antivirales eficaces en uso, todavía tienen inconvenientes debido al desarrollo de resistencia viral y la acumulación dentro de órganos fuera del objetivo, lo cual conduce a efectos adversos. En el trabajo realizado por Abo-Zeid et al., (2020), se investiga la posible actividad antiviral de las nanopartículas de óxido de hierro (IONPs, siglas del inglés *iron oxide nanoparticles*) en el SARS-CoV-2 y el virus de la hepatitis C (VHC) mediante estudios de acoplamiento molecular. Los modelos revelaron que el  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  y el  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  interactúan de manera eficiente con las glicoproteínas del SARS-CoV-2 (RBD) y del VHC. Sin embargo, el  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  formó un complejo más estable con RBD, mientras que para VHC, se formó un complejo más estable con  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ . Los investigadores esperan que de este modo las interacciones se asocien con cambios conformacionales en las proteínas estructurales virales para la posterior inactivación del virus. Cabe resaltar también que las IONPs están aprobadas por la FDA e incluso las recomiendan para la síntesis de tejidos antibacterianos que se podrían utilizar en la fabricación de equipo de protección personal (EPP). En la Figura 10 se pueden observar los residuos de aminoácidos de la proteína RBD del SARS-CoV-2 y la proteína del VHC con los que forma el complejo ligando-receptor. En el trabajo de Zuo et al., (2020) se demuestra de igual manera que la interacción con estos residuos es clave para que el receptor celular ACE2 se una a la proteína S del dominio RBD, por lo que es una posible estrategia para controlar la actividad viral.

Mehranfar y Izadyar, (2020) por otra parte, llevaron a cabo simulaciones de dinámica molecular utilizando un péptido el cual forma un complejo más estable con el dominio RBD que con el receptor ACE2. Funcionalizaron nanopartículas de oro (AuNPs) con el péptido (AuNP-Pep) y mostró una distancia mínima con RBD, a diferencia de las otras AuNPs funcionalizadas con octanotiol, lo que confirma una mayor interacción con RBD que otras nanopartículas. Un factor importante que demuestra la potencial actividad de inhibidor de las AuNP-Pep contra el SARS-CoV-2 es que se cubra la superficie de unión del virus. De acuerdo a este estudio, las AuNP-Pep cubren completamente la superficie de RBD (similar a como lo hace ACE2).



**Figura 10.** Diagrama tridimensional que muestra las interacciones de acoplamiento molecular de (a)  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  y (b)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  con los aminoácidos clave en el S-RBD del SARS-CoV-2. Cuenta con interacciones hidrofóbicas y enlaces de hidrógeno con el dominio de unión al receptor S quimérico (S1-RBD) del SARS-CoV-2, para formar un complejo más estable. Imagen tomada de Abo-Zeid et al., (2020).

El acoplamiento molecular se utiliza ampliamente para la predicción de complejos biomoleculares en el análisis de estructura/función y en el diseño molecular. AutoDock combina un campo de fuerza empírico de energía libre con un algoritmo genético Lamarckiano, lo que proporciona una rápida predicción de conformaciones unidas con energías de asociación libres predichas. AutoDock ha demostrado ser una herramienta eficaz capaz de predecir de forma rápida y precisa las conformaciones unidas y las energías de unión de los ligandos con objetivos macromoleculares (Morris et al., 1998). Para permitir la búsqueda del gran espacio conformacional disponible para un ligando alrededor de una proteína, AutoDock utiliza un método basado en cuadrículas para permitir una evaluación rápida de la energía de unión de las conformaciones de prueba. En este método, la proteína diana está incrustada en una cuadrícula. Luego, se coloca secuencialmente un átomo de sonda en cada punto, se calcula la energía de interacción entre la sonda y el objetivo, y el valor se almacena en la cuadrícula. Esta cuadrícula de energías se puede utilizar luego como una tabla de búsqueda durante la simulación de acoplamiento.

La propuesta de este trabajo es llevar a cabo una evaluación *in silico* de la interacción de diferentes materiales con el dominio RBD de la proteína S del SARS-CoV-2. Para verificar la actividad de los nanomateriales, se llevarán a cabo ensayos con virus de diferentes familias, los bromovirus BMV y CCMV y el bacteriófago MS2, los tres poseen un genoma lineal de RNA+ al igual que el virus del SARS-CoV-2.

## 1.2 Hipótesis

Los nanomateriales como las zeolitas y los carbonitruros son capaces de atrapar virus, al mismo tiempo presentan un efecto antibacteriano, inhibiendo bacterias gram positivas y gram negativas.

## 1.3 Objetivos

### 1.3.1 Objetivo general

Evaluar la actividad antiviral y antibacteriana de nanomateriales como zeolitas y carbonitruros, usando como modelo los virus BMV, CCMV y MS2, así como bacterias gram positivas como *Staphylococcus aureus* y *Bacillus pumilus* y gram negativas como *Escherichia coli*.

### 1.3.2 Objetivos específicos

- Seleccionar y determinar las concentraciones adecuadas de las zeolitas y carbonitruros para inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus pumilus* y *Escherichia coli*.
- Obtener las propiedades fisicoquímicas de BMV, CCMV y MS2 por TEM, DLS y SEM.
- Estudiar el atrapamiento de BMV, CCMV y MS2 usando nanomateriales.
- Estudiar de manera *in silico*, mediante acoplamiento molecular, la capacidad de algunos polímeros y polisacáridos para atrapar BMV, CCMV, MS2 y la RBD del SARS-CoV-2.

## Capítulo 2. Metodología

---

### 2.1 Actividad antibacteriana de los nanomateriales en medio líquido

Se tomó una colonia de *E. coli*, *S. aureus* o *B. pumilus* crecidas en una placa de LB-agar, se agregó a 20 mL de medio LB (Anexo 1) y se dejó en agitación en la incubadora New Brunswick Scientific G-25 a 37 °C durante la noche. Del cultivo anterior, se tomaron 900 µL y se adicionaron 45 mL de medio LB, se dejó en incubación con agitación a 37 °C durante 1 hora o hasta que alcanzara una  $OD_{600} = 0.1$  y se colocaron diferentes concentraciones de nanomaterial (0.1, 0.5, 1, 2 y 3 mg/mL) por triplicado en tubos eppendorf de 1.5 mL. Se incluyeron dos controles, medio LB con nanomaterial sin bacterias, y bacterias sin nanomaterial. Los tubos se colocaron en agitación a 37 °C de manera horizontal en la incubadora para permitir la dispersión del nanomaterial que no es completamente soluble en agua. Se tomaron mediciones a las 16 h y 24 h a una longitud de onda de 600 nm en una placa de 96 pozos Corning® Costar en un espectrofotómetro Thermo Scientific Multiskan GO. Los cálculos de  $IC_{50}$  se determinaron mediante RStudio con la paquetería "drc" la cual permite el análisis dosis-respuesta a los tratamientos aplicados (Ritz et al., 2015).

### 2.2 Pruebas de susceptibilidad bacteriana

Se agregó una colonia de *E. coli* o *S. aureus* a 20 mL de medio LB y se dejó en agitación en la incubadora New Brunswick Scientific G-25 a 37 °C durante la noche. Del cultivo anterior, se tomaron 900 µL y se adicionaron 45 mL de medio LB, se dejó en incubación con agitación a 37 °C durante 1 hora o hasta que alcanzara una  $OD_{600} = 0.1$ . En una placa con agar LB (Anexo 1) se llevó a cabo un tamiz bacteriano con un asa bacteriológica de vidrio y se agregaron discos de papel filtro de 0.5 cm de diámetro sobre la placa. Se adicionaron 4 µL a cada disco de la solución con el nanomaterial, se utilizó ampicilina como control. Las placas se dejaron en una mini incubadora Labnet a 37 °C durante 16 h.

## 2.3 Pruebas de actividad antibacteriana en telas impregnadas con TiO<sub>2</sub> NPs

Para las pruebas bactericidas de las telas impregnadas con TiO<sub>2</sub> NPs (Tabla 1) se utilizaron las cepas *E. coli* (MC4100) y *B. pumilus* (B-41243). Se preparó un cultivo independiente para cada una de las bacterias para estudiar la actividad de inhibición de las muestras. De un cultivo crecido toda la noche de *E. coli* o *B. pumilus*, se tomaron 900 µL y se agregaron a 45 mL de medio LB. Luego, los cultivos bacterianos se dejaron 1 h en una incubadora New Brunswick Scientific G-25, a 150 rpm y 37 °C, hasta que su densidad óptica alcanzó 0.1 (OD<sub>600</sub> = 0.1). La densidad óptica del cultivo bacteriano se midió utilizando un espectrofotómetro Thermo Multiskan GO a 600 nm. Después, se colocaron 4 µL de cultivo fresco de bacterias en piezas cuadradas de 0,5 x 0,5 cm de tela. Luego, las piezas de tela inoculadas con bacterias fueron expuestas a radiación UV (254 nm) utilizando una cámara de descontaminación Air Science UV-Box. Las telas se irradiaron con UV durante diferentes períodos de tiempo (1.5, 2.5 y 5 minutos) en ambos lados. Posteriormente, las muestras de tela se incubaron en placas Petri con agar LB durante 18 horas a 37 °C para estudiar la actividad antibacteriana de los textiles de acuerdo con el crecimiento de las bacterias sobre la placa.

**Tabla 1.** Textiles impregnados con TiO<sub>2</sub> NPs. \*Corresponde a los textiles control, sin las NPs. \*\*Sustancia química esencial en el proceso de elaboración de esta. Precursores: Isopropóxido de titanio (IPT) y butóxido de titanio (BuOT).

| Textil                          | **Precursor | Clave |
|---------------------------------|-------------|-------|
| Indiolino blanco                | IPT         | I1U4  |
| Indiolino blanco                | BuOT        | IBH3  |
| Bata de laboratorio de algodón  | IPT         | C1U4  |
| Bata de laboratorio de algodón  | BuOT        | CBH3  |
| *Bata de laboratorio de algodón |             | CLC1  |
| *Indiolino blanco               |             | IBC1  |

### 2.3.1 Estudio bactericida *in situ* por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Después de incubar las muestras, se analizó la morfología, integridad y cantidad de bacterias mediante Microscopía Electrónica de Barrido con un SEM Hitachi SU3500. Las muestras se secaron a temperatura ambiente y se colocaron en un portamuestras con cinta de carbón. Luego, las muestras fueron analizadas en condiciones de bajo vacío (25 Pa) y 7 kV. Las imágenes fueron tomadas a diferentes aumentos (47X, 270X, 370X, 2000X, 3000X entre otras) y grabadas digitalmente.

## 2.4 Producción de partículas de BMV y CCMV

Se utilizó el protocolo descrito por Cadena-Nava et al., (2012). Las plantas de cebada (*Hordeum vulgare*), sirven como hospedero natural del BMV y las plantas de caupí (*Vigna unguiculata*) de CCMV. La siembra se realizó en un invernadero, utilizando sustrato enriquecido.

### 2.4.1 Inoculación de plantas

Se sembraron 10 semillas por maceta, las cuales se regaron cada tres días. Una vez transcurridas dos semanas posteriores a la germinación, se llevó a cabo la inoculación mecánica. Primero, provocando daño mecánico sobre la parte superior de las hojas de la planta mediante el raspado con una fibra de lana de acero, para después aplicar 20 µl de virus a una concentración de 0.1 µg/µL por hoja.

### 2.4.2 Extracción de partículas BMV y CCMV

Dos semanas después de realizar la inoculación, se cosecharon las hojas que presentaron síntomas típicos de infección, específicamente clorosis (insuficiencia de clorofila) en forma de líneas a lo largo de las hojas. Las hojas se colectaron, y se almacenaron a -20 °C. Primero, se llevó a cabo una ruptura mecánica de las hojas con una licuadora y con buffer de extracción de virus (acetato de sodio 0.5 M y acetato de magnesio 0.08 M, pH 4.5) y 1% (v/v) de β-mercaptoetanol. El extracto se filtró con una gasa y posterior a ello se adicionó un volumen de cloroformo al filtrado obtenido. La solución se centrifugó a 8,000 rpm durante 40 minutos a 4 °C usando la centrifuga Beckman Avanti JXN-26 rotor JA-14. Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó en las mismas condiciones, durante 25 minutos, se colectó el sobrenadante y posteriormente se dejó en agitación constante durante 60 minutos a 4 °C para evaporar el excedente de cloroformo. Se precipitó el virus agregando NaCl a una concentración final de 0.02 M y 10% PEG8000, se dejó en agitación toda la noche a 4 °C. Posteriormente, se centrifugó durante 15 min utilizando el mismo rotor; se volvió a suspender el pellet en 20 mL de buffer de suspensión de virus (acetato de sodio 50 mM, acetato de magnesio 8 mM, pH 4.5) y se agitó la muestra durante 1 h en frío. Nuevamente se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min con el mismo rotor y se desechó el pellet, tomando el sobrenadante.

### 2.4.3 Purificación de partículas de BMV y CCMV

Se tomaron 10 mL de la solución anterior y, en tubos para ultracentrífuga, se colocó un volumen de 5 mL de sacarosa 10% (w/v) en el fondo de cada tubo utilizando una pipeta Pasteur para formar dos fases. Se ultracentrifugó a 30,000 rpm durante dos horas a 4 °C en una centrifuga Beckman Coulter Optima XPN-100 rotor SW 32 Ti. Se recuperó el pellet, e inmediatamente, se resuspendió con 100 µL de solución amortiguadora de suspensión de virus. Finalmente, para ultrapurificar el virus se usó un gradiente de 5-40% de sacarosa, y se centrifugó a 30,000 rpm a 4 °C durante dos horas.

En un cuarto oscuro y utilizando una linterna, se observaron bandas de color azul que corresponden a la presencia de las partículas virales las cuales se extrajeron, evitando perturbar el gradiente. Finalmente, para determinar la concentración del virus se hizo una dilución 1:20 con buffer de suspensión y se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis Nanodrop 200c de Thermo Scientific. Para determinar la concentración del virus purificado se utilizó el método reportado por Warburg y Christian, (1941). Este método se basa en la medición espectrofotométrica directa que se fundamenta en la absorbancia relativa de proteínas y ácidos nucleicos a 280 nm y 260 nm, respectivamente. La proteína puede absorber luz a 280 nm debido a la presencia del aminoácido aromático tirosina y triptófano (Simonian y Smith, 2006). Debido a que la cantidad de estos residuos varía mucho de una proteína a otra, este método es semicuantitativo. Para determinar la concentración de partículas virales obtenida se utiliza la ecuación (1) y para la pureza la ecuación (2). Los coeficientes de extinción para los virus utilizados para BMV, CCMV y MS2 fueron 5.15, 5.85 y 8.03, respectivamente.

$$C_{\text{virus(mg/mL)}} = \frac{A_{260} * \text{Factor de dilución}}{\text{Coeficiente de extinción}} \quad (1)$$

$$A_{260 \text{ nm}} / A_{280 \text{ nm}} = \geq 1.5 \quad (2)$$

## 2.5 Producción del bacteriófago MS2

### 2.5.1 Infección de células hospederas

Se preparó un preinoculo con 5 mL de medio LB, 100 µL de *E. coli* C-3000 y ampicilina (100 µg/mL), se dejó incubando a 37 °C durante la noche. Al día siguiente, se agregaron 200 µL del preinoculo a 5 mL de LB con

ampicilina (100 µg/mL). Se incubó la muestra a 37 °C, agitando a 250 rpm hasta que la  $OD_{600} = 0.5$  a 0.7. Se agregaron los 5 mL de cultivo a 45 mL de LB con ampicilina (100 µg/mL) e incubó la muestra a 37°C, agitando a 250 rpm hasta que la  $OD_{600} = 0.3$  a 0.5. Se agregó de  $10^7$  a  $10^8$  pfu al cultivo de células hospederas. El cultivo se dejó en la incubadora a 37°C y en agitación a 250 rpm durante la noche. Al día siguiente el cultivo se centrifugó a 8000 x g durante 50 minutos y se guardó el sobrenadante. El sobrenadante incluye virus infecciosos MS2. Para la purificación se utilizó el mismo método que para BMV y CCMV, únicamente se sustituye el buffer de suspensión de virus por buffer TNE (Anexo 1).

### 2.5.2 Cuantificación de MS2

Se hicieron diluciones seriadas a partir de la solución purificada de partículas de MS2 de  $10^0$  a  $10^{-8}$ . Se agregaron 110 µL de la solución purificada en un tubo de cultivo #1. El tubo de cultivo #1 es la dilución  $10^0$ . Del tubo de cultivo #1, se agregaron 10 µL de sobrenadante al tubo de cultivo #2 y se adicionaron 90 µL de buffer PBS-G (Anexo 1) al tubo de cultivo #2 para que el volumen total sea de 100 µL. El tubo de cultivo #2 tendrá una dilución  $10^{-1}$ . Se repite el paso anterior para llegar a la dilución  $10^{-8}$ . Como control positivo se utilizó el bacteriófago MS2 aislado y proporcionado por el Dr. Rees Garmann de la Universidad Estatal de San Diego (SDSU). Se derretió el top agar en un microondas y se colocó en un baño de agua a 55 °C. Cada placa de selección utilizó 10 mL de top agar (Anexo 1) con 100 µg/mL de ampicilina, se agregaron 2 µL de cada dilución de virus preparada anteriormente y 100 µL de bacteria. Se tapó el recipiente y se giró suavemente para mezclar sin que se formaran burbujas de aire.

Sosteniendo la tapa del tubo de cultivo con el pulgar, se invirtió suavemente 4 o 5 veces y se vertió lentamente el contenido del cultivo en la placa de selección correspondiente previamente rotulada. Se agitó suavemente la placa para distribuir uniformemente el top agar. Si había burbujas, se usaba una punta de pipeta para reventarlas o moverlas hacia un lado. Se dejaba que cada placa de selección permaneciera a temperatura ambiente durante 15 minutos y se daba la vuelta a las placas. Se colocaron las placas en incubación a 37 °C durante la noche.

Para determinar las unidades formadoras de placas (PFU) es decir, el número de partículas virales capaces de formar placas por unidad de volumen se utilizó la ecuación (3).

$$\frac{\text{pfu}}{\text{mL}} = \frac{\text{número promedio de colonias contadas}}{(\text{factor de dilución})(2 \times 10^{-3})} \quad (3)$$

## 2.6 Atrapamiento de virus con nanomateriales

Se determinó la concentración del virus con la ecuación (1) descrita anteriormente. Se agregaron 0.05 mg de virus a cada tubo eppendorf (de 2 mL) por cada tiempo de incubación (5, 15, 30, 60 y 120 min) además de 1 mg/mL del nanomaterial, en un volumen final de 500  $\mu$ L, se utilizó el buffer en el que el virus esté disuelto (buffer de suspensión para BMV y CCMV y buffer TNE para MS2), los ensayos se hicieron por triplicado. Se dejó en incubación a temperatura ambiente en un Mini Lab Roller. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugó la solución a 12,000 rpm, 5 min, 4°C, se descartó el pellet y midió el sobrenadante a una longitud de 260 nm.

## 2.7 Acoplamiento molecular

Para el acoplamiento molecular se preparó el ligando con el software Avogadro (Hanwell et al., 2012), se llevó a cabo una minimización de energías, se utilizaron los ligandos que se muestran en la Tabla 2. Las proteínas de la cápside del BMV (PDB: 1JS9), CCMV (PDB: 1ZA7) y MS2 (PDB: 1MSC), y la proteína RBD del SARS-CoV-2 (PDB: 6LZG) fueron preparadas con el software Chimera de Pettersen et al., (2004). El acoplamiento se llevó a cabo en AutoDock Vina (Trott y Olson, 2010) con una exhaustividad de 8 y con el grid abarcando la totalidad de las proteínas. Las interacciones se visualizaron en LigPlot<sup>+</sup>.

### 2.7.1 Validación de acoplamientos moleculares

Con la finalidad de determinar que los datos obtenidos fueron los más representativos, se utilizó el software CygWin, el cual permite tener una terminal para ejecutar un código que permita la repetición de los acoplamientos. En la terminal se corrió el siguiente código:

```
#!/bin/bash
for f in ligand_*.pdbqt; do
    b=`basename $f .pdbqt`
    echo Processing ligand $b
    mkdir -p $b
    vina --config config.txt --ligand $f --out ${b}/out.pdbqt --log ${b}/log.txt
done
```

Se llevaron a cabo 100 corridas por ligando, dando un total de 4000 acoplamientos.

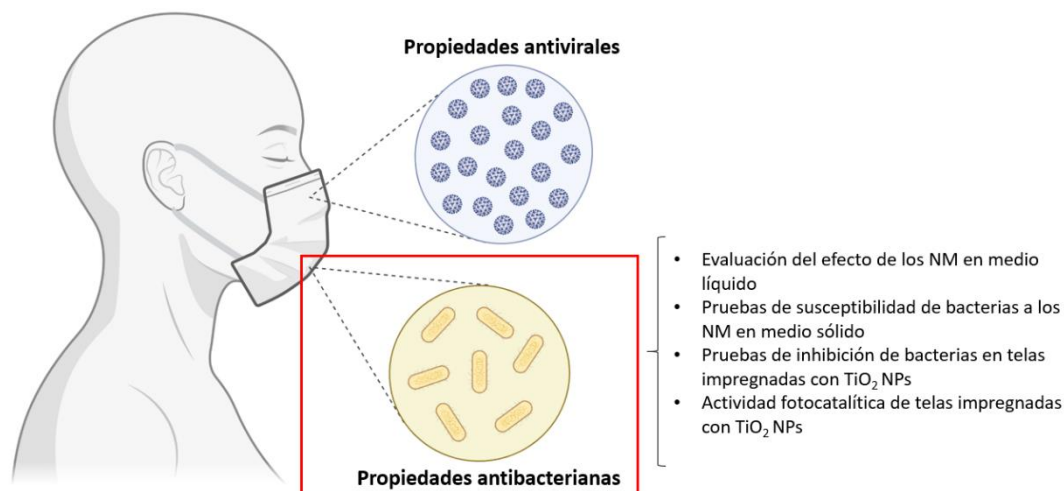
**Tabla 2.** Polímeros y polisacáridos propuestos para acoplamiento molecular.

| Compuesto                  | Identificador PubChem |
|----------------------------|-----------------------|
| Ácido hialurónico          | 6852395               |
| Ácido láctico              | 612                   |
| Alcohol polivinílico       | 11199                 |
| Alginato                   | 131704328             |
| Dextrano                   | 4125253               |
| Estireno                   | 7501                  |
| Etilcelulosa               | 24832091              |
| Pectina                    | 441476                |
| Quitosano                  | 71853                 |
| Tereftalato de polietileno | 18721140              |

## Capítulo 3. Resultados

### 3.1 Actividad antibacteriana de los nanomateriales en medio líquido

Para evaluar las propiedades antibacterianas de los nanomateriales estudiados, se utilizaron como modelo a *E. coli*, *S. aureus* y *B. pumilus*. En la Figura 11 se observa el paso inicial de este trabajo y que consiste en estudiar su capacidad antibacteriana, primero se hizo un screening de los nanomateriales (36 zeolitas y 10 carbonitruros) en medio líquido. Ambos con una bacteria gram positiva y una bacteria gram negativa. Después se llevaron a cabo pruebas de susceptibilidad en placas de agar LB. Por otra parte, se estudió si el efecto de algunas zeolitas estaba dado por la incorporación de  $\text{TiO}_2$  en su estructura, por lo que se evaluó la actividad de las nanopartículas de óxido de titanio ( $\text{TiO}_2$  NPs) sobre tela, además de un estudio del efecto fotocatalítico *in situ*.

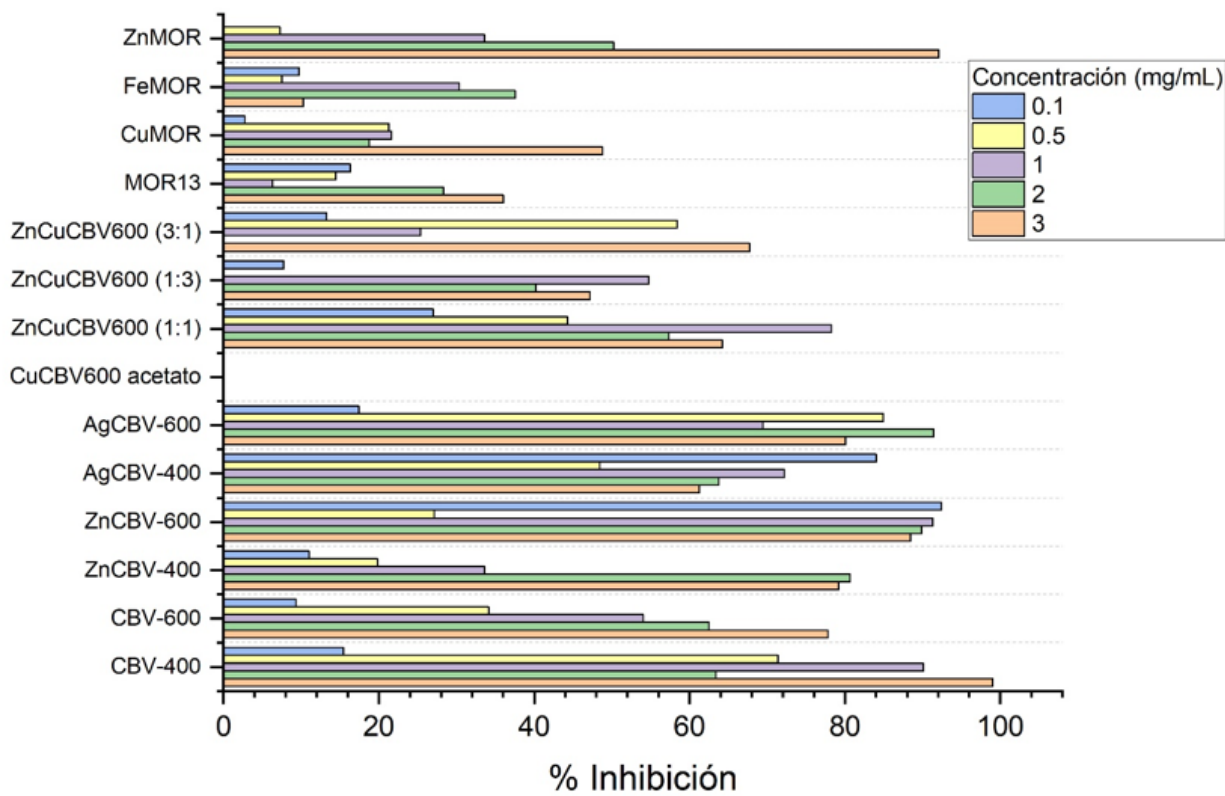


**Figura 11.** Ensayos que se llevaron a cabo para determinar las propiedades antibacterianas de los nanomateriales. Figura creada con BioRender.com.

#### 3.1.1 Actividad antibacteriana de zeolitas

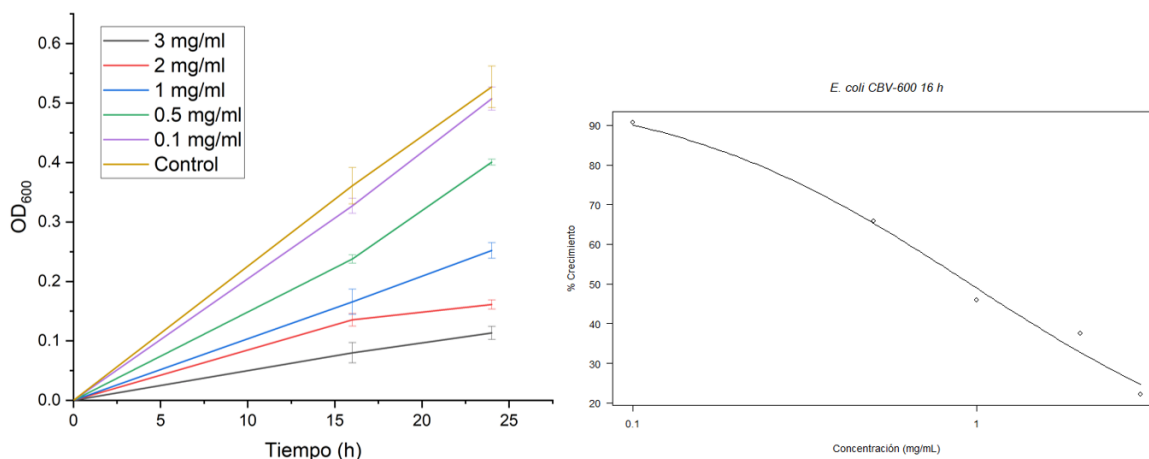
En la Figura 12 se muestra el crecimiento de *E. coli* a 16 h con dos estructuras de zeolitas diferentes, mordenita (MOR13) la cual también tiene Zn, Fe y Cu en su estructura, además de faujasita (CBV-400 y CBV-600) la cual tiene en su estructura Ag, Zn y una bimetalica con diferentes relaciones ZnCu (3:1, 1:3, 1:1). El crecimiento de *E. coli* a 24 h se muestra en el anexo 2. Se puede observar que MOR por sí sola presenta actividad antibacteriana, por ejemplo, a 3 mg/mL induce 36% de inhibición, a diferencia de

cuando tiene Zn en su estructura, la supresión de la bacteria gram negativa aumenta, inhibiendo su crecimiento a 92% en una concentración de 3 mg/mL. La actividad del Cu fue la segunda mejor, con una supervivencia del 51% a una concentración de 3 mg/mL. Las MOR dopadas con Fe impiden el crecimiento menos del 20% en promedio. Por otra parte, en cuanto a FAU y, a diferencia de la zeolita MOR, por sí misma tiene actividad antibacteriana, tanto CBV-400 y CBV-600, que, son la zeolita FAU sin dopar. En general, se observó una reducción en la supervivencia cuando contenían Ag y Zn en su estructura, sobre todo, AgCBV-600 y ZnCBV-600, esta última, a una concentración de 3 mg/mL presentó una inhibición del 88% y también se observó que es eficiente aún a bajas concentraciones. En general, se observan también algunas variaciones en los resultados obtenidos, esto es, debido a problemas de la dispersión del nanomaterial en el medio de cultivo bacteriano, ya que no es completamente soluble en agua. En el caso de FAU que es bimetálica (ZnCu a diferentes proporciones) se observó que la inhibición de la bacteria era menor respecto a las estructuras FAU CBV-400 y CBV-600. De acuerdo con los resultados obtenidos los mejores candidatos para inhibir *E. coli* (bacteria gram negativa) son las zeolitas ZnMOR y las faujasitas monometálicas junto con sus estructuras normales CBV-400 y CBV-600 (sin dopar). La muestra CBV-400 tiene una relación molar  $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$  de 5.1 a diferencia de CBV-600 con una relación molar  $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$  de 5.2.



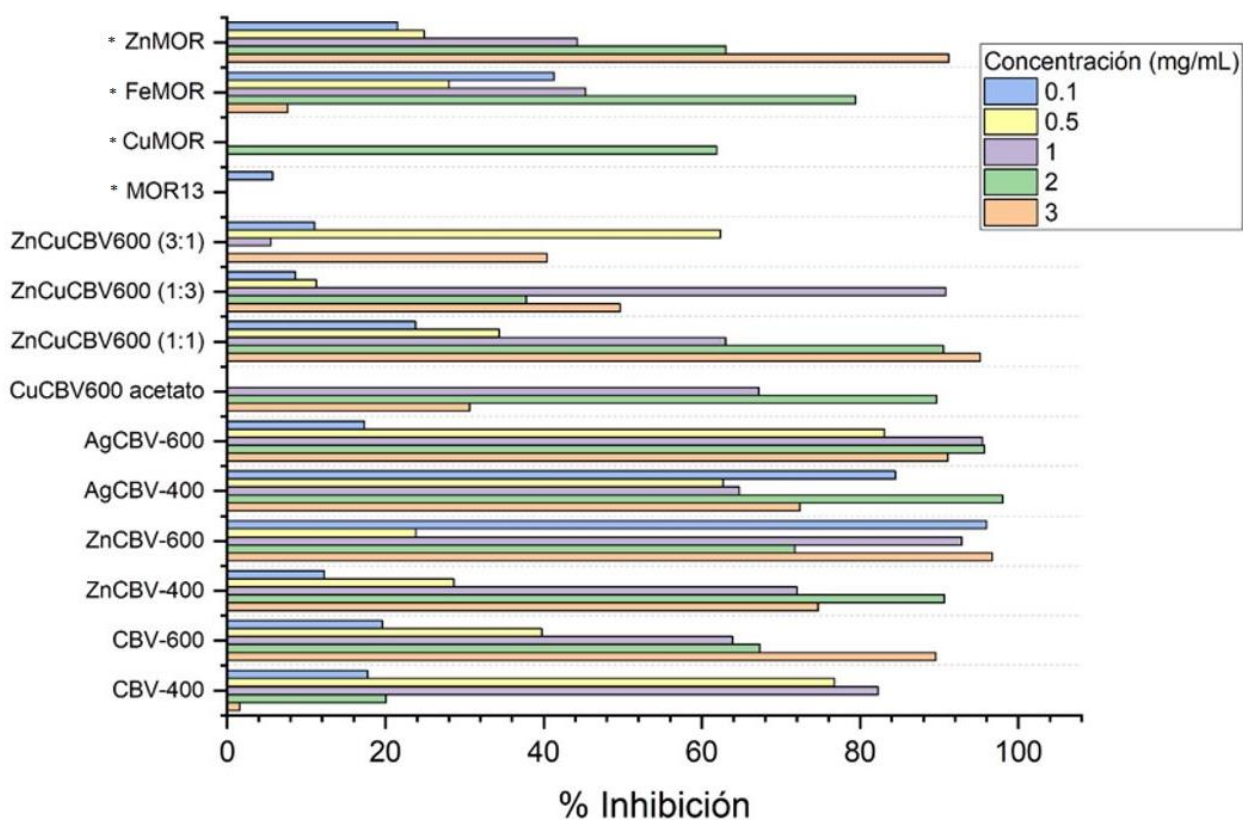
**Figura 12.** Porcentaje de inhibición de *E. coli* a 16 h con FAU con zinc y plata y MOR con Zn, Fe y Cu.

En la Figura 13 se puede observar el crecimiento de *E. coli* con la zeolita CBV-600 a diferentes concentraciones. A medida que se aumenta la concentración, aumenta la actividad antibacteriana que posee este nanomaterial. Además, se determinó que la concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>) a 16 h fue de  $0.96 \pm 0.08$  mg/mL.



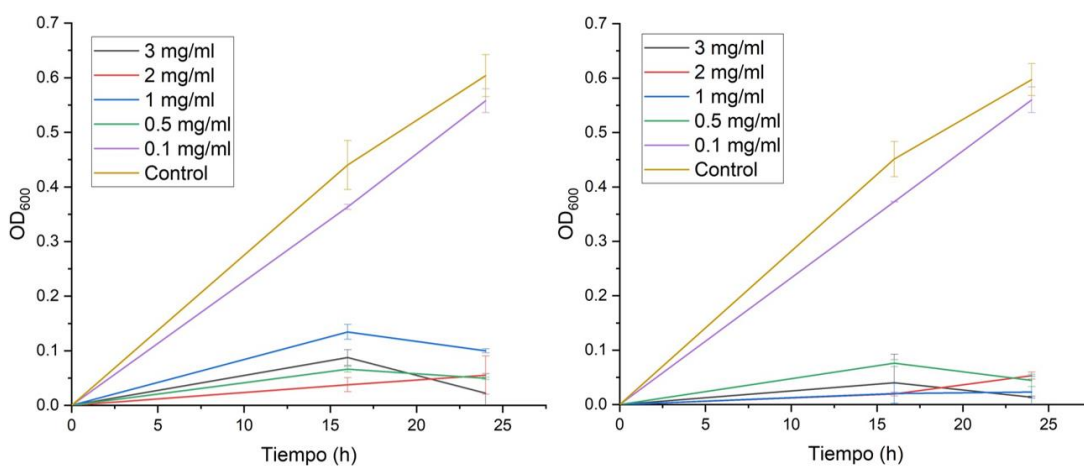
**Figura 13.** Crecimiento de *E. coli* hasta 24 h con FAU CBV-600 a la izquierda, a la derecha se muestra el comportamiento con el NM y la determinación de la IC<sub>50</sub>. A mayor densidad óptica (OD) mayor crecimiento de bacterias. Se tomaron mediciones a las 16 y 24 h.

En la Figura 14 se observa el crecimiento de *S. aureus* y *B. pumilus* a 16 h con dos estructuras de zeolitas diferentes, MOR13 la cual también tiene Zn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> y Cu<sup>2+</sup> en su estructura, además de FAU (CBV-400 y CBV-600) la cual tiene en su estructura Ag<sup>+</sup>, Zn<sup>2+</sup> y una zeolita bimetalica con diferentes relaciones ZnCu (3:1, 1:3, 1:1). El crecimiento de *S. aureus* y *B. pumilus* a 24 h se muestra en el anexo 2. Para estas bacterias gram positivas, las zeolitas MOR cuando estaban dopadas con Cu no afectaban el crecimiento de *B. pumilus*, las bacterias gram positivas tenían su crecimiento normalmente. Sin embargo, cuando el Zn estaba incorporado en la estructura de la MOR, la inhibición de la bacteria era del 91% a una concentración de 3 mg/mL, incluso a una concentración de 2 mg/mL fue del 63%. Por otra parte, la zeolita FAU CBV-600 demostró también tener actividad antibacteriana, a una concentración de 3 mg/mL, inhibiendo el 89% del crecimiento de *S. aureus*. En cuanto a las zeolitas bimetalicas, ZnCuCBV600 (1:1) presentó la mejor actividad, con una inhibición de 95% a una concentración de 3 mg/mL, por lo que su eficiencia bactericida es mejor con bacterias gram positivas. Nuevamente, las zeolitas FAU fueron las que presentaron la mejor actividad, mayor aun las que tenían Ag y Zn, AgCBV-600 y ZnCBV-600. Se trabajaron algunas de estas zeolitas en placa para evaluar la actividad que tenían en medio sólido.



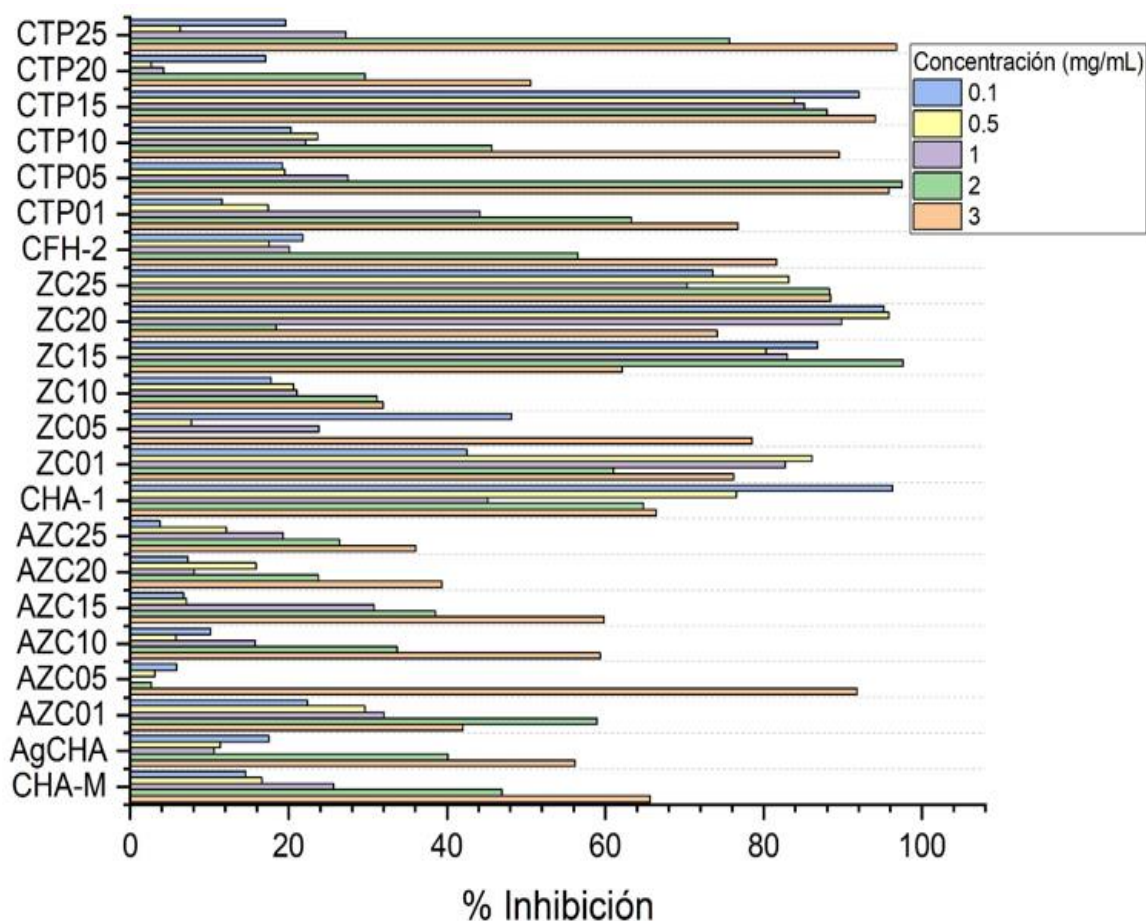
**Figura 14.** Porcentaje de inhibición de *S. aureus* a 16 h con FAU con zinc y plata, y MOR con Zn, Fe y Cu. \*Las muestras MOR, ZnMOR, FeMOR y CuMOR se hicieron con el microorganismo *B. pumilus*.

En la Figura 15 se observa el crecimiento de las bacterias gram negativas y positivas utilizadas, se puede ver el efecto inhibitorio de AgCBV-600 que funciona a concentraciones superiores a 0.1 mg/mL. A medida que se aumenta la concentración, aumenta la actividad antibacteriana que posee este nanomaterial.



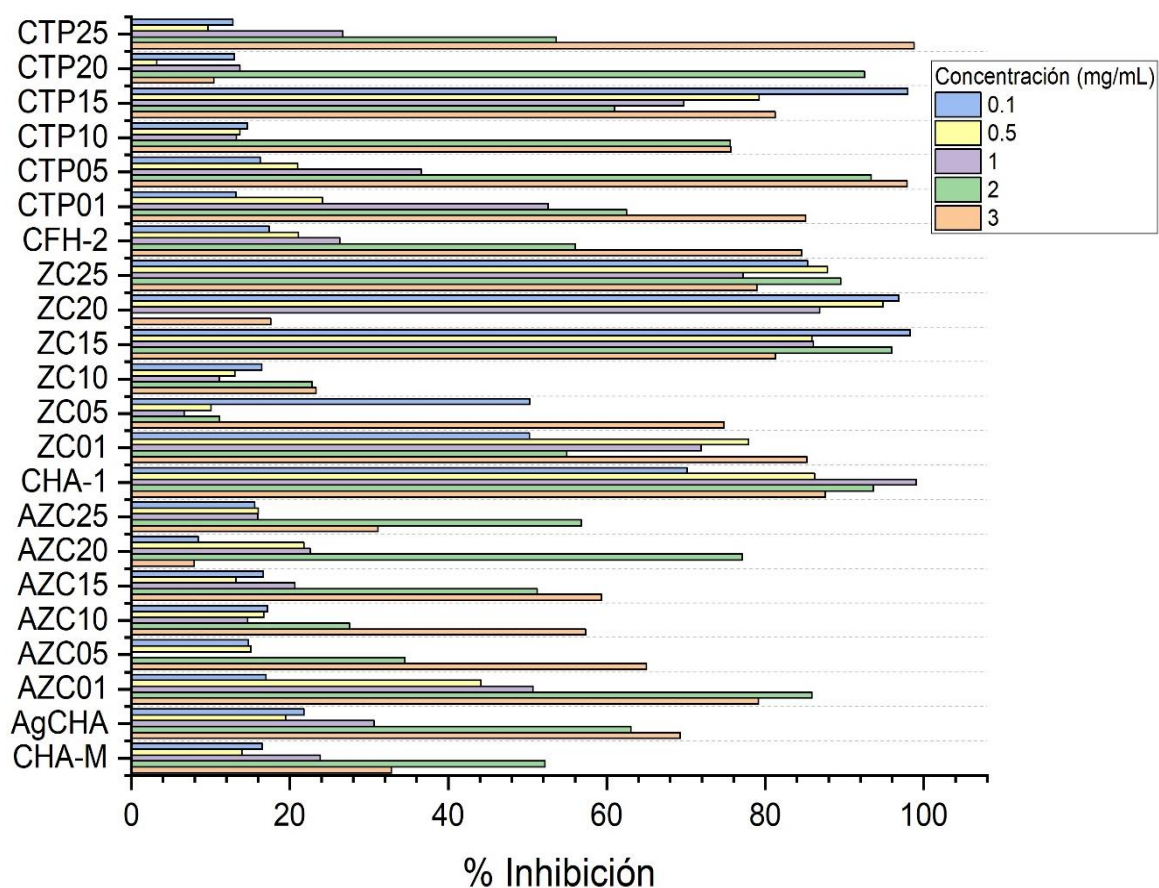
**Figura 15.** Crecimiento de *E. coli* con AgCBV-600 (izquierda) y crecimiento de *S. aureus* con AgCBV-600 (derecha). Se tomaron mediciones a las 16 y 24 h.

En la Figura 16 se muestra la gráfica del crecimiento de *E. coli* a 16 h con la zeolita CHA, los resultados a 24 h se muestran en el anexo 2, las estructuras más sencillas de este tipo de zeolitas estudiadas fueron CHA-M, CHA-1 y CFH-2. AgCHA es la chabazita CHA-M que está dopada con Ag y, las muestras AZC son esta misma chabazita que está intercambiada con Ag a diferentes concentraciones de ZnO/Ce (1, 5, 10, 15, 20, 25%). ZC viene de CHA-1 y es chabazita con ZnO/Ce a diferentes concentraciones. CTP viene de CFH-2 y son chabazitas que tienen TiO<sub>2</sub>/Pr en su estructura. En este caso, se pudo observar que las zeolitas CHA, CHA-M, CHA-1 y CFH-2 fueron similares en su actividad de inhibición alrededor de 65% a una concentración de 3 mg/mL. Comparado con esto, las bacterias tratadas con las zeolitas AZC no tuvieron un porcentaje de supervivencia significativo a diferencia de las bacterias tratadas con las zeolitas CTP, por ejemplo, CTP15, que fue una de las mejores, se observaba su efecto bactericida desde concentraciones bajas (0.1 mg/mL), y a una concentración de 3 mg/mL tuvo una inhibición del 94%. ZC25 también tuvo una buena actividad bactericida, con 88% de inhibición tanto para 2 y 3 mg/mL. En general, los resultados anteriores muestran que para *E. coli*, la eficiencia de inhibición de las zeolitas es CTP > ZC > AZC.



**Figura 16.** Porcentaje de inhibición de *E. coli* a 16 h con zeolitas chabazita.

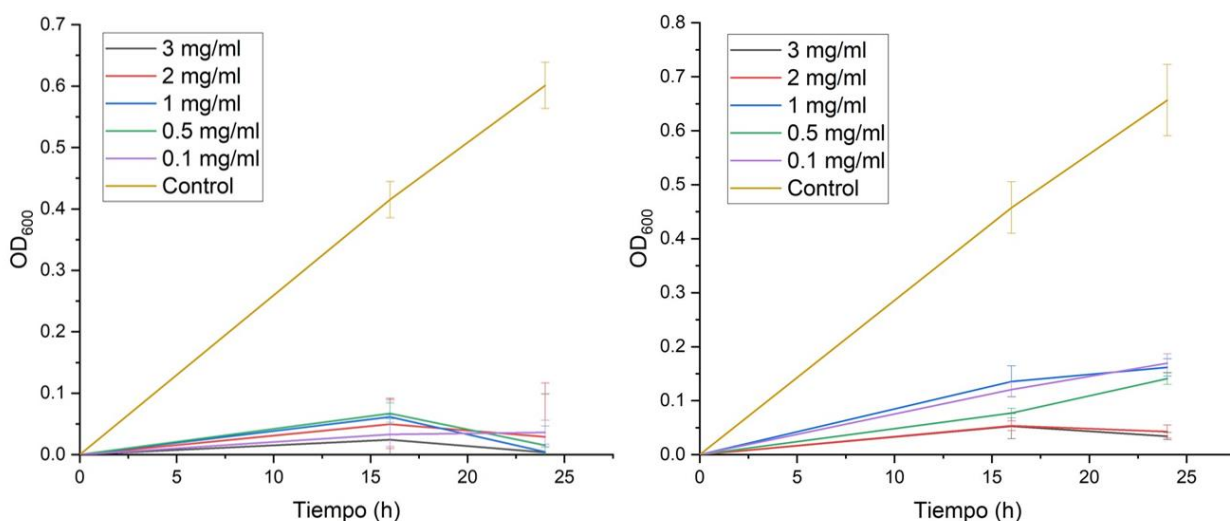
Por otra parte, la Figura 17 muestra el crecimiento de *S. aureus* a 16 h con CHA, los resultados de inhibición a 24 h se muestran en el anexo 2, en este caso se observó que ZC25 funcionó mejor que CTP15, nuevamente el efecto inhibitorio de las zeolitas AZC era menor que las CHA por si solas. ZC25 a una concentración de 3 mg/mL tuvo una actividad inhibitoria del 78% y en promedio para las diferentes concentraciones utilizadas tuvo una inhibición del 80%. La zeolita CTP15 que contenía  $\text{TiO}_2/\text{Pr}$  en su estructura a una concentración del 15%, tuvo una actividad de inhibición del 81% a una concentración de 3 mg/mL del nanomaterial.



**Figura 17.** Porcentaje de inhibición de *S. aureus* a 16 h con zeolitas chabazita.

En la Figura 18 se muestra el crecimiento de la bacteria gram negativa con dos de las chabazitas que tuvieron una buena actividad de inhibición de los microorganismos gram positivos y gram negativos, de acuerdo con los resultados mostrados en el diagrama de la figura 14. Se puede observar que funciona el tratamiento desde concentraciones bajas (0.1 mg/mL) tanto para CTP15 como para ZC25. Hay una

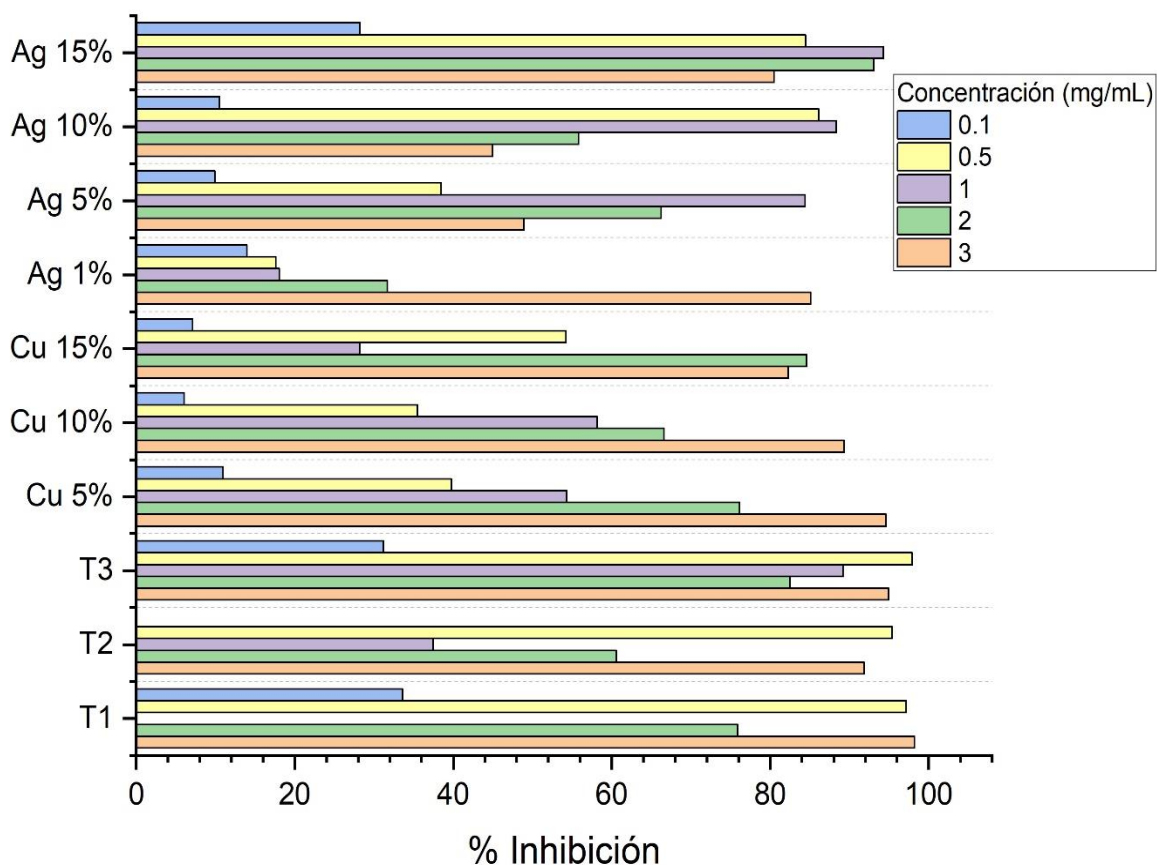
evidente reducción de la densidad óptica de las bacterias, esto quiere decir que se inhibe el crecimiento de la bacteria desde concentraciones bajas del nanomaterial.



**Figura 18.** Crecimiento de *E. coli* con CTP15 (izquierda) y con ZC25 (derecha).

### 3.1.2 Actividad antibacteriana de carbonitruros

La Figura 19 muestra el crecimiento de *E. coli* a 16 h, ver anexo 2 para crecimiento a 24 h, con carbonitruros. Las estructuras principales fueron T1, T2 y T3, esto quiere decir, los carbonitruros sin dopar. El carbonitruro T3 fue la estructura que se dopó con diferentes concentraciones de Ag (1-15%) y con Cu (5-15%) para los ensayos posteriores. Se determinó que los carbonitruros por sí mismos presentan actividad bactericida contra *E. coli*. T3, por ejemplo, a una concentración de 3 mg/mL tuvo un porcentaje de inhibición de 95%. Por otro lado, se observó que cuando los carbonitruros se doparon con plata (Ag) a una concentración de 15% presentan una eficiencia de inhibición del 93% a una concentración de 2 mg/mL. Sin embargo, a una concentración mayor de 3 mg/mL de T3-Ag su eficiencia de inhibición disminuía a 81%. En este sentido, a una concentración de 1% Ag en el carbonitruro T3, el nanomaterial funcionó mejor a concentraciones altas, 3 mg/mL con un porcentaje de inhibición de 86%, sin embargo, a concentraciones inferiores, no presenta un efecto bactericida significativo. En el caso del carbonitruro dopado con Cu, una concentración del 5% es suficiente para tener una buena actividad antibacterial. A una concentración de 3 mg/mL de este nanomaterial, su porcentaje inhibitorio es de 95%. Se pudo observar un mejor comportamiento de dispersión en los experimentos cuando había Cu en el carbonitruro, que cuando solo era el carbonitruro sin dopar, a pesar de tener el mismo porcentaje de supervivencia.



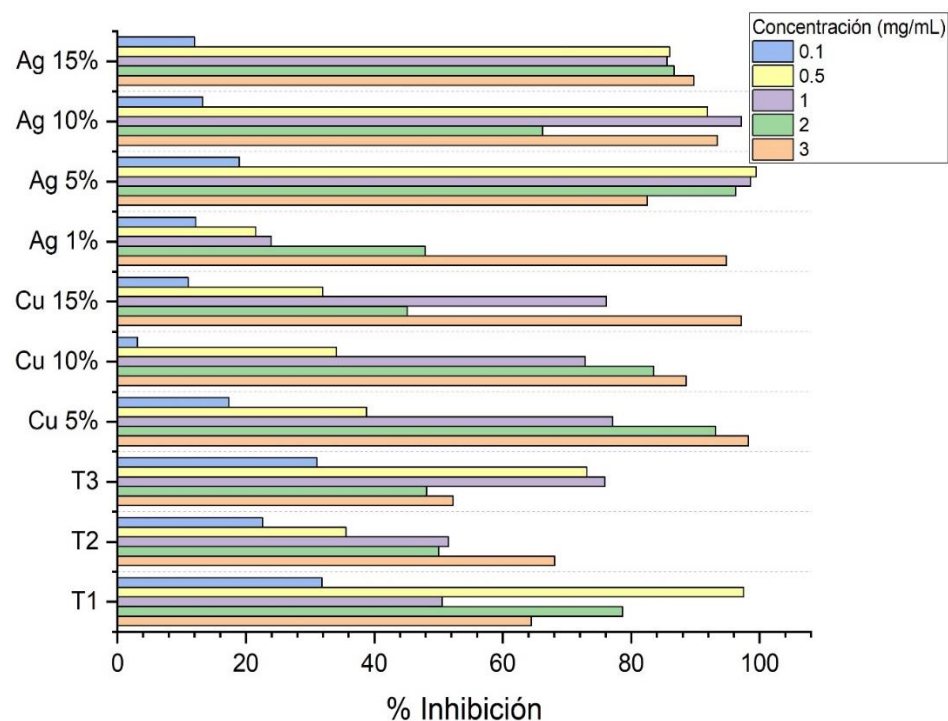
**Figura 19.** Porcentaje de inhibición de *E. coli* a 16 h con carbonitruros, matrices primarias T1, T2 y T3. \*El carbonitruto T3 fue el único que se dopó con Ag y Cu a diferentes concentraciones.

En la Figura 20 se muestra el crecimiento a 16 h de *S. aureus* con los carbonitrutos T1, T2 y T3 y cuando están dopados con Cu y Ag (ver anexo 2 para crecimiento a 24 h). En este caso, los carbonitrutos por si solos presentaron actividades de inhibición menores que con *E. coli*. Sin embargo, cuando el carbonitruto T3 fue dopado con Ag en su estructura, su actividad de inhibición se incrementó. El carbonitruto con 15% de Ag, presentó una inhibición del 90% a una concentración de 3 mg/mL. Sin embargo, la eficiencia bactericida de este nanomaterial es menor al 85% a concentraciones entre 0.5 y 2 mg/mL. Los carbonitrutos dopados con Cu al 5% presentan una mejor capacidad bactericida a concentraciones superiores a 1 mg/mL.

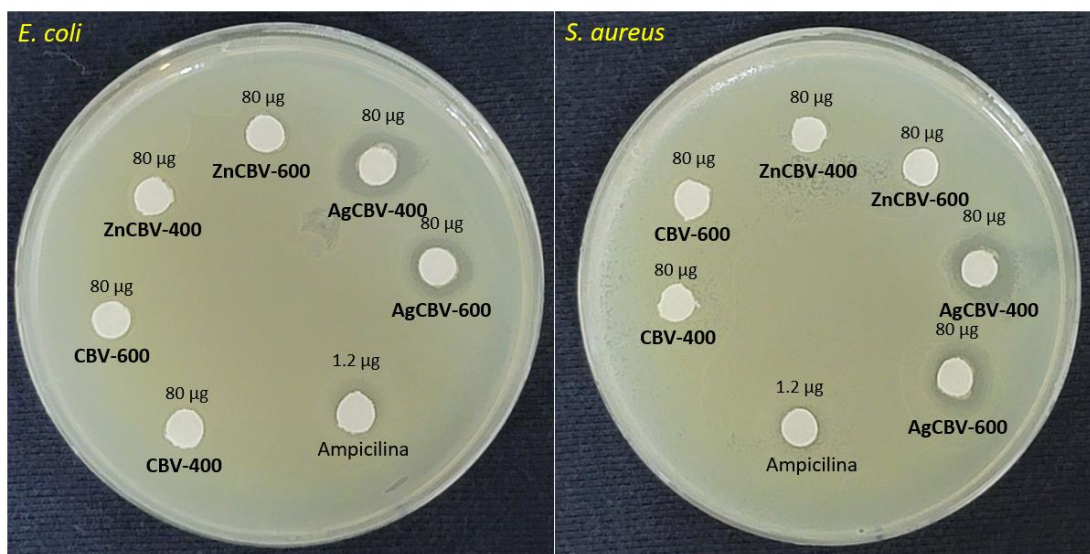
### 3.2 Pruebas de susceptibilidad bacteriana

La Figura 21 muestra el crecimiento de las bacterias y la actividad bactericida de las zeolitas FAU. Como se puede observar, tanto para *E. coli* como para *S. aureus*, las que muestran mejor actividad en medio sólido

son las zeolitas que contienen Ag en su estructura (AgCBV-400 y AgCBV-600). En el resto de los nanomateriales apenas era perceptible el halo de inhibición. El diámetro de inhibición que se obtuvo de AgCBV-400 fue de 1.2 cm a diferencia de AgCBV-600 con 1.06 cm. La ampicilina control tuvo un diámetro de inhibición de 0.93 cm. Debido a que se agregaron 4  $\mu\text{L}$  a cada disco a partir de la solución stock de 20 mg/mL, se determinó que había aproximadamente 80  $\mu\text{g}$  de nanomaterial en cada disco.



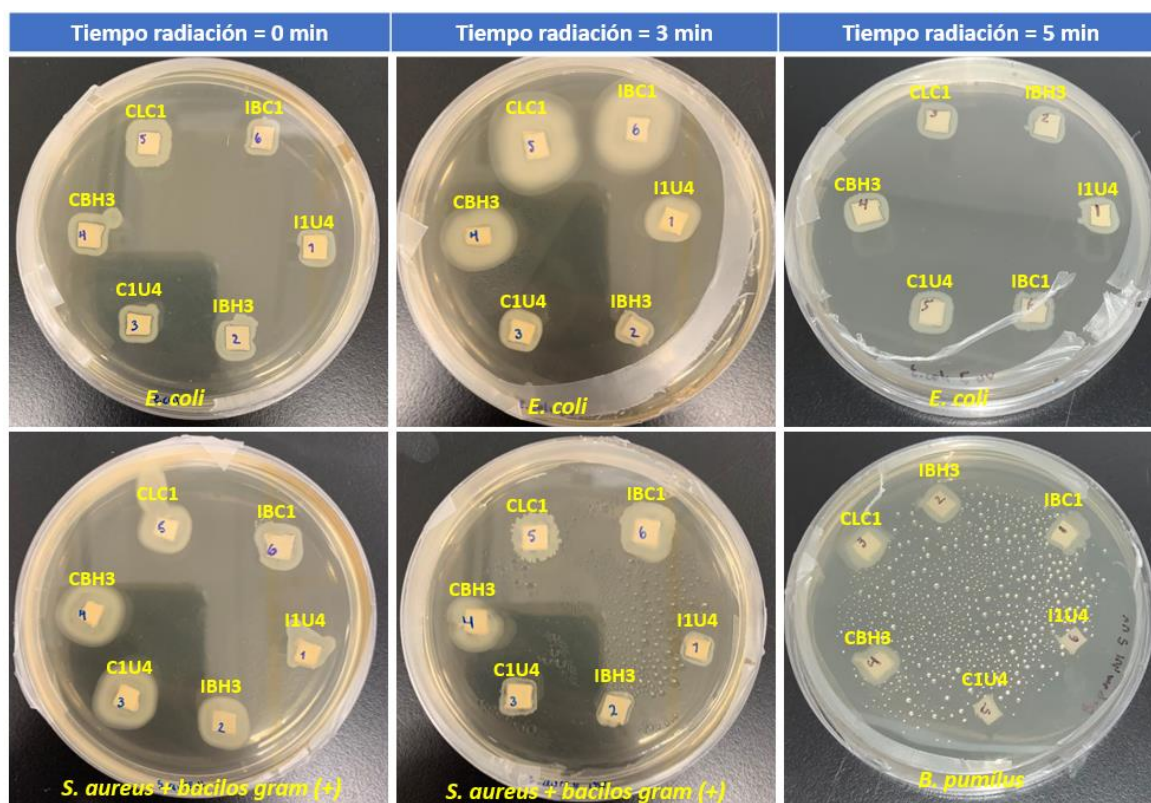
**Figura 20.** Porcentaje de inhibición de *S. aureus* a 16 h con carbonitruros, matrices primarias T1, T2 y T3. \*El carbonitruto T3 fue el único que se dopó con Ag y Cu a diferentes concentraciones.



**Figura 21.** Pruebas de susceptibilidad bacteriana *E. coli* (izquierda), *S. aureus* (derecha).

### 3.3 Pruebas de inhibición en telas impregnadas con TiO<sub>2</sub> NPs

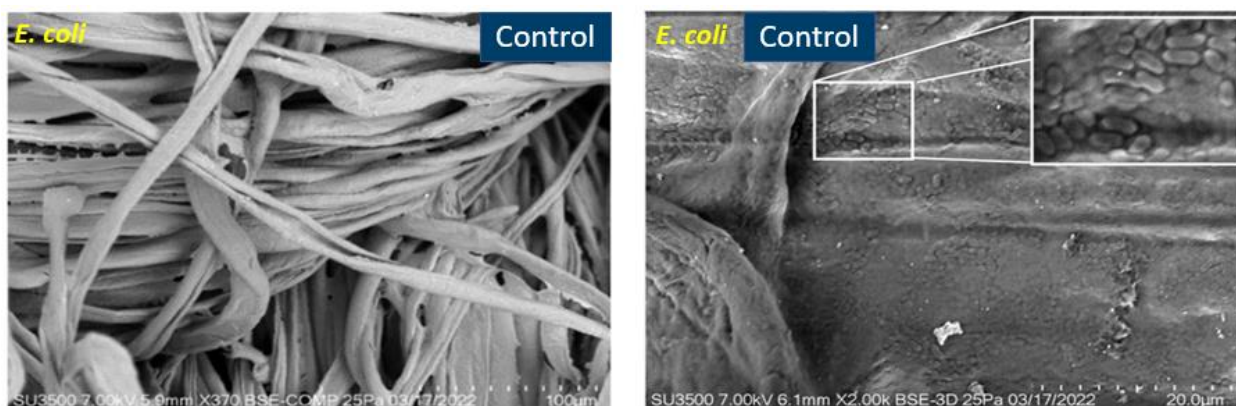
En la Figura 22 se muestra el efecto de las telas impregnadas con TiO<sub>2</sub> NPs en ambas bacterias. En los dos casos, a  $t = 0$  min se puede ver como la bacteria crece normalmente, sin embargo, a un tiempo de exposición  $t = 3$  min, hay un crecimiento mayor de las dos bacterias, gram positivas y gram negativas. Sin embargo, es menor el crecimiento bacteriano sobre el indiolino blanco con BuOT como precursor (IBH3) para *E. coli* y *S. aureus*, con el textil que tiene impregnadas TiO<sub>2</sub> NPs a diferencia de I1U4 (indiolino blanco con IPT como precursor), en el cual se ve mayor inhibición únicamente con *S. aureus*. Se comprobó la diferencia con los controles que no tenían las NPs (CLC1 e IBC1). De las muestras con el textil bata de laboratorio de algodón C1U4 y CBH3, fue esta última la que tuvo mejor actividad. A un tiempo de radiación  $t = 5$  min algunas muestras como el indiolino blanco con TiO<sub>2</sub> NPs (I1U4) mostraron una inhibición en la placa por completo de *B. pumilus*. A un tiempo de radiación  $t = 10$  min no se observó la presencia de los microorganismos en la placa. Gracias a estos resultados se tomó la muestra I1U4 para llevar a cabo los experimentos *in situ*.



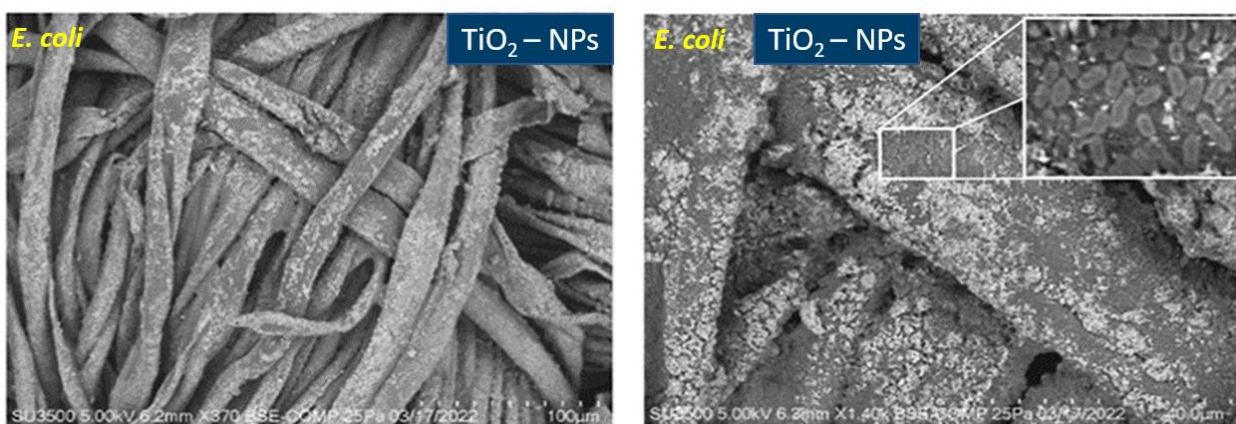
**Figura 22.** Actividad fotocatalítica de TiO<sub>2</sub> NPs impregnadas en tela a diferentes tiempos de radiación con una longitud de onda de 254 nm. Textiles sin TiO<sub>2</sub> NPs: CLC1 (bata de laboratorio de algodón), IBC1 (indiolino blanco). Textiles con TiO<sub>2</sub> NPs impregnadas: I1U4 y IBH3 (indiolino blanco), C1U4 y CBH3 (bata de laboratorio de algodón).

### 3.4 Pruebas de actividad antibacteriana *in situ* en telas impregnadas con TiO<sub>2</sub> NPs

La Figura 23 muestra el crecimiento de bacterias *E. coli* cuando no están expuestas a la luz UV, el crecimiento sobre todo el textil es bastante notable, *E. coli* crece sobre toda la superficie del textil a diferencia de la Figura 24 donde se muestra el textil impregnado con las TiO<sub>2</sub> NPs y en el cual las bacterias solo crecen en las regiones o áreas superficiales en donde las nanopartículas no están disponibles. En las imágenes se puede observar a *E. coli* con una morfología típica, de dimensiones de 1-2  $\mu\text{m}$  de largo, con un diámetro de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ . Las micrografías de microscopía electrónica de barrido muestran que el nanomaterial que impregna las telas tiene una forma granular y también se alcanzan a observar las fibras del textil.

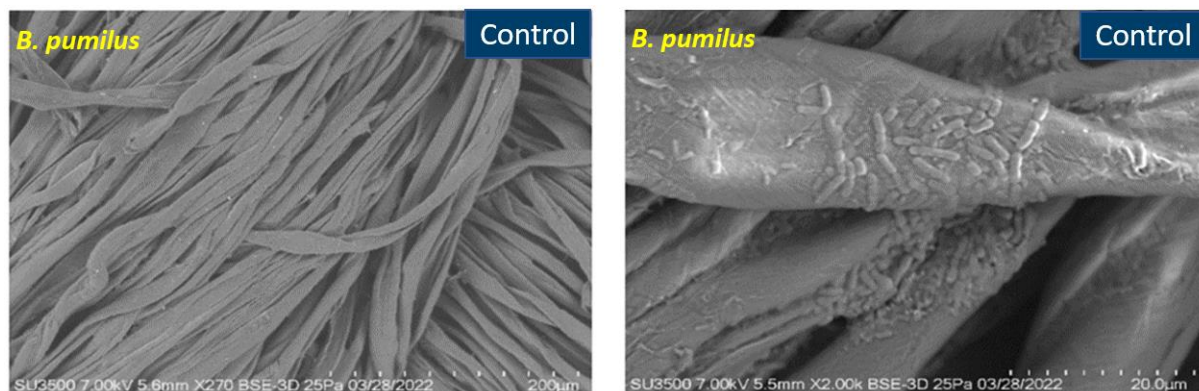


**Figura 23.** *E. coli* sobre textil indiolino blanco. A la izquierda se muestra un aumento de 370X, a la derecha un aumento de 2000X.

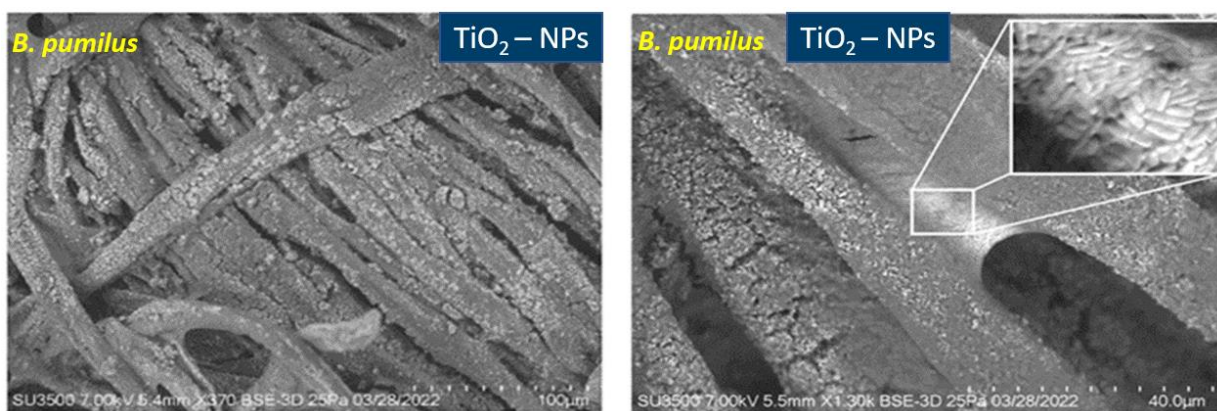


**Figura 24.** *E. coli* sobre textil indiolino blanco tratado con TiO<sub>2</sub> NPs sin exposición a la luz UV. A la izquierda se muestra un aumento de 370X, a la derecha un aumento mayor de 1400X.

La Figura 25 muestra el crecimiento de *B. pumilus* cuando no están expuestas a la luz UV, el crecimiento sobre el textil es similar al que se tuvo con *E. coli*. Se observó que *B. pumilus* crece sobre toda la superficie del textil igualmente, a diferencia de la Figura 26 en donde el textil contiene nanopartículas de óxido de titanio ( $\text{TiO}_2$  NPs) impregnadas y también en este caso las bacterias solo crecen en las regiones en donde las nanopartículas no se encuentran disponibles. Las micrografías obtenidas por medio de microscopía electrónica de barrido, muestran que la bacteria *B. pumilus* presenta morfologías típicas en forma de bastones, con dimensiones en un rango de 0.5-1  $\mu\text{m}$  de ancho por 1 a 4  $\mu\text{m}$  de largo.



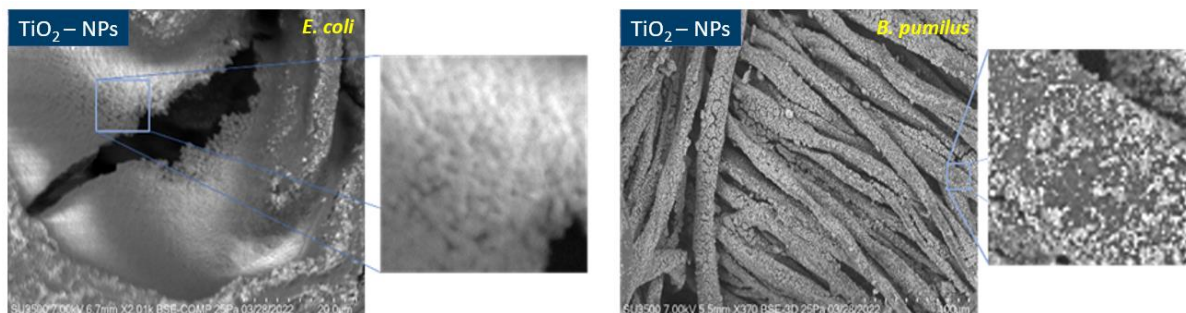
**Figura 25.** *B. pumilus* sobre textil indiolino blanco. A la izquierda se observa un aumento de 270X, a la derecha un aumento mayor de 2000X.



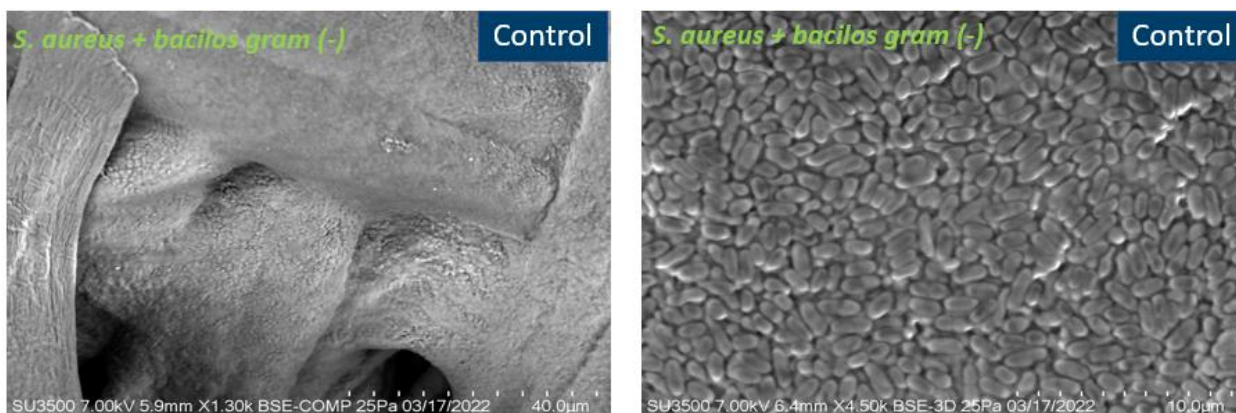
**Figura 26.** *B. pumilus* sobre textil indiolino blanco tratado con  $\text{TiO}_2$  NPs sin exposición a la luz UV. A la izquierda un aumento de 370X, a la derecha un aumento mayor de 1300X.

Cuando la tela es irradiada durante 3 minutos, se observó que hubo un crecimiento mayor, además de la formación de un biofilm bacteriano sobre el textil indiolino lo cual dificultó su visualización en el microscopio por lo cual no se pudieron tomar las micrografías, sin embargo, a un tiempo de 5 minutos la morfología de las bacterias fue diferente a las que se habían observado anteriormente, no se encontraron

formas típicas o características de las bacterias (Figura 27). En tiempos superiores a 10 minutos, no fue posible observar las bacterias tanto en el control como en la tela tratada con  $\text{TiO}_2$  NPs. También se llevó a cabo con una cepa mezclada de *S. aureus* y bacterias gram (-), como se puede observar en la Figura 28 los microorganismos crecen en toda la superficie del textil. Por otra parte, en la Figura 29 se observa como nuevamente las bacterias pueden crecer en zonas donde no se sitúan las  $\text{TiO}_2$  NPs.

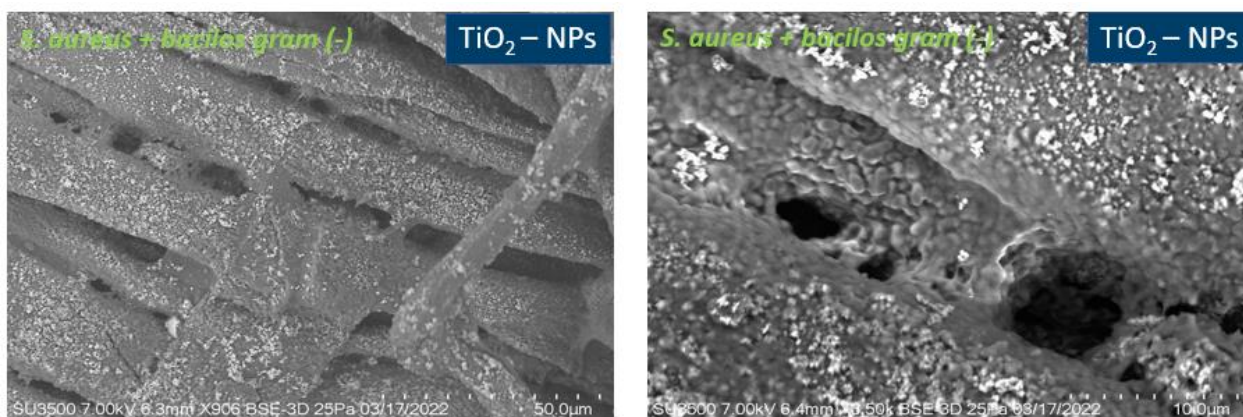


**Figura 27.** A la izquierda *E. coli* sobre textil indiolino blanco impregnado con  $\text{TiO}_2$  NPs a un tiempo de exposición total de 5 minutos con UV (254 nm) a un aumento de 2000X; a la derecha *B. pumilus* sobre textil indiolino blanco impregnado con  $\text{TiO}_2$  NPs a un tiempo de exposición con UV por 5 minutos, a un aumento de 370X.

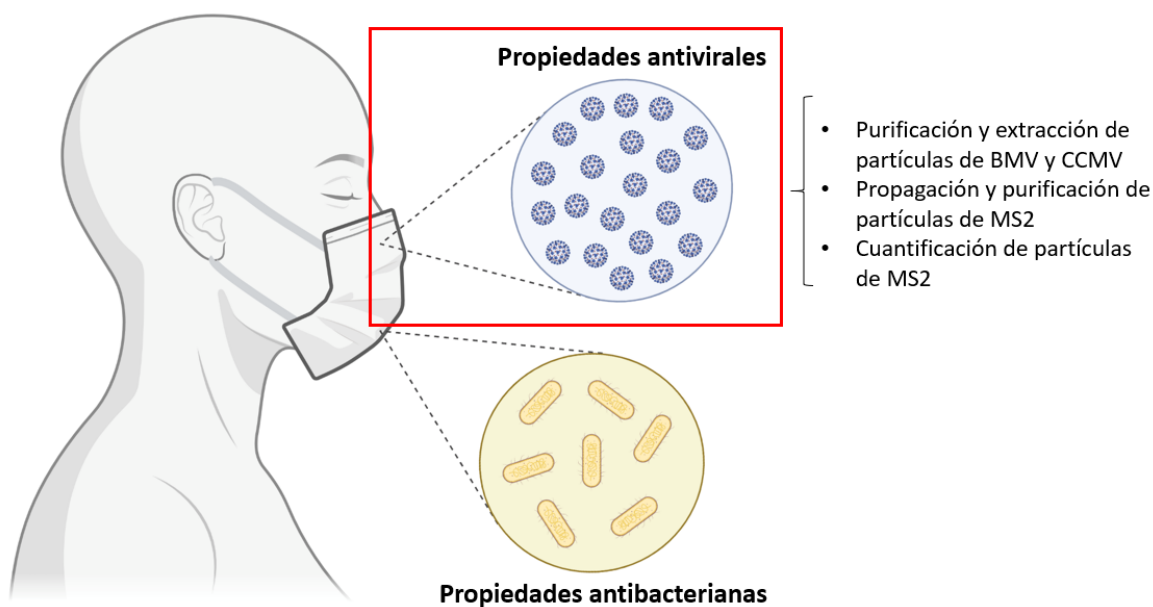


**Figura 28.** *S. aureus* y bacterias gram (-) sobre textil indiolino blanco sin exposición a luz UV. A la izquierda un aumento de 1300X, a la derecha un aumento mayor de 4500X.

Posterior a estos resultados, se seleccionaron los nanomateriales que tuvieran un efecto antibacteriano eficiente, ya que, se desea que tengan un efecto, tanto antibacteriano como antiviral (Figura 30). A continuación, se presentan los resultados de purificación de los virus, además de la cuantificación y la actividad antiviral que los nanomateriales poseen.



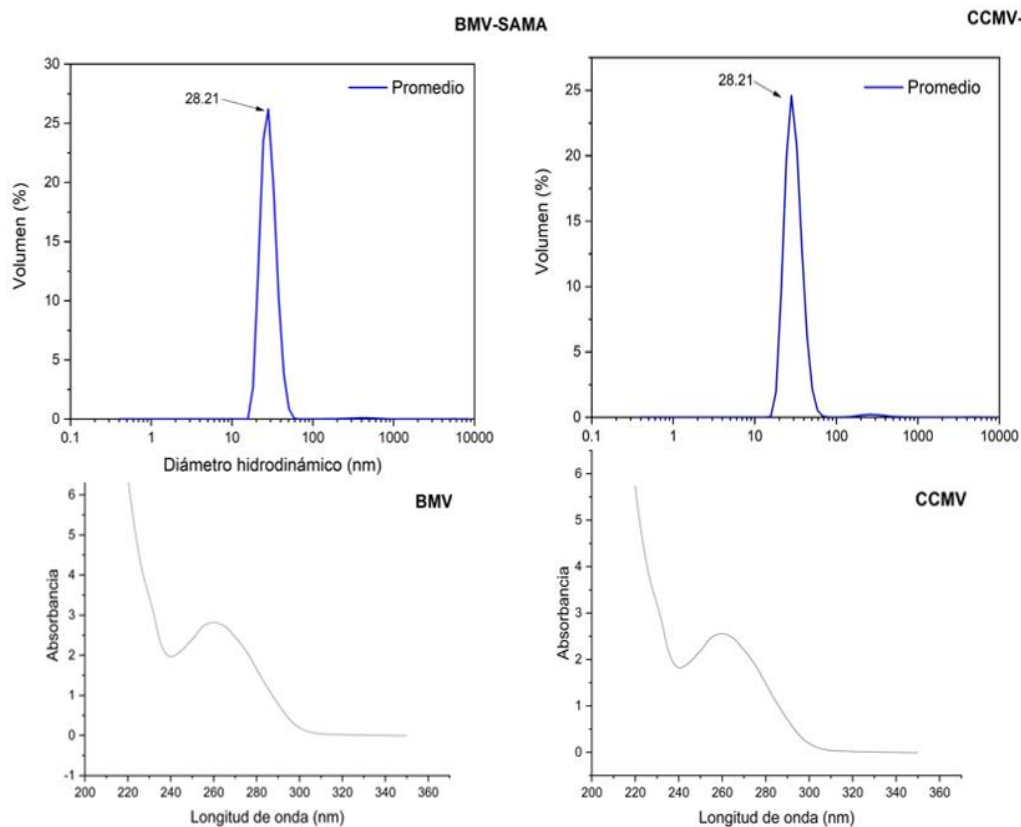
**Figura 29.** *S. aureus* y bacterias gram (-) sobre textil indiolino blanco tratado con  $\text{TiO}_2$  NPs sin exposición a la luz UV. A la izquierda un aumento de 906X, a la derecha un aumento mayor de 3500X.



**Figura 30.** Ensayos que se llevaron a cabo para determinar las propiedades antivirales de los nanomateriales. Se utilizaron diferentes virus como modelo. Figura creada con BioRender.com.

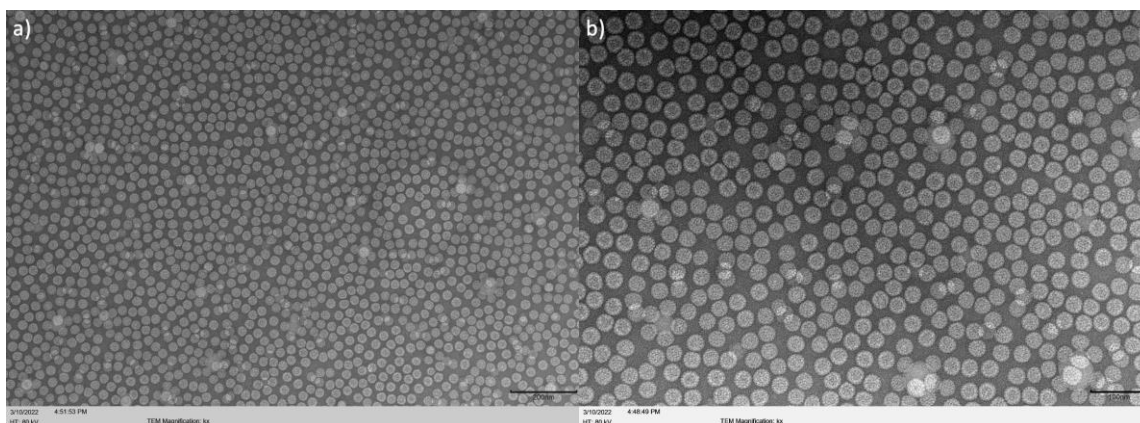
### 3.5 Purificación de BMV y CCMV

Después de purificar los virus, se determinó mediante la técnica de DLS el diámetro hidrodinámico de BMV y CCMV con un promedio de 28.21 nm (Figura 31). Se obtuvo una pureza de 1.7 para BMV y 1.73 para CCMV. La dispersión dinámica de luz se utilizó para medir el radio hidrodinámico de las partículas. El tamaño hidrodinámico muestra cómo se comporta la partícula en un fluido. Se obtuvieron también los espectros de absorción mediante UV-Vis de los virus obteniendo una concentración de los virus de 4 mg/mL.

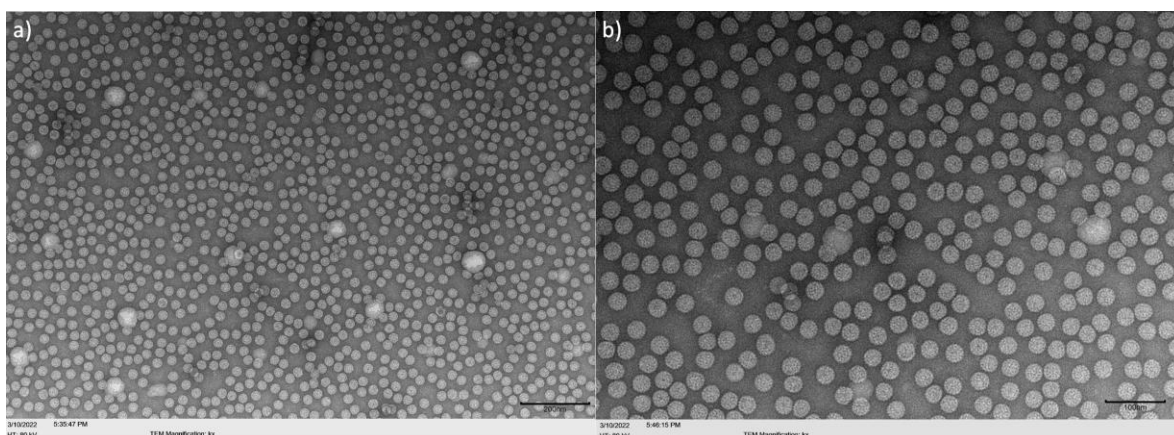


**Figura 31.** Diámetro hidrodinámico obtenido para BMV y CCMV, debajo se muestran los espectros de absorción por UV-Vis.

En la Figura 32 y la Figura 33 se muestran las imágenes obtenidas por TEM de los virus BMV y CCMV respectivamente. Los tamaños observados en estas micrografías coinciden a los obtenidos por DLS. Los virus BMV y CCMV mostraron una morfología esférica, las partículas podían apreciarse de manera individual y estaban de manera monodispersa, esto quiere decir que tienen un tamaño uniforme y definido para todas las partículas.



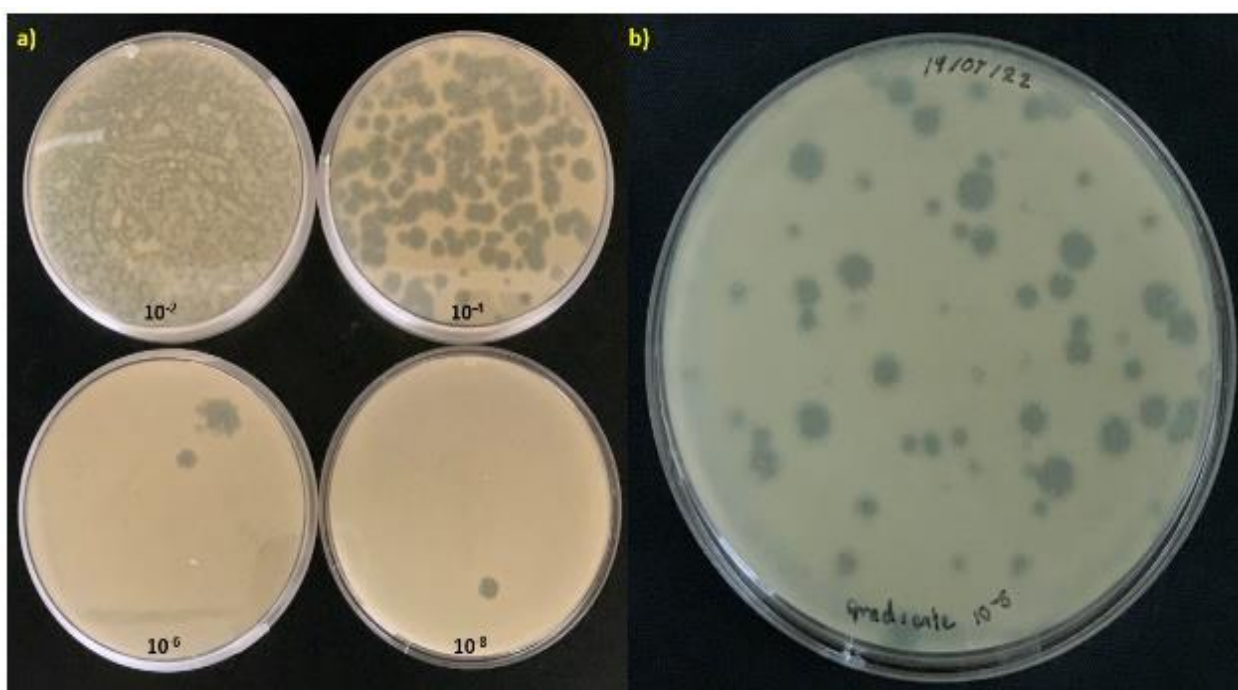
**Figura 32.** Micrografías electrónicas de transmisión de partículas de BMV. a) Magnificación a 40kX y b) 70kX.



**Figura 33.** Micrografías electrónicas de transmisión de partículas de CCMV. a) Magnificación a 40kX y b) 70kX.

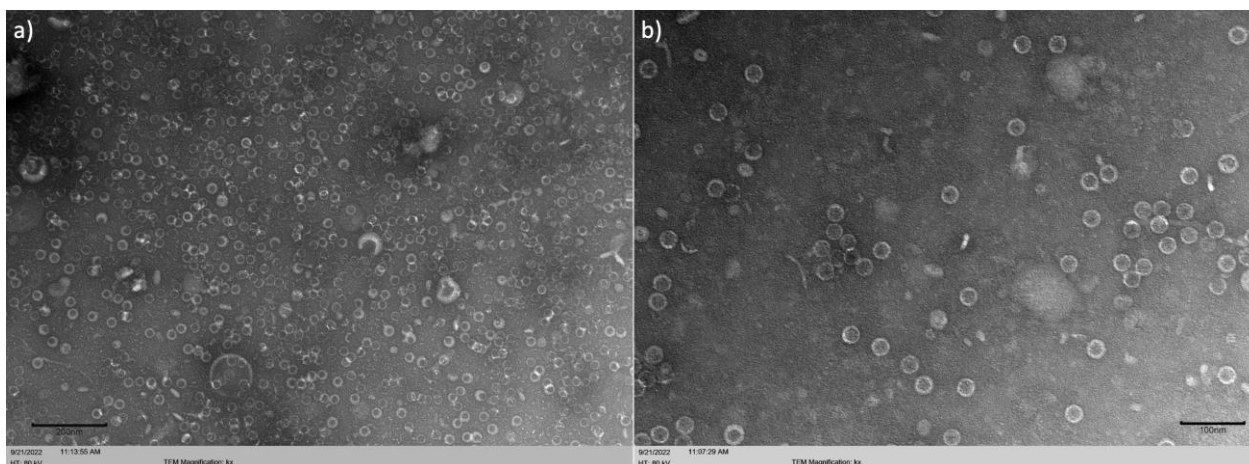
### 3.6 Producción del bacteriófago MS2

La Figura 34 muestra las placas con el bacteriófago a diferentes diluciones para poder cuantificar el MS2 purificado. Se determinó que a una dilución de  $10^{-5}$  (1:100000) de la solución de virus purificada era posible cuantificar, obteniendo un total de  $2.6 \times 10^8$  pfu/mL.



**Figura 34.** Cuantificación en placa del bacteriófago MS2. a) Placas con diluciones  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-8}$  en donde era difícil poder llevar a cabo el conteo de colonias a diferencia de b) una dilución en placa de  $10^{-5}$  en donde se cuantificó el número de colonias obteniendo un pfu de  $10^8$  por mL.

El MS2 generalmente se cuantifica contando las unidades infecciosas a través de ensayo en placa. Este ensayo se determina la capacidad que tienen los bacteriófagos para matar a la célula hospedera y permitir la propagación nuevamente de los viriones. En la Figura 34 se observa un área circular transparente de células lisadas y cada placa de agar representa una dilución diferente para poder cuantificar. También se tomaron imágenes de TEM de este virus purificado. En la Figura 35 se muestran las micrografías obtenidas de este virus. El bacteriófago MS2 mostró una morfología esférica y monodispersas, las partículas se observaron de manera individual, sin embargo, no estaban tan bien organizadas a comparación del BMV y CCMV.



**Figura 35.** Micrografías TEM de partículas del virus MS2. a) Magnificación a 40k y b) 70k.

### 3.7 Actividad de adsorción viral de los nanomateriales

En la Figura 36 se muestra el efecto de adsorción del virus BMV sobre la zeolita FAU. Se observa que la zeolita FAU tiene un porcentaje bajo de atrapamiento del virus, en comparación cuando está dopada con Ag en su estructura. La zeolita sin dopar CBV-600 a un tiempo de incubación = 5 min mostró un porcentaje de adsorción menor al 1%, a diferencia de cuando tenía incorporada Ag, la muestra AgCBV-600 al mismo tiempo de incubación presentó un 25% de adsorción del virus. A un tiempo de incubación de 30 minutos CBV-600 adsorbió el 10% de BMV, a diferencia de AgCBV-600 con un porcentaje de 25%. Al igual que AgCBV-600, la muestra AgCBV-400 a medida que transcurre el tiempo sigue aumentando la adsorción de BMV, se puede notar que a las dos horas de transcurrido el experimento, AgCBV-500 alcanzó un 42%. Cuando FAU tiene Zn en su estructura, es decir, la muestra ZnCBV-400 se observa que a 15 minutos tiende a alcanzar un porcentaje de adsorción de 27%, después de esto se observa aparentemente un proceso de

desorción del virus. Por otra parte, también se probó con la zeolita CHA, CTP15 que contenía  $\text{TiO}_2/\text{Pr}$  en su estructura a una concentración del 15%, se observó que tuvo una baja eficiencia de adsorción.

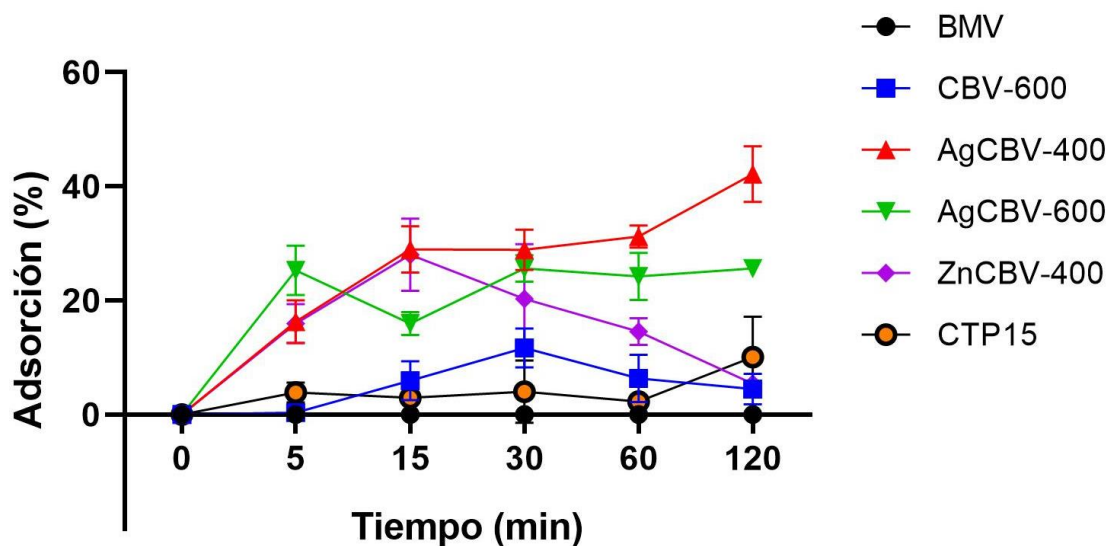


Figura 36. Porcentaje de adsorción de partículas de BMV por diferentes nanomateriales.

La Figura 37 muestra el efecto de adsorción que tienen las zeolitas FAU sobre el virus CCMV, se observa que la faujasita sin dopar tiene efecto de adsorción, sin embargo, la muestra CBV-400 es la que tiene mayor efecto a diferencia de CBV-600. Sin embargo, cuando está dopada con Ag en su estructura el porcentaje aumenta desde los 5 minutos del tiempo de incubación.

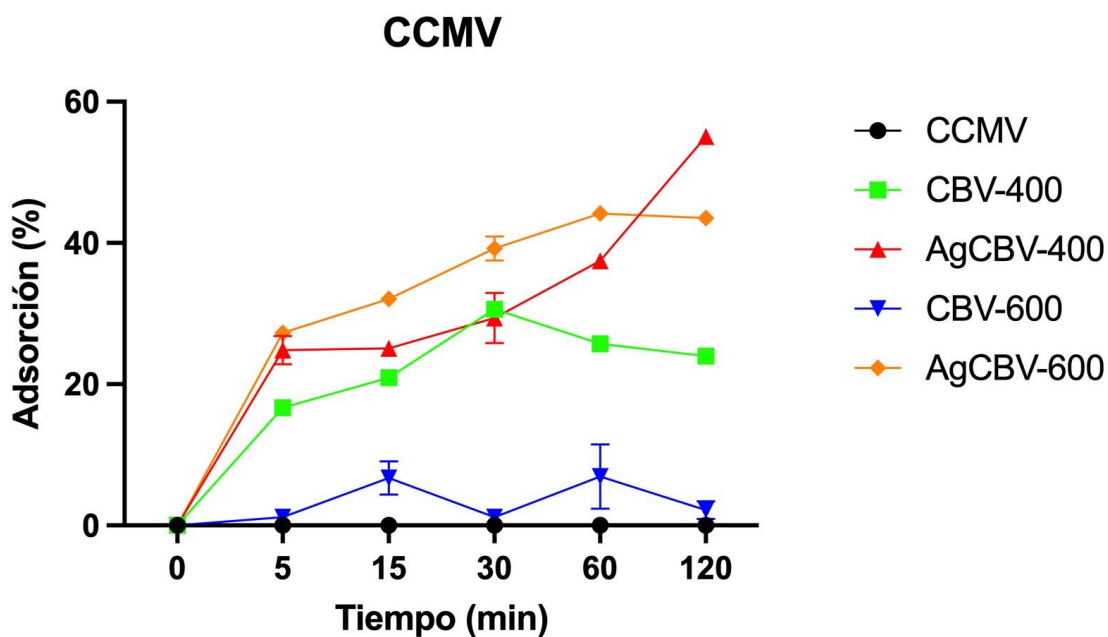


Figura 37. Porcentaje de adsorción de partículas de CCMV por diferentes nanomateriales.

CBV-600 a un tiempo de incubación de 5 minutos muestra un porcentaje de adsorción de 1%, a diferencia de la misma estructura, pero dopada con Ag, AgCBV-600 a un tiempo de incubación de 5 minutos muestra un porcentaje de adsorción de 27%, esta muestra llegó a su máximo a un tiempo de incubación de 60 minutos con un porcentaje de adsorción del 43%. Por otra parte, la zeolita CBV-400 a un tiempo de incubación de 5 minutos mostró un porcentaje de adsorción de 16%, a diferencia de cuando tenía Ag en su estructura, AgCBV-400 al mismo tiempo de incubación con 24%.

Finalmente, la Figura 38 muestra la capacidad de adsorción viral de los nanomateriales sobre el bacteriófago MS2. Nuevamente se muestra como las faujasitas que tienen Ag en su estructura tienen un mayor efecto sobre la adsorción del virus MS2. A los 5 minutos, CBV-600 tiene una adsorción del 2%, sin embargo, la zeolita AgCBV-600 logra adsorber el 11% del MS2 presente en la solución. En el caso de CBV-400 a un tiempo de 5 minutos adsorbe aproximadamente un 8% del bacteriófago, similar a cuando tiene AgCBV-400. Sin embargo, AgCBV-600 a un tiempo de 30 minutos logra atrapar un 20% a diferencia de CBV-400 con 10%.

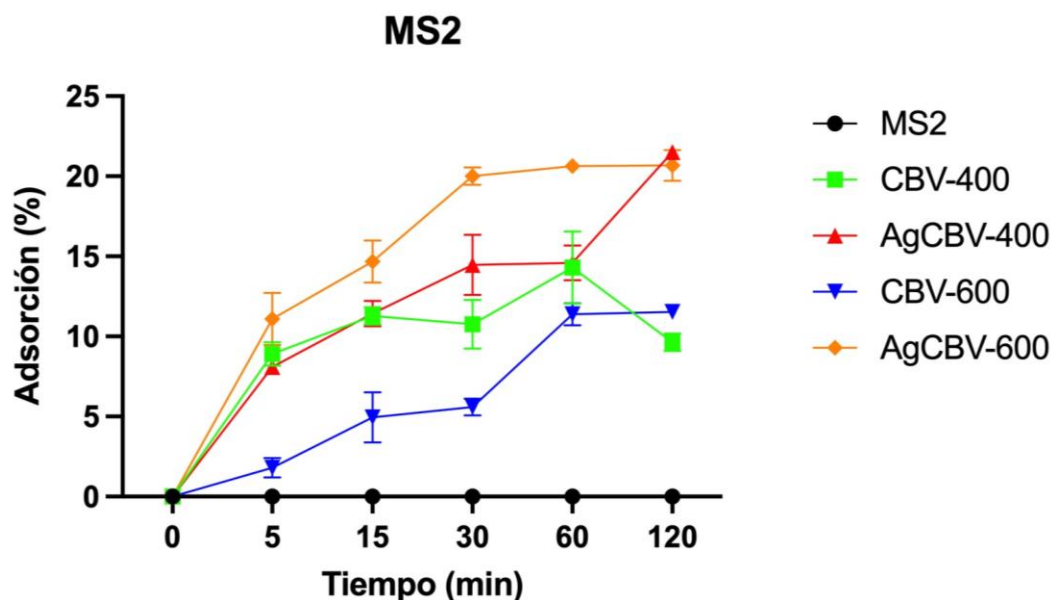
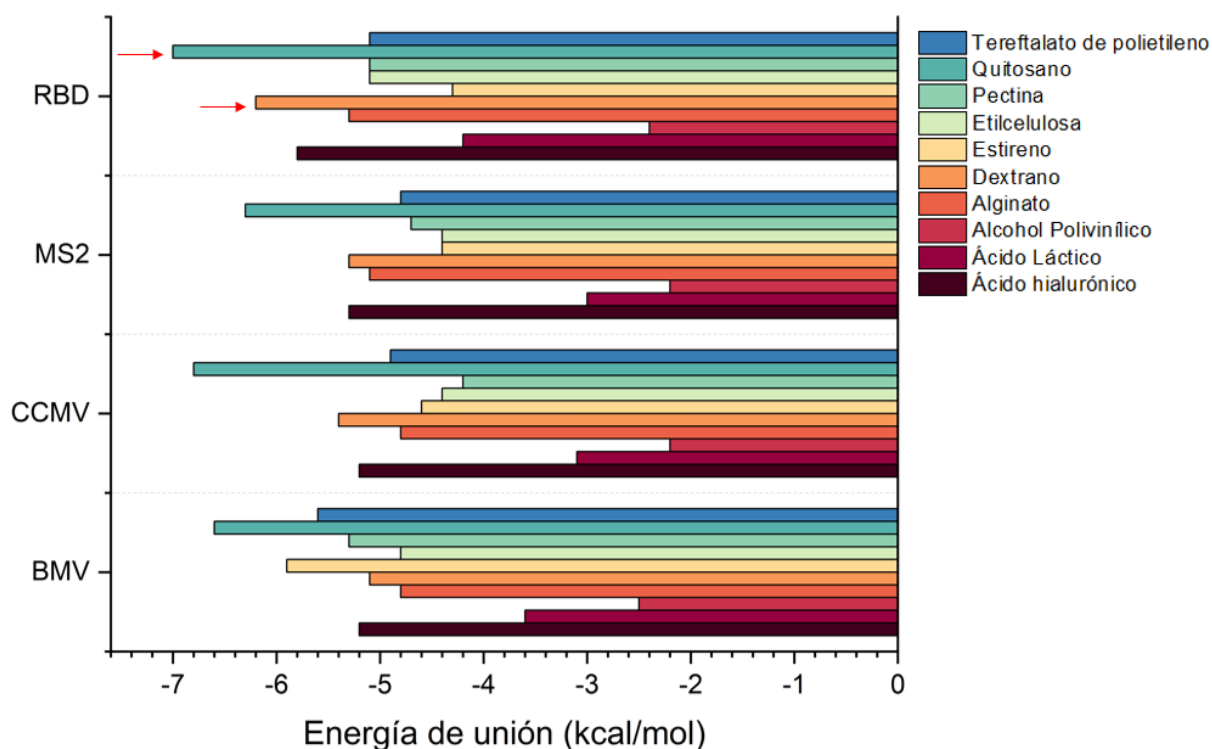


Figura 38. Porcentaje de adsorción de partículas de MS2 por diferentes nanomateriales.

### 3.8 Búsqueda de materiales para atrapar virus por medio de acoplamiento molecular

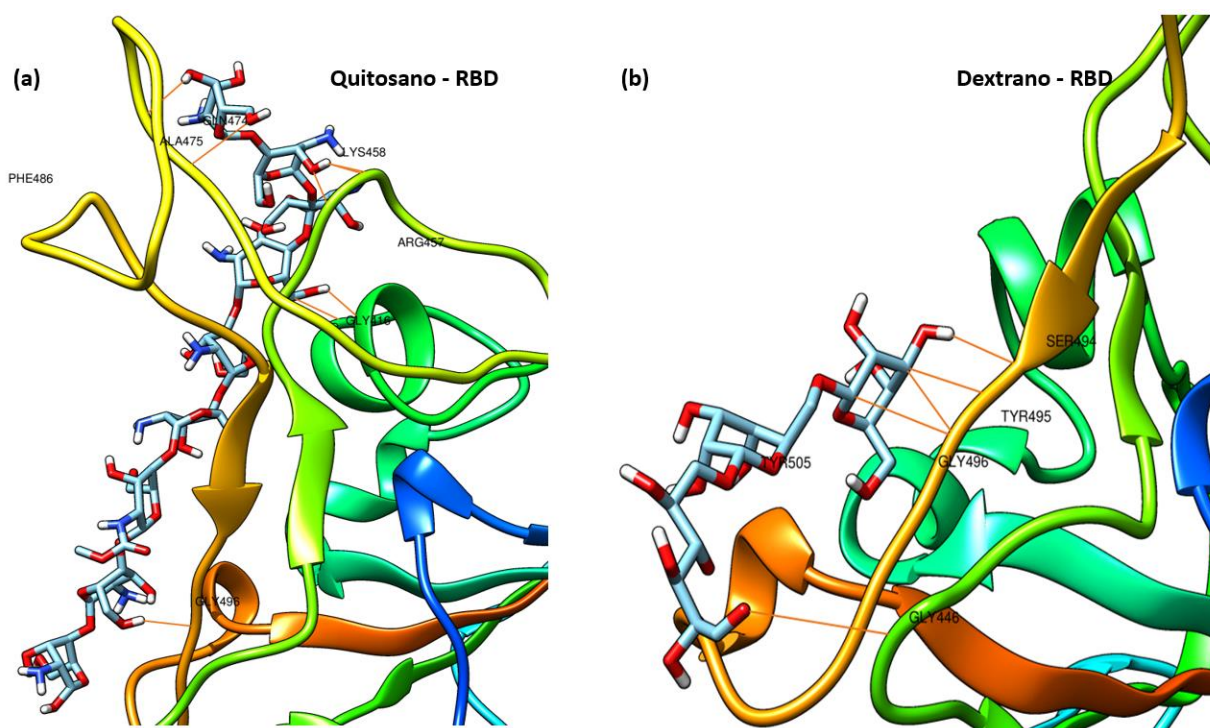
Se llevó a cabo la búsqueda de otros materiales que pudieran servir como candidatos para atrapar virus, entre ellos diferentes polímeros y polisacáridos. Para BMV, CCMV y MS2 se usaron las proteínas de la

cápside. Esto, mediante acoplamiento molecular. La Figura 39 muestra las energías de unión ligando-receptor. Entre los mejores candidatos se encontraba el quitosano con una energía de unión de -7 kcal/mol con el RBD del SARS-CoV-2, -6.3 kcal/mol con MS2, -6.8 kcal/mol con CCMV y -6.6 kcal/mol con BMV. En el anexo 3 se muestra una tabla con los resultados. Fue el compuesto que mejor energía de unión tenía. El segundo mejor candidato que se seleccionó fue el dextrano con una energía de unión de -6.2 kcal/mol con el RBD y el ácido hialurónico en tercer lugar con -5.8 kcal/mol. La etilcelulosa, pectina y el tereftalato de polietileno tuvieron la misma afinidad por la proteína del RBD.



**Figura 39.** Energías de unión obtenidas mediante acoplamiento molecular para RBD, MS2, CCMV y BMV.

Después de obtener las energías de unión, se analizaron las interacciones intermoleculares mediante las cuales los mejores compuestos candidatos se unen al virus, como se mencionó anteriormente, el quitosano fue el que tuvo las mejores energías de unión. El quitosano tiene contacto con algunos residuos de aminoácidos de la proteína RBD del SARS-CoV-2 (Figura 40) como la Alanina 475, Glicina 496, Treonina 500, Lisina 458. El dextrano, por otra parte, tiene interacción también con la Glicina 496 y con otros residuos como Serina 494, Tirosina 495, Tirosina 505. Mediante interacción en 2D con LigPlot<sup>+</sup> se confirmó esto, además de interacciones hidrofóbicas con otros residuos.



**Figura 40.** Interacción de los compuestos acoplados con la proteína RBD del SARS-CoV-2 (PDB: 6LZG).

## Capítulo 4.        **Discusión**

---

Una de las dificultades más grandes de este proyecto fue la dispersión del nanomaterial en medio líquido, debido a que es poco soluble en agua. De acuerdo con Ejaz et al., (1999) la solubilidad de los cristales de zeolita puede llevarse a cabo al aumentar la temperatura y la concentración alcalina de la solución (aumentar el pH). Sin embargo, es bien sabido que, de manera general, las bacterias se multiplican rápidamente a temperaturas entre 5 – 65 °C, y por encima de los 65 °C empiezan a destruirse, por lo cual el aumento de temperatura no era viable y tampoco corresponde a temperaturas para ser utilizadas en EPP. Así también, no es adecuado dispersar las zeolitas en un medio básico ya que este podría dañar o matar a las bacterias. Starliper et al., (2015) demostraron que a un pH de 12 durante 72 horas o menos, un medio básico, el hidróxido de sodio es bactericida para diversas bacterias gram positivas y gram negativas. También a concentraciones más bajas de hidróxido de sodio hay efecto bactericida para muchas bacterias. Por lo tanto, se optó por colocar los tubos de crecimiento de las bacterias tratadas con las zeolitas de manera horizontal, para tener una mejor dispersión de a través de la agitación en la incubadora, esto permite una mayor dispersión manera mecánica del material en el medio.

Las zeolitas son silicatos cristalinos porosos con una estructura cristalográfica compleja que da lugar a poros del tamaño de una molécula específica y pueden tener una amplia variedad de composiciones con algunos de los átomos de silicio reemplazados por otros cationes, como se mencionó anteriormente con algunos elementos como  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  o algunos compuestos como el  $\text{TiO}_2$ . El efecto que tienen las zeolitas puede explicarse por el diámetro del poro debido a sus diferentes topologías, en el caso de la mordenita (MOR) tiene un diámetro máximo de 0.67 nm, chabazita (CHA) de 0.737 nm y faujasita (FAU) de 1.124 nm, permitiendo la liberación de una manera más eficaz en la FAU. Se ha demostrado, por ejemplo, que diferentes topologías de zeolitas afectan a la liberación de iones metálicos (Demirci et al., 2013).

La liberación de estos iones es clave en el efecto antibacteriano que puedan tener. Si el  $\text{Ag}^+$  se adhiere a proteínas de la membrana citoplasmática y a los lípidos debido a la atracción electrostática y afinidad con las proteínas con azufre puede afectar la permeabilidad y propiedades mecánicas de la bacteria. Si los iones de  $\text{Ag}^+$  son localizados en el citoplasma pueden desnaturalizar los ribosomas e inhibir la síntesis de proteínas. Además, pueden afectar el proceso de respiración de la bacteria, causando una disrupción de la membrana por especies reactivas de oxígeno (Yin et al., 2020). Como resultado, las moléculas de ADN se condensan y pierden su capacidad de replicarse a medida que penetran los iones de plata.  $\text{Ag}^+$  exhibe

interacciones inusualmente específicas con el ADN, uniéndose exclusivamente a bases naturales (adenina, citosina, guanina y timina) en lugar del esqueleto de fosfato cargado negativamente (Swasey et al., 2015). Es por eso por lo que la Ag en las zeolitas resultó tener un buen efecto. Sin embargo, aún se deben de considerar los otros compuestos que tienen en su estructura materiales fotocatalíticos como las zeolitas con Zn o las que tenían  $\text{TiO}_2$ , que por sí mismas tuvieron una buena actividad, quizá esta pueda incrementar si hay una activación fotocatalítica. En cuanto a los carbonitruros, se observó que se necesitaba una concentración baja de Cu y una alta de Ag para mostrar actividad bactericida.

Las pruebas de susceptibilidad bacteriana son ensayos en los que se realiza un tamiz bacteriano sobre una placa Petri antes de colocar discos de papel filtro que contienen el tratamiento del compuesto a evaluar. Las pruebas de susceptibilidad bacteriana de los nanomateriales mostraron que en la zeolita FAU con Ag (AgCBV-400 y AgCBV-600) presentan un halo de inhibición bien definido. Sin embargo, en medio sólido las otras zeolitas no mostraron actividad aparente, esto puede deberse a un fenómeno de difusión en el medio por lo cual deben de buscarse otras alternativas para poder evaluar la susceptibilidad de los microorganismos ante este tipo de nanomateriales. Este comportamiento también fue observado en los textiles impregnados con  $\text{TiO}_2$  NPs, por lo cual este método no fue óptimo para evaluarlos, porque no se observó un halo de inhibición para las muestras. Por este motivo, se decidió impregnar los tejidos con el medio bacteriano antes de colocarlos sobre la placa de Petri con agar LB, donde, de esta manera cuanto menor sea el halo de bacterias alrededor de la pieza de tela, indicará que mejor será la actividad antibacteriana de las nanopartículas. Se debe considerar la dispersión del  $\text{TiO}_2$  NPs sobre el textil, mientras que las nanopartículas se distribuyan de manera uniforme sobre el textil mayor es el efecto antibacteriano que resulta. Se ha visto que la supervivencia de las bacterias a temperatura ambiente en poliéster puede ser de hasta 206 días, mientras que en algunas muestras de algodón se ha visto una supervivencia de hasta 90 días (Kampf, 2020). El uso de estos textiles impregnados con  $\text{TiO}_2$  NPs puede ayudar a la reducción de la supervivencia bacteriana. El mecanismo de la actividad fotocatalítica del  $\text{TiO}_2$  está directamente relacionado con su estructura electrónica y se puede dividir en seis pasos: fotoexcitación, separación de carga y transferencia a la superficie de la partícula, recombinación de la carga total y superficial, fotoreducción y fotooxidación superficial (Rashid et al., 2021). La actividad fotocatalítica del  $\text{TiO}_2$  depende directamente de la producción de especies reactivas de oxígeno.

De acuerdo con Lan et al., (2020) son 17 residuos de aminoácidos los que intervienen en la unión de RBD – ACE2 la cual es responsable de la infección del SARS-CoV-2 y son: Lisina 417, Glicina 446, Tirosina 449, Tirosina 453, Leucina 455, Fenilalanina 456, Alanina 475, Fenilalanina 486, Asparagina 487, Tirosina 489, Glutamina 493, Glicina 496, Glutamina 498, Treonina 500, Asparagina 501, Glicina 502 y Tirosina 505. En

este estudio por acoplamiento molecular, se encontró que la energía más alta con RBD fue el quitosano y tuvo interacción con 4 de los residuos que tienen contacto la interfaz RBD – ACE2: Alanina 475, Glicina 496, Treonina 500 y Asparagina 501 y el dextrano con 7: Glicina 446, Tirosina 453, Glicina 496, Glutamina 498, Treonina 500, Asparagina 501 y Tirosina 505. Bloqueando estos residuos de aminoácidos se podría frenar la interacción con el receptor celular ACE2. Experimentalmente el quitosano ha demostrado ser un buen compuesto antibacteriano y antifúngico, además, se ha propuesto su uso para combatir virus, aunque aún está en investigación su propiedad antiviral. El quitosano, además de poder utilizarlo como agente antiviral se puede usar como antibacteriano. La razón de la eficacia antibacteriana es por la unión del quitosano catiónico a las moléculas aniónicas de la superficie externa de la membrana bacteriana (Boonsongrit et al., 2006). La actividad antibacteriana propuesta más prevalente del quitosano es la unión a la pared celular bacteriana cargada negativamente que provoca la ruptura de la célula, alterando la permeabilidad de la membrana, seguida de la unión al ADN que provoca la inhibición de la replicación y finalmente la muerte celular como consecuencia, el quitosano con carga positiva también puede actuar bloqueando la síntesis de ARN y proteínas, lo que inhibe el crecimiento bacteriano (Chien et al., 2016).

Aún se necesitan más estudios para determinar la actividad fotocatalítica de los nanomateriales, sin embargo, los estudios que se llevaron a cabo demostraron que ya poseen actividad antibacteriana estos nanomateriales y, además pueden adsorber a BMV, CCMV y MS2. De igual manera se podría llevar a cabo con un coronavirus que no sea altamente patógeno.

## Capítulo 5. Conclusiones

---

Tres tipos de zeolitas (FAU, CHA, MOR) se doparon con diferentes compuestos como  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  para adquirir propiedades antibacterianas. Las faujasitas con Zn y Ag presentaron una actividad de inhibición de bacterias gram positivas y gram negativas desde una concentración de 1.5%, además de la chabazita con  $\text{TiO}_2/\text{Pr}$  y la chabazita  $\text{ZnO/Ce}$  a una concentración de 2.5%. En el caso de los carbonitruros se necesitaron concentraciones altas de Ag (15%) y bajas de Cu (5%). Además, las zeolitas con plata AgCBV-600 y AgCBV-400 presentaron mejor actividad bactericida con la técnica de susceptibilidad bacteriana (Kirby-Bauer) debido a que tienen una buena difusión en el medio.

De acuerdo con la propiedad deseada, las formulaciones de zeolita se pueden combinar a diferentes proporciones (zeolita/compuesto) con diferentes textiles, como el indiolino, cuando se requieren propiedades antibacterianas.

En cuanto al crecimiento de bacterias en textiles, estas crecen en zonas donde no se encuentran las  $\text{TiO}_2$  NPs por lo cual su actividad depende de la homogeneidad de las nanopartículas en la tela. También, la actividad fotocatalítica de las telas impregnadas con  $\text{TiO}_2$  NPs radiadas a una longitud de onda de 254 nm tienen mejor efecto a los 5 minutos, afectando la morfología de las bacterias y en consecuencia causando daño a estas.

Las zeolitas FAU tienen capacidad de adsorber los virus de plantas CCMV, BMV y el bacteriófago MS2, sin embargo, cuando se les añade Ag en su estructura aumenta la actividad de adsorción del virus.

El quitosano y el dextrano tienen mejores energías de unión para las proteínas virales de acuerdo con los cálculos mediante acoplamiento molecular, especialmente para el RBD, por lo cual pueden ser buenos candidatos para servir como soportes e incluir algunos otros compuestos como los utilizados en este estudio.

## Literatura citada

---

- Abo-Zeid, Y., Ismail, N. S. M., McLean, G. R., y Hamdy, N. M. 2020. A molecular docking study repurposes FDA approved iron oxide nanoparticles to treat and control COVID-19 infection. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. Elsevier, 153, pp. 105465. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105465>
- Alaghmandfard, A. y Ghandi, K. 2022. A Comprehensive Review of Graphitic Carbon Nitride (g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>)–Metal Oxide-Based Nanocomposites: Potential for Photocatalysis and Sensing. *Nanomaterials*, 12(2), pp. 294. doi: <https://doi.org/10.3390/nano12020294>
- Azam, A., Ahmed, A. S., Oves, M., Khan, M. S., Habib, S. S., y Memic, A. 2012. Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: a comparative study. *International Journal of Nanomedicine*. *Int J Nanomedicine*, 7, pp. 6003–6009. doi: <https://doi.org/10.2147/IJN.S35347>
- Baerlocher, C., McCusker, L. B., y Olson, D. H. 2007. Atlas of zeolite framework types. Elsevier. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53064-6.X5186-X>
- Boonsongrit, Y., Mitrevej, A., y Mueller, B. W. 2006. Chitosan drug binding by ionic interaction. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. Elsevier, 62(3), pp. 267–274. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2005.09.002>
- Cadena-Nava, R. D., Comas-Garcia, M., Garmann, R. F., Rao, A. L. N., Knobler, C. M., y Gelbart, W. M. 2012. Self-assembly of viral capsid protein and RNA molecules of different sizes: requirement for a specific high protein/RNA mass ratio. *Journal of Virology*. *Am Soc Microbiol*, 86(6), pp. 3318–3326. doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.06566-11>
- Cascella, M., Rajnik, M., Aleem, A., Dulebohn, S., y di Napoli, R. 2021. Features, evaluation, and treatment of coronavirus (COVID-19). *StatPearls*. Recuperado el 7 de junio de 2022, a partir de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776/>
- Centros para el Control y Prevención de Enfermedades. 2020. *Interim Laboratory Biosafety Guidelines for Handling and Processing Specimens Associated with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)*. Recuperado el 8 de septiembre de 2022, a partir de <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/lab-biosafety-guidelines.html#summary-accordion>
- Chen, L. y Liang, J. 2020. An overview of functional nanoparticles as novel emerging antiviral therapeutic agents. *Materials Science and Engineering: C*. Elsevier, 112, pp. 110924. doi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110924>
- Chen, Y., Ma, J., Xu, M., y Liu, S. 2020. Antiviral nanoagents: More attention and effort needed? *Nano Today*, 35, pp. 100976. doi: <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2020.100976>
- Chien, R.-C., Yen, M.-T., y Mau, J.-L. 2016. Antimicrobial and antitumor activities of chitosan from shiitake stipes, compared to commercial chitosan from crab shells. *Carbohydrate Polymers*. Elsevier, 138, pp. 259–264. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.11.061>
- Cho, E. J., Holback, H., Liu, K. C., Abouelmagd, S. A., Park, J., y Yeo, Y. 2013. Nanoparticle characterization: State of the art, challenges, and emerging technologies. *Molecular Pharmaceutics*. *American Chemical Society*, 10(6), pp. 2093–2110. doi: <https://doi.org/10.1021/mp300697h>

- Darnell, M. E. R., Subbarao, K., Feinstone, S. M., y Taylor, D. R. 2004. Inactivation of the coronavirus that induces severe acute respiratory syndrome, SARS-CoV. *Journal of Virological Methods*, 121(1), pp. 85–91. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.06.006>
- Demirci, S., Ustaoglu, Z., Yilmazer, G. A., Sahin, F., y Baç, N. 2013. Antimicrobial Properties of Zeolite-X and Zeolite-A Ion-Exchanged with Silver, Copper, and Zinc Against a Broad Range of Microorganisms. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2013 172:3. Springer, 172(3), pp. 1652–1662. doi: <https://doi.org/10.1007/S12010-013-0647-7>
- Desai, G., Ramachandran, G., Goldman, E., Galione, A., Lal, A., Choueiri, T. K., Fay, A., Jordan, W., Schaffner, D. W., y Caravanos, J. 2022. The efficiency of Grignard Pure™ to inactivate airborne SARS-CoV-2 surrogate. *BioRxiv*. Cold Spring Harbor Laboratory. doi: <https://doi.org/10.1101/2022.08.19.504307>
- Domingues, J. M., Teixeira, M. O., Teixeira, M. A., Freitas, D., Silva, S. F. da, Tohidi, S. D., Fernandes, R. D. v., Padrão, J., Zille, A., Silva, C., Antunes, J. C., y Felgueiras, H. P. 2022. Inhibition of Escherichia Virus MS2, Surrogate of SARS-CoV-2, via Essential Oils-Loaded Electrospun Fibrous Mats: Increasing the Multifunctionality of Antivirus Protection Masks. *Pharmaceutics*, 14(2), pp. 303. doi: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14020303>
- Douglas, T. y Young, M. 2006. Viruses: making friends with old foes. *Science*. American Association for the Advancement of Science, 312(5775), pp. 873–875. doi: <https://doi.org/10.1126/science.1123223>
- Du, L., He, Y., Zhou, Y., Liu, S., Zheng, B.-J., y Jiang, S. 2009. The spike protein of SARS-CoV—a target for vaccine and therapeutic development. *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, 7(3), pp. 226–236. doi: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2090>
- Ealias, A. M. y Saravanakumar, M. P. 2017. A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. IOP Publishing, 263(3), pp. 032019. doi: <https://doi.org/10.1088/1757-899X/263/3/032019>
- Ejaz, T., Jones, A. G., y Graham, P. 1999. Solubility of zeolite A and its amorphous precursor under synthesis conditions. *Journal of Chemical and Engineering Data*. ACS, 44(3), pp. 574–576. doi: <https://doi.org/10.1021/je980164j>
- Govorov, A. O. y Richardson, H. H. 2007. Generating heat with metal nanoparticles. *Nano Today*, 2(1), pp. 30–38. doi: [https://doi.org/10.1016/S1748-0132\(07\)70017-8](https://doi.org/10.1016/S1748-0132(07)70017-8)
- Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E., y Hutchison, G. R. 2012. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of Cheminformatics*. BioMed Central, 4(1), pp. 1–17. doi: <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N.-H., y Nitsche, A. 2020. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell*. Elsevier, 181(2), pp. 271–280. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>
- Kampf, G. 2020. How long can nosocomial pathogens survive on textiles? A systematic review. *GMS Hygiene and Infection Control*, 15, pp. Doc10. doi: <https://doi.org/10.3205/dgkh000345>

- Khaiboullina, S., Uppal, T., Dhabarde, N., Subramanian, V. R., y Verma, S. C. 2021. Inactivation of Human Coronavirus by Titania Nanoparticle Coatings and UVC Radiation: Throwing Light on SARS-CoV-2. *En Viruses* (Vol. 13, Issue 1). doi: <https://doi.org/10.3390/v13010019>
- Lai, M. Y. Y., Cheng, P. K. C., y Lim, W. W. L. 2005. Survival of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Clinical Infectious Diseases*. The University of Chicago Press, 41(7), pp. e67–e71. doi: <https://doi.org/10.1086/433186>
- Lan, J., Ge, J., Yu, J., Shan, S., Zhou, H., Fan, S., Zhang, Q., Shi, X., Wang, Q., Zhang, L., y Wang, X. 2020. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature* 2020 581:7807. Nature Publishing Group, 581(7807), pp. 215–220. doi: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2180-5>
- Li, F. 2016. Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. *Annual Review of Virology*, 3(1), pp. 237–261. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042301>
- Livingston, E., Desai, A., y Berkwits, M. 2020. Sourcing personal protective equipment during the COVID-19 pandemic. *Jama*. American Medical Association, 323(19), pp. 1912–1914. doi: <https://doi.org/10.1001/jama.2020.5317>
- Ludwig, S. y Zarbock, A. 2020. Coronaviruses and SARS-CoV-2: a brief overview. *Anesthesia and Analgesia*. Wolters Kluwer Health. doi: <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000004845>
- Maeda, K. y Domen, K. 2007. New Non-Oxide Photocatalysts Designed for Overall Water Splitting under Visible Light. *The Journal of Physical Chemistry C*. American Chemical Society, 111(22), pp. 7851–7861. doi: <https://doi.org/10.1021/jp070911w>
- Maesen, T. 2007. Chapter 1 - The Zeolite Scene – An Overview. En J. Čejka, H. van Bekkum, A. Corma, & F. Schüth (Eds.), *Studies in Surface Science and Catalysis* (Vol. 168). Elsevier. doi: [https://doi.org/10.1016/S0167-2991\(07\)80789-0](https://doi.org/10.1016/S0167-2991(07)80789-0)
- Meguid, S. A. y Elzaabalawy, A. 2020. Potential of combating transmission of COVID-19 using novel self-cleaning superhydrophobic surfaces: part I—protection strategies against fomites. *International Journal of Mechanics and Materials in Design*. Springer, 16(3), pp. 423–431. doi: <https://doi.org/10.1007/s10999-020-09513-x>
- Mehranfar, A. y Izadyar, M. 2020. Theoretical Design of Functionalized Gold Nanoparticles as Antiviral Agents against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Journal of Physical Chemistry Letters*, 11(24), pp. 10284–10289. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.0c02677>
- Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., y Olson, A. J. 1998. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry*. Wiley Online Library, 19(14), pp. 1639–1662. doi: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(19981115\)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(19981115)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B)
- Murali, A., Sakar, M., Priya, S., Bensingh, R. J., y Kader, M. A. 2022a. Graphitic-Carbon Nitride for Hydrogen Storage. En *Nanoscale Graphitic Carbon Nitride*. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-823034-3.00017-0
- Murali, A., Sakar, M., Priya, S., Bensingh, R. J., y Kader, M. A. 2022b. Graphitic-Carbon Nitride for Hydrogen Storage. *Nanoscale Graphitic Carbon Nitride: Synthesis and Applications*. Elsevier, pp. 487–514. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823034-3.00017-0>

- Nabika, H. y Unoura, K. 2016. Interaction between nanoparticles and cell membrane. En *Surface Chemistry of Nanobiomaterials: Applications of Nanobiomaterials*. Elsevier Inc. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-42861-3.00008-X>
- Ong, S. W. X., Tan, Y. K., Chia, P. Y., Lee, T. H., Ng, O. T., Wong, M. S. Y., y Marimuthu, K. 2020. Air, Surface Environmental, and Personal Protective Equipment Contamination by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) From a Symptomatic Patient. *JAMA*, 323(16), pp. 1610–1612. doi: <https://doi.org/10.1001/jama.2020.3227>
- Ong, W.-J., Tan, L.-L., Ng, Y. H., Yong, S.-T., y Chai, S.-P. 2016. Graphitic Carbon Nitride (g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>)-Based Photocatalysts for Artificial Photosynthesis and Environmental Remediation: Are We a Step Closer To Achieving Sustainability? *Chemical Reviews*, 116(12), pp. 7159–7329. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00075>
- Organization, W. H. 2020a. Advice on the use of masks in the context of COVID-19: interim guidance, 1 December 2020. Recuperado el 8 de agosto de 2022, a partir de [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/332293/WHO-2019-nCov-IPC\\_Masks-2020.4-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/332293/WHO-2019-nCov-IPC_Masks-2020.4-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Organization, W. H. 2020b. Laboratory testing for coronavirus disease ( COVID-19) in suspected human cases: interim guidance, 19 March 2020. Recuperado el 8 de agosto de 2022, a partir de <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331501/WHO-COVID-19-laboratory-2020.5-eng.pdf>
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., y Ferrin, T. E. 2004. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*. Wiley Online Library, 25(13), pp. 1605–1612. doi: <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
- Rashid, M. M., Simončič, B., y Tomšič, B. 2021. Recent advances in TiO<sub>2</sub>-functionalized textile surfaces. *Surfaces and Interfaces*, 22, pp. 100890. doi: <https://doi.org/10.1016/j.surfin.2020.100890>
- Reddy, T. y Sansom, M. S. P. 2016. Computational virology: From the inside out. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. Elsevier B.V., 1858(7), pp. 1610–1618. doi: <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2016.02.007>
- Reina, G., Peng, S., Jacquemin, L., Andrade, A. F., y Bianco, A. 2020. Hard nanomaterials in time of viral pandemics. *ACS Nano*. ACS Publications, 14(8), pp. 9364–9388. doi: <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c04117>
- Ren, S.-Y., Wang, W.-B., Hao, Y.-G., Zhang, H.-R., Wang, Z.-C., Chen, Y.-L., y Gao, R.-D. 2020. Stability and infectivity of coronaviruses in inanimate environments. *World Journal of Clinical Cases*. Baishideng Publishing Group Inc, 8(8), pp. 1391. doi: <https://doi.org/10.12998/wjcc.v8.i8.1391>
- Ritz, C., Baty, F., Streibig, J. C., y Gerhard, D. 2015. Dose-response analysis using R. *PloS One*. Public Library of Science San Francisco, CA USA, 10(12), pp. e0146021. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146021>
- Saleh, T. A. y Gupta, V. K. 2016. Synthesis, Classification, and Properties of Nanomaterials. *Nanomaterial and Polymer Membranes*. Elsevier, pp. 83–133. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804703-3.00004-8>

- Schmidt, N., Lareau, C. A., Keshishian, H., Ganskih, S., Schneider, C., Hennig, T., Melanson, R., Werner, S., Wei, Y., y Zimmer, M. 2021. The SARS-CoV-2 RNA–protein interactome in infected human cells. *Nature Microbiology*. Nature Publishing Group, 6(3), pp. 339–353. doi: <https://doi.org/10.1038/s41564-020-00846-z>
- Scialo, F., Daniele, A., Amato, F., Pastore, L., Matera, M. G., Cazzola, M., Castaldo, G., y Bianco, A. 2020. ACE2: the major cell entry receptor for SARS-CoV-2. *Lung*. Springer, pp. 1–11. doi: <https://doi.org/10.1007/s00408-020-00408-4>
- Silhavy, T. J., Kahne, D., y Walker, S. 2010. The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(5), pp. a000414–a000414. doi: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414>
- Simonian, M. H. y Smith, J. A. 2006. Spectrophotometric and Colorimetric Determination of Protein Concentration. *Current Protocols in Molecular Biology*, 76(1). doi: <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1001as76>
- Starliper, C. E., Watten, B. J., Iwanowicz, D. D., Green, P. A., Bassett, N. L., y Adams, C. R. 2015. Efficacy of pH elevation as a bactericidal strategy for treating ballast water of freight carriers. *Journal of Advanced Research*, 6(3), pp. 501–509. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2015.02.005>
- Staroń, A. y Długosz, O. 2021. Antimicrobial properties of nanoparticles in the context of advantages and potential risks of their use. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 56(6), pp. 680–693. doi: <https://doi.org/10.1080/10934529.2021.1917936>
- Steinmetz, N. F. y Evans, D. J. 2007. Utilisation of plant viruses in bionanotechnology. *Organic & Biomolecular Chemistry*. Royal Society of Chemistry, 5(18), pp. 2891–2902. doi: <https://doi.org/10.1039/B708175H>
- Swasey, S. M., Leal, L. E., Lopez-Acevedo, O., Pavlovich, J., y Gwinn, E. G. 2015. Silver (I) as DNA glue: Ag<sup>+</sup>-mediated guanine pairing revealed by removing Watson-Crick constraints. *Scientific Reports*, 5(1), pp. 10163. doi: <https://doi.org/10.1038/srep10163>
- Trott, O. y Olson, A. J. 2010. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*. Wiley Online Library, 31(2), pp. 455–461. doi: <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
- Turgeon, N., Toulouse, M.-J., Martel, B., Moineau, S., y Duchaine, C. 2014. Comparison of Five Bacteriophages as Models for Viral Aerosol Studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(14), pp. 4242–4250. doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.00767-14>
- van Doremalen, N., Bushmaker, T., Morris, D. H., Holbrook, M. G., Gamble, A., Williamson, B. N., Tamin, A., Harcourt, J. L., Thornburg, N. J., y Gerber, S. I. 2020. Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1. *New England Journal of Medicine*. Mass Medical Soc, 382(16), pp. 1564–1567. doi: <https://doi.org/10.1056/NEJMc2004973>
- ViralZone. 2008. Bromovirus. Recuperado el 8 de julio de 2022, a partir de [https://viralzone.expasy.org/134?outline=all\\_by\\_species](https://viralzone.expasy.org/134?outline=all_by_species)
- ViralZone. 2016. Emesvirus. Recuperado el 5 de mayo de 2022, a partir de <https://viralzone.expasy.org/291>

- ViralZone. 2020. Betacoronavirus. Recuperado el 4 de septiembre de 2022, a partir de [https://viralzone.expasy.org/764?outline=all\\_by\\_species](https://viralzone.expasy.org/764?outline=all_by_species)
- Warburg, O. y Christian, W. 1941. Isolation and Crystallization of Enolase. *Die Naturwissenschaften*, 29(39), pp. 589–590. doi: <https://doi.org/10.1007/BF01482279>
- Weiss, C., Carriere, M., Fusco, L., Capua, I., Regla-Nava, J. A., Pasquali, M., Scott, J. A., Vitale, F., Unal, M. A., y Mattevi, C. 2020. Toward nanotechnology-enabled approaches against the COVID-19 pandemic. *ACS Nano*. ACS Publications, 14(6), pp. 6383–6406. doi: <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c03697>
- Wilson, P. y Zumla, A. 2019. Transmission and prevention of acute viral respiratory tract infections in hospitals. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 25(3), pp. 220–224. doi: <https://doi.org/10.1097/MCP.0000000000000566>
- Xu, H., Zhong, L., Deng, J., Peng, J., Dan, H., Zeng, X., Li, T., y Chen, Q. 2020. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *International Journal of Oral Science*. Nature Publishing Group, 12(1), pp. 1–5. doi: <https://doi.org/10.1038/s41368-020-0074-x>
- Yin, I. X., Zhang, J., Zhao, I. S., Mei, M. L., Li, Q., y Chu, C. H. 2020. The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 15, pp. 2555–2562. doi: <https://doi.org/10.2147/IJN.S246764>
- Zhu, J., Xiao, P., Li, H., y Carabineiro, S. A. C. 2014. Graphitic Carbon Nitride: Synthesis, Properties, and Applications in Catalysis. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 6(19), pp. 16449–16465. doi: <https://doi.org/10.1021/am502925j>
- Zuo, Y. Y., Uspal, W. E., y Wei, T. 2020. Airborne Transmission of COVID-19: Aerosol Dispersion, Lung Deposition, and Virus-Receptor Interactions. *ACS Nano*. ACS Publications, 14(12), pp. 16502–16524. doi: <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c08484>

## Anexos

---

### Anexo 1. Medios

**LB:** Agregar 2.5 g extracto de levadura, 5 g triptona, 5 g NaCl, agua Mili-Q (a 500 mL), autoclave (121 °C, 15 min), dejar enfriar y almacenar a temperatura 4 °C.

**Agar LB:** Agregar 2.5 g extracto de levadura, 5 g triptona, 5 g NaCl, 6 g bacto agar, agua Mili-Q (a 500 mL), autoclave (121 °C, 15 min), dejar enfriar y almacenar a temperatura 4 °C.

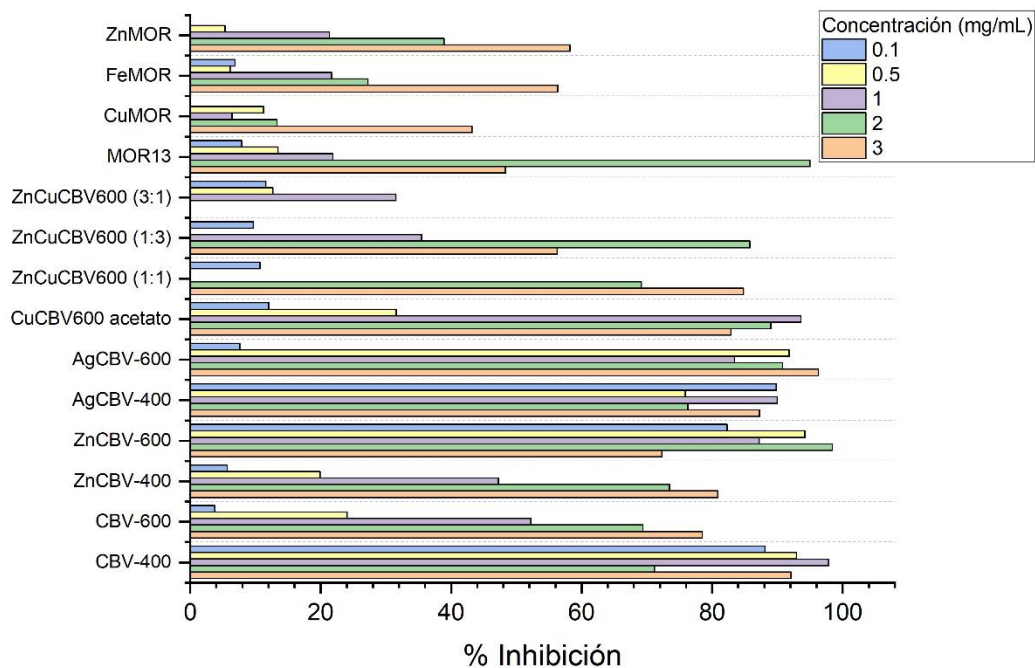
**Buffer PBS-G:** Diluir buffer PBS 10X en 50 mL de buffer PBS 1X. Agregar 10 mg de gelatina al buffer. Usar filtración al vacío con un filtro de 0.2 µm. Almacenar a 4 °C.

**Top agar MS2:** Agregar 5 g LB Broth (Lennox), 1.5 g agar (0.75%), agua Milli-Q (hasta 200 mL), autoclave (121 °C, 15 min), dejar enfriar y agregar suplemento 100X MS2 (2 mL), almacenar a temperatura ambiente.

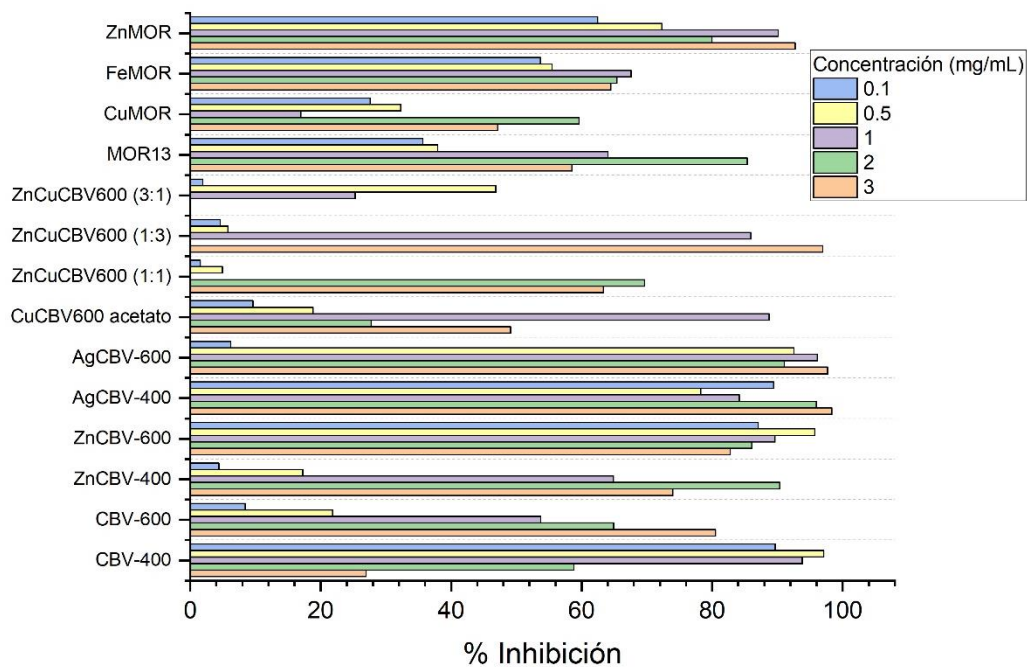
**Suplemento 100X MS2:** Agregar D-(+)- glucosa (10 g, 0,56 M), cloruro de calcio (2,94 g, 200 mM), clorhidrato de tiamina (100 mg, 3 mM), agua Milli-Q (a 100 mL), filtrar (0.22 µm), almacenar a temperatura ambiente.

**Buffer TNE:** Agregar Tris base 3 g (50 mM), NaCl 2.92 g (100 mM), EDTA 0.73 g (5 mM), agua Mili-Q (a 300 mL), ajustar pH con HCl a 7.5, filtrar con 0.22 µm, autoclave (121 °C, 15 min), dejar enfriar a temperatura ambiente y almacenar a 4 °C.

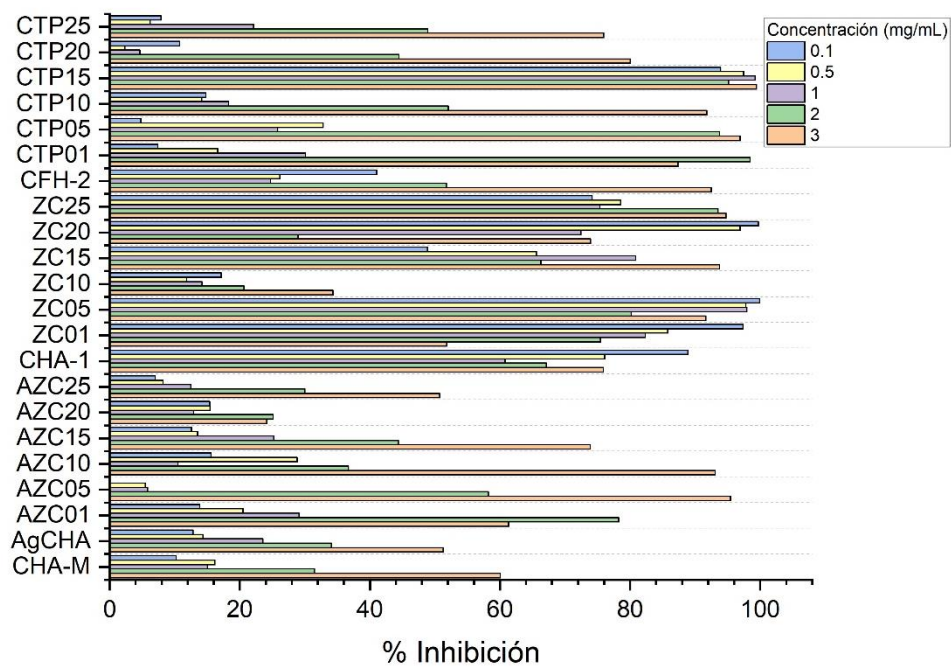
## Anexo 2. Inhibición de bacterias con nanomateriales a 24 h



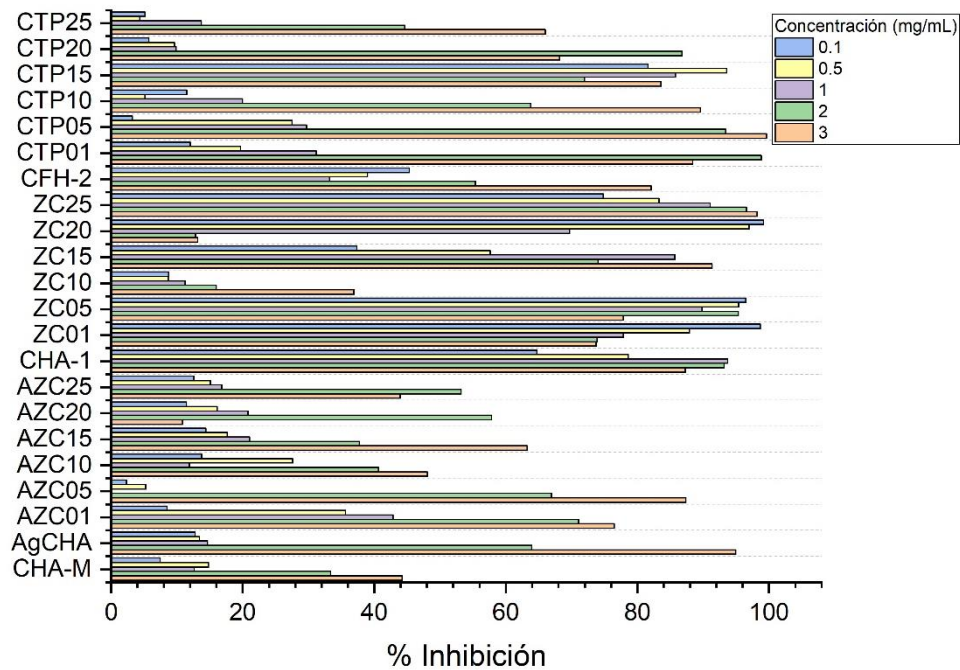
**Figura 41.** Porcentaje de inhibición de *E. coli* a 24 h con FAU con zinc y plata y MOR con Zn, Fe y Cu.



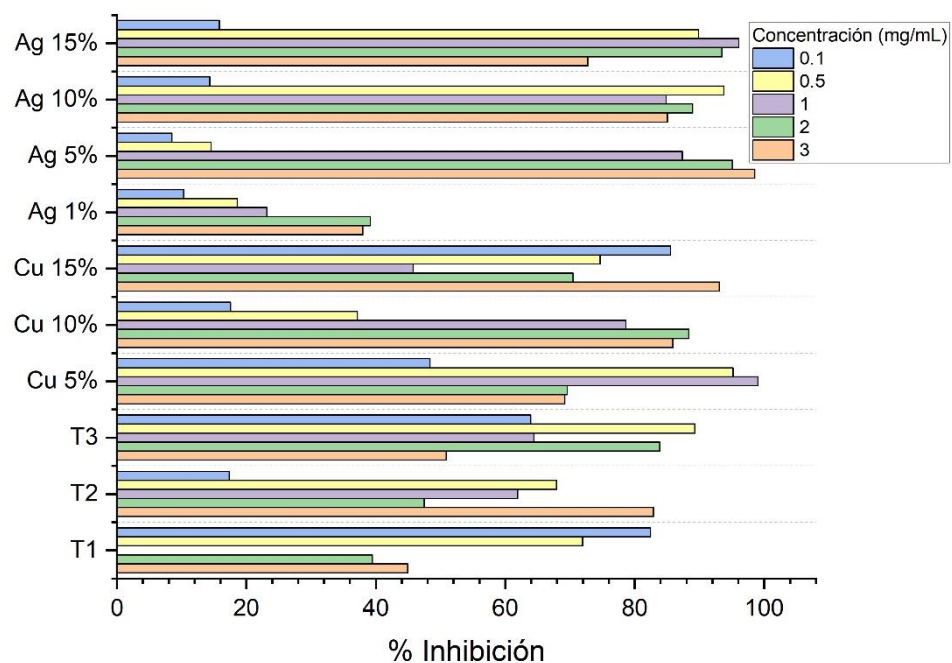
**Figura 42.** Porcentaje de inhibición de *S. aureus* a 24 h con FAU con zinc y plata y MOR con Zn, Fe y Cu. Las muestras con MOR se hicieron con el microorganismo *B. pumilus*.



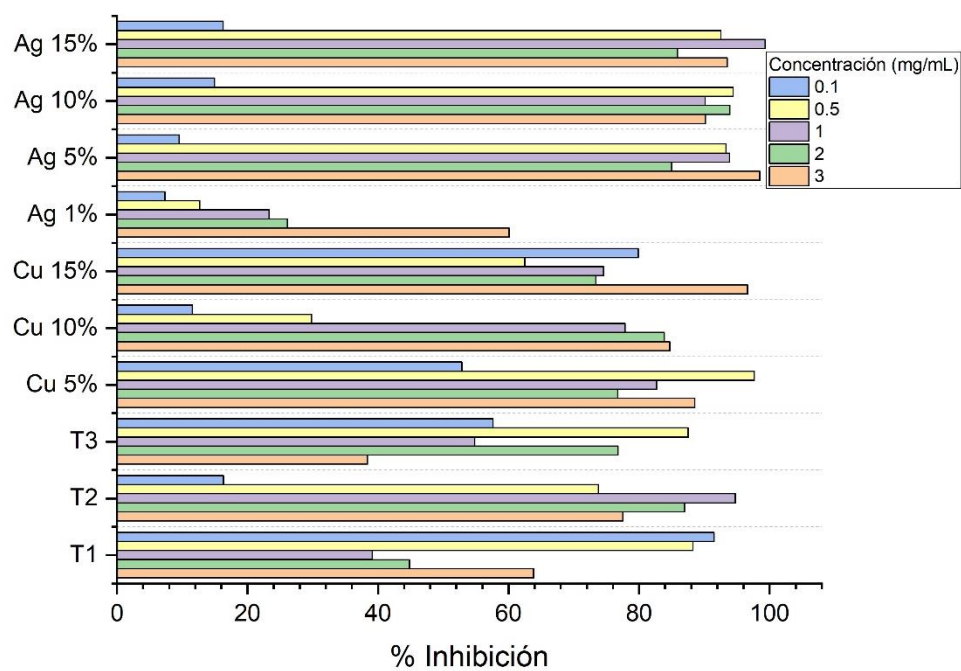
**Figura 43.** Porcentaje de inhibición de *E. coli* a 24 h con zeolitas chabazita.



**Figura 44.** Porcentaje de inhibición de *S. aureus* a 24 h con zeolitas chabazita.



**Figura 45.** Porcentaje de inhibición de *E. coli* a 24 h con carbonitruros, matrices primarias T1, T2 y T3.



**Figura 46.** Porcentaje de inhibición de *S. aureus* a 24 h con carbonitruros, matrices primarias T1, T2 y T3.

### Anexo 3. Resultados para las diferentes moléculas acopladas con las proteínas virales

**Tabla 3.** Energías de unión proteína-ligando, expresadas en kcal/mol.

|      | Ácido hialurónico | Ácido láctico | Alcohol polivinílico | Alginato | Dextrano | Estireno | Etilcelulosa | Pectina | Quitosano | Tereftalato de polietileno |
|------|-------------------|---------------|----------------------|----------|----------|----------|--------------|---------|-----------|----------------------------|
| RBD  | -5.8              | -4.2          | -2.4                 | -5.3     | -6.2     | -4.3     | -5.1         | -5.1    | -7.0      | -5.1                       |
| MS2  | -5.3              | -3.0          | -2.2                 | -5.1     | -5.3     | -4.4     | -4.4         | -4.7    | -6.3      | -4.8                       |
| CCMV | -5.2              | -3.1          | -2.2                 | -4.8     | -5.4     | -4.6     | -4.4         | -4.2    | -6.8      | -4.9                       |
| BMV  | -5.2              | -3.6          | -2.5                 | -4.8     | -5.1     | -5.9     | -4.8         | -5.3    | -6.6      | -5.6                       |